

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA

TESIS PROFESIONAL

EL EFECTO DE LAS SAPONINAS DE AGAVE SOBRE LAS LEVADURAS DEL MEZCAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA:

CLAUDIA YESENIA GONZÁLEZ MARTÍNEZ

ASESOR:

DRA. CLAUDIA LÓPEZ SÁNCHEZ

COMISIÓN REVISORA:

M. EN C. JAIME GALVÁN ESPINOSA

DR. FELIPE DE JESÚS PALMA CRUZ

DRA. MARÍA DE JESÚS RAMÍREZ ALTAMIRANO

DEDICATORIA

A Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi luz y mi camino.

A mis padres Rene González Hernández y Aurea Martínez López que han sido siempre el motor que impulsa mis sueños y esperanzas, quienes estuvieron siempre a mi lado en los días y noches más difíciles durante mis horas de estudio. Siempre han sido mis mejores guías de vida. Gracias por ser quienes son y por creer en mí.

A mi hermana Alondra que en el día a día con su presencia, respaldo y cariño me impulsó para salir adelante, por compartir alegrías y tropiezos, por su confianza y por permitirme estar en su vida, la amo y siempre estará presente en mi vida.

A Roberto Carlos por dejarme compartir su vida con la mía, por tu amor, confianza y apoyo incondicional.

A mis tíos Beato y Reynalda por el apoyo brindado durante estos años de estudio y como un reconocimiento de gratitud quiero que sientan que el objetivo logrado también es de ustedes.

A mis primos, Laura Ivette, Adriana de Jesús, Reyna Beatriz, Cesar y Adán por que han estado ahí presentes siempre, y mucho más cuando les he necesitado, les agradezco de corazón.

A mis sobrinos Amaya Sofia, Octavio Misael, Jesús Adrián y a la pequeña Alison Ivette por llegar a este mundo a darme alegría.

A toda mi familia, por sus aportes, su amor, su inmensa bondad y su apoyo. Les agradezco y hago presente mi gran afecto hacia ustedes, mi hermosa familia.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Claudia López Sánchez sin usted y sus virtudes, su paciencia y constancia este trabajo no lo hubiese logrado tan fácil. Usted formó parte importante de esta historia con sus aportes profesionales que la caracterizan. Gracias por compartir sus conocimientos de manera profesional e invaluable, por su dedicación perseverancia y tolerancia.

Al Dr. Felipe de Jesús Palma Cruz para usted mi más grande admiración, respeto y sincero agradecimiento por su tiempo, dedicación y entusiasmo que plasma al proporcionar su ayuda, bendiciones y mucho éxito.

A mis profesores de la carrera, por enseñarme todo lo que sé y más que eso, guiarme para ser una mejor persona y profesional.

A todos los miembros del Laboratorio de Control Ambiental por aportar de sus conocimientos y alegrías en este tiempo de estancia.

Al Instituto Tecnológico de Oaxaca, por abrirme sus puertas para formarme profesionalmente.

RESUMEN

El Maguey Jabalí es un Agave usado en la producción de mezcal, cuyo proceso, algunos clasificarían de complicado. Esto se debe a que, el jabalí suele esponjarse y expandirse, en razón de la gran cantidad de compuestos químicos que produce naturalmente, entre ellos las saponinas, las cuales muchas veces impiden que se logre la fermentación debido a la gran cantidad de espuma. Por lo tanto, es necesario conocer el efecto que causan las saponinas que están presentes en esta especie de agave empleada como materia prima para la producción de las bebidas de agave y su interacción con los microorganismos presentes en los procesos de fermentación, con el fin de implementar mejoras en los procesos de producción de dichas bebidas. Es por ello que los objetivos del presente trabajo fueron aislar, purificar e identificar las levaduras de la fermentación de mezcal; así como también realizar un experimento para determinar la concentración mínima inhibitoria de los extractos crudos sobre las levaduras y de la diosgenina sobre las levaduras. En la primera parte de este trabajo, se realizó un muestreo de Agave convallis el cual se procedió a inocular por extensión de placa, después para obtener cultivos puros de las cepas se utilizó la técnica de siembra por estría cruzada en placa, posteriormente se aisló en cultivo puro cada una de las colonias y, por último, se conservaron las cepas de levaduras. En la segunda parte se determinó la concentración mínima inhibitoria mediante el método de Kirby – Bauer con pequeñas modificaciones; este procedimiento se realizó con una repetición para cada experimento (con extractos crudos y con diosgenina) y posteriormente se realizó un análisis de varianza con los resultados obtenidos. Finalmente se aislaron 13 cepas de la muestra y por métodos convencionales se identificaron un total de siete cepas del género *Candida*, tres *Kluyveromyces* y tres *Saccharomyces*. En el caso de la concentración mínima inhibitoria para ambas sustancias se obtuvieron valores de F mayores que el valor crítico F obtenido en tablas, por lo tanto, los extractos crudos y la diosgenina si tienen un efecto significativo sobre las levaduras. Se compararon los resultados y los valores más altos de inhibición lo presentaron los extractos crudos, esto debido a que esta sustancia presenta diferentes componentes no solo saponinas como en el caso de la diosgenina que era una sustancia pura.

ABSTRACT

The Maguey Jabali is an Agave used in the production of mezcal, whose process, some would classify as complicated. This is because the wild boar tends to fluff up and expand, due to the large number of chemical compounds it naturally produces, including saponins, which often prevent fermentation from being achieved due to the large amount of foam. Therefore, it is necessary to know the effect caused by the saponins that are present in this species of agave used as raw material for the production of agave beverages and their interaction with the microorganisms present in the fermentation processes, in order to implement improvements in the production processes of said beverages. That is why the objectives of this work were to isolate, purify and identify the yeasts from the mezcal fermentation; as well as carrying out an experiment to determine the minimum inhibitory concentration of the crude extracts on the yeasts and of the diosgenin on the yeasts. In the first part of this work, a sample of Agave convallis was carried out, which was inoculated by plate extension, then to obtain pure cultures of the strains, the technique of sowing by cross-streaking in a plate was used, later it was isolated in pure culture each of the colonies and, finally, the yeast strains were preserved. In the second part, the minimum inhibitory concentration was determined using the Kirby-Bauer method with minor modifications; this procedure was carried out with a repetition for each experiment (with crude extracts and with diosgenin) and later an analysis of variance was carried out with the results obtained. Finally, 13 strains from the sample were isolated and a total of seven strains of the genus *Candida*, three *Kluyveromyces* and three *Saccharomyces*, were identified by conventional methods. In the case of the minimum inhibitory concentration for both substances, F values higher than the critical F value obtained in the tables were obtained, therefore, the crude extracts and diosgenin do have a significant effect on yeasts. The results were compared and the highest inhibition values were presented by the crude extracts, this is because this substance presents different components, not only saponins as in the case of diosgenin, which was a pure substance.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS	3
OBJETIVO GENERAL.....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO	4
1.1 MEZCAL.....	4
1.2 AGAVE	5
1.2.1 Agave convallis	7
1.3 PRODUCCIÓN DE MEZCAL.....	8
1.3.1 Etapas de producción	9
1.3.2 Tipos de mezcal.....	10
1.3.3 Categorías del mezcal	11
1.3.4 Método artesanal.....	11
1.4 PARÁMETROS Y CONDICIONES EN LA FERMENTACIÓN	12
1.4.1 Microorganismos	13
1.4.2 Levaduras	13
1.4.3 pH.....	16
1.4.4 Temperatura.....	16
1.5 SAPONINAS	17
1.5.1 Saponinas de Agave	18
1.5.2 Diosgenina.....	19
1.6 PRUEBAS DE VALORACIÓN DE EXTRACTOS.....	20
1.6.1 Concentración Mínima Inhibitoria.....	20

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA.....	21
2.1 MUESTREO	21
2.2 AISLAMIENTO	21
2.3 PURIFICACIÓN	23
2.4 CARACTERIZACIÓN	24
2.4.1 Observación macroscópica.....	24
2.4.2 Observación microscópica	25
2.5 AISLAMIENTO DIRIGIDO	26
2.6 TÉCNICA DE FERMENTACIÓN DE AZÚCARES	26
2.7 CONSERVACIÓN DE CEPAS	28
2.8 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA	29
CAPÍTULO 3. RESULTADOS	31
3.1 DATOS DE LA MUESTRA	31
3.2 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN.....	31
3.3 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	32
3.4 CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS.....	33
3.5 DESARROLLO DE LAS CEPAS EN AISLAMIENTO DIRIGIDO	34
3.6 FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS.....	37
3.7 IDENTIFICACIÓN DE CEPAS.....	38
3.8 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LOS EXTRACTOS CRUDOS SOBRE LAS LEVADURAS	39
3.9 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LA DIOSGENINA SOBRE LAS LEVADURAS.....	43
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES	48
REFERENCIAS	50
ANEXOS	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología, composición y estructura de una planta de Agave (Gallardo Valdez, 2020)	5
Figura 2. Ubicación del maguey Jabalí en los distritos de a) Miahuatlán y b) Cuicatlán en el estado de Oaxaca	7
Figura 3. Proceso de producción de Mezcal.....	8
Figura 4. Levaduras que realizan la fermentación en el proceso de producción de mezcal. Izquierda: Medio de cultivo para el crecimiento de aglomerados de levaduras llamados colonias. Derecha: Colonias de levaduras de diferentes especies aisladas del proceso de producción de mezcal (Kirchmayr et al., 2014).....	14
Figura 5. Estructura de una Saponina esteroidal (Flores, Huamán, & Tomás, 2013)18	
Figura 6. Estructura de sapogeninas de Agave (a) espirostano y (b) furostano (Yang et al., 2006)	19
Figura 7. Estructura química de la diosgenina (Villagómez González, 2018).....	19
Figura 8. Ubicación de la localidad de San Pedro Teozacoalco, Nochixtlán Oaxaca21	
Figura 9. Diluciones seriadas de la muestra.....	22
Figura 10. Extensión en placa	22
Figura 11. Técnica de siembra por estría cruzada en placa	23
Figura 12. Técnica de tinción simple	25
Figura 13. Criterio de coloración para fermentación de carbohidratos: Rojo – Prueba Negativa, Amarillo – Prueba Positiva, Amarillo y Gas – Prueba Positiva y Producción de Gas, Naranja – Prueba Débil.....	27
Figura 14. Distribución de los discos de papel en la placa Petri.....	30
Figura 15. Cepas aisladas de Levaduras en medio sólido Extracto de Levadura-Peptona-Dextrosa (YPD).....	32
Figura 16. Morfología macroscópica de las cepas aisladas de Levadura	33
Figura 17. Morfología microscópica de las cepas aisladas de Levadura.....	34
Figura 18. Cepas aisladas de Levaduras en Agar Rosa de Bengala (ARB).....	35

Figura 19. Cepas aisladas de Levaduras en Agar Cromogénico para Candida (ACC)	36
Figura 20. Crecimiento de la cepa 5 (ITOYIV038) a una concentración de a) 0 $\mu g/mL$ no presenta halo de inhibición y b) 10 $\mu g/mL$ presenta un halo de inhibición de 20 mm.	42
Figura 21. Crecimiento de la cepa 7 (ITOYIV040) a una concentración de a) 0 $\mu g/mL$ no presenta halo de inhibición y b) 1 $\mu g/mL$ presenta un halo de inhibición de 14 mm. .	43
Figura 22. Crecimiento de la cepa 10 (ITOYIV043) a una concentración de a) 0 $\mu g/mL$ no presenta halo de inhibición y b) 1 $\mu g/mL$ presenta un halo de inhibición de 6 mm.	46
Figura 23. Crecimiento de la cepa 7 (ITOYIV040) a una concentración de 0 $\mu g/mL$ no presenta halo de inhibición.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunas especies de Agave “mezcaleros” su manejo y distribución (Aguirre et al., 2005)	6
Tabla 2. Caracterización Macroscópica de las colonias (Castañeda Briones, 2009)	24
Tabla 3. Datos recabados de la muestra	31
Tabla 4. Características macroscópicas de las cepas aisladas de Levadura en medio solido YPD.....	32
Tabla 5. Crecimiento en aislamiento dirigido	37
Tabla 6. Resultados de la fermentación de carbohidratos	37
Tabla 7. Cepas identificadas hasta género y código asignado de acuerdo a la estructura del Laboratorio de Control Ambiental del Instituto Tecnológico de Oaxaca	38
Tabla 8. Tamaño del halo de inhibición (en mm) de los extractos crudos sobre las levaduras.....	39
Tabla 9. Tamaño del halo de inhibición (en mm) de los extractos crudos sobre las levaduras (Repetición)	39
Tabla 10. Análisis de varianza de los halos de inhibición (Extractos crudos sobre las levaduras).....	40
Tabla 11. Tamaño del halo de inhibición (en mm) de la diosgenina sobre las levaduras	43
Tabla 12. Tamaño del halo de inhibición (en mm) de la diosgenina sobre las levaduras (Repetición).....	44
Tabla 13. Análisis de varianza de los halos de inhibición (Diosgenina sobre las levaduras).....	44

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Control de desviación estándar para la concentración de $1\mu g/mL$ de los halos de inhibición de los extractos crudos sobre las levaduras	41
Gráfica 2. Control de desviación estándar para la concentración de $5\mu g/mL$ de los halos de inhibición de los extractos crudos sobre las levaduras	41
Gráfica 3. Control de desviación estándar para la concentración de $10\mu g/mL$ de los halos de inhibición de los extractos crudos sobre las levaduras	42
Gráfica 4. Control de desviación estándar para la concentración de $1\mu g/mL$ de los halos de inhibición de la diosgenina sobre las levaduras	45
Gráfica 5. Control de desviación estándar para la concentración de $5\mu g/mL$ de los halos de inhibición de la diosgenina sobre las levaduras	45
Gráfica 6. Gráfico de control de desviación estándar para la concentración de $10\mu g/mL$ de los halos de inhibición de la diosgenina sobre las levaduras	46

INTRODUCCIÓN

El agave es una planta perenne conocida comúnmente como maguey, posee hojas dispuestas en espiral y arregladas en rosetas en el ápice de un tallo, el cual puede ser corto y apenas sobrepasar unos centímetros del suelo, o bien, ser largo y erecto; en este caso llega a medir hasta tres metros de altura.

Agave convallis denominado “Maguey jabalí” o “Maguey de cuche” es una especie utilizada con poca frecuencia para la producción de mezcal; debido a que es considerado en el rubro de los agaves tóxicos por su alta concentración de esteroides, sin embargo, quizá se deba a esta misma rareza que sea una de las especies más apreciadas y del cual se obtiene un mezcal exótico con un sabor especial (Nogales, 2018).

La palabra mezcal proviene del náhuatl mexcalli “maguey horneado”, es una bebida alcohólica obtenida del mosto fermentado de agave, el cual es extraído de la molienda de las piñas previamente cocidas y sometidas a destilación. Es un producto de origen mexicano que históricamente ha jugado un papel importante en la economía de la población rural de muchas comunidades del país y que, a poco tiempo de haber incursionado en el mercado mundial de las bebidas alcohólicas, ha comenzado a ganar terreno, en base a sus características de calidad y exquisitez logradas a través de un proceso rústico-artesanal (Gallardo Valdez, 2020).

En el mezcal el aroma y sabor es producido por diferentes compuestos de naturaleza química: acetales, ácidos orgánicos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, fenoles y terpenos, siendo los grupos más abundantes en componentes y concentraciones, los alcoholes, ésteres y ácidos orgánicos; compuesto volátiles aromáticos: metanol y alcoholes superiores (tóxicos) regulados por la NOM; compuestos volátiles de concentración baja: ésteres, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, terpenos y furanos.

Los compuestos volátiles deben su origen a dos fuentes: la primera al tipo de especie de Agave y el segundo al proceso de fermentación, condiciones y duración del proceso, así como las cepas que intervienen (Pérez et al., 2013).

El diseño de un bioproceso implica el conocimiento previo del sistema biológico de estudio, determinando y estandarizando factores (medio de cultivo, temperatura, pH, esfuerzo de corte, suplementación de oxígeno, eliminación de CO₂, entre otras) que permitan predecir y controlar la eficiencia del proceso (Navarrete-Bolaños et al., 2007).

La pertinencia de los estudios presentes y futuros, permitirá valorar y reconocer muchas de las acciones y reacciones que son vitales en la manufactura del mezcal, así mismo, el avance científico en esta actividad productiva que ayuda a la sobrevivencia de un gran número de familias en la entidad, fortalecerá la productividad y el ingreso económico de entidades federativas como Oaxaca, lo que además contribuiría a que los productores, sigan conservando y manteniendo a tan generosa actividad que han venido desarrollando por varias generaciones en sus familias.

El Maguey Jabalí es un Agave que necesita al menos 12 años de maduración para poder ser usado en la producción de mezcal, cuyo proceso, algunos clasificarían de complicado. Esto se debe a que, el jabalí suele esponjarse y expandirse, en razón de la gran cantidad de compuestos químicos que produce naturalmente, entre ellos las saponinas, que son las sustancias que tienen los jabones, las cuales muchas veces impiden que se logre la fermentación debido a la gran cantidad de espuma o a que se desborda de las tinajas donde se lleva a cabo la fermentación así mismo en el momento de la destilación puede producir tanta espuma que no se logró condensar el vapor (Nogales, 2018).

Por lo tanto, es necesario conocer el efecto que causan las saponinas que están presentes en esta especie de agave empleada como materia prima para la producción de las bebidas de agave y su interacción con los microorganismos presentes en los procesos de fermentación, con el fin de implementar mejoras en los procesos de producción de dichas bebidas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de las saponinas de *Agave convallis* sobre las levaduras del mezcal

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Aislar, purificar e identificar levaduras de la fermentación de mezcal

Establecer un experimento para determinar la concentración mínima inhibitoria de los extractos crudos sobre las levaduras

Realizar un experimento para determinar la concentración mínima inhibitoria de la diosgenina sobre las levaduras.

CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

1.1 MEZCAL

La palabra Mezcal es el nombre aplicado a la bebida alcohólica destilada producida en muchas áreas rurales de México, tiene su origen en vocablos de la lengua náhuatl, deriva de *mexcalli* que significa Agave horneado, dicha bebida es obtenida por procesos artesanales en su mayoría, así como también por procesos tecnificados.

De acuerdo con la NOM-070-SCFI-2016, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones, el mezcal es una bebida alcohólica destilada mexicana, 100 % de maguey o agave, obtenida por destilación de jugos fermentados con microorganismos espontáneos o cultivados, extraídos de cabezas maduras de magueyes o agaves cocidos, cosechados en el territorio.

Es un líquido de olor y sabor original, incoloro en su estado original, aunque puede tomar coloración si se hace en barricas de madera, por procesos de añejamiento o por adición de otros productos naturales, saborizantes o colorantes.

Es un producto con una amplia variación, ya sea por su sabor o su aroma, estas características están dadas por el tipo de fermentación ya sea espontánea o no, el tipo de Agave, la región donde se produce, etc. Por lo tanto, el proceso de fermentación varía de un estado a otro, debido a que existen diferentes especies de levaduras que se encuentran presentes en el proceso de fermentación, afectando de forma significativa la conversión de azúcares a etanol, además de la variabilidad de los compuestos volátiles presentes (Molina-Guerrero et al., 2007).

El mezcal se ha elaborado desde la época prehispánica, sin embargo, los escritos más antiguos sobre el mezcal son del siglo XVI, siglo en el cual da inicio la industria del mezcal en México, pero no fue hasta la Revolución Mexicana que tuvo su primer impulso.

No obstante, su evolución fue muy lenta, siendo hasta 1994 publicada la producción de mezcal artesanal legal, por lo que todo se elaboraba de manera clandestina antes de esa fecha.

Al contrario, actualmente se ha impulsado fuertemente dicha industria, con la creación de la Norma Oficial Mexicana, La Denominación de Origen, La creación del Consejo Regulador del Mezcal, así como la Cámara Nacional de la Industria del Mezcal son algunos ejemplos de la importancia que se ha dado a este producto (NFR, 2011).

1.2 AGAVE

El Agave también denominado “maguey” es una planta monocotiledónea, sus hojas se muestran en forma de penca y dependiendo de la especie, el borde puede ser lineal, espatulada, lanceolada, deltoide, oblonga u ovada, generalmente son rígidas y en su mayoría con espinas laterales. Su tallo puede ser acaulescente o caulescente. Sus flores son de color amarillo verdoso. Su fruto es capsular leñoso alargado dehiscente y cada capsula contiene numerosas semillas aplanadas y de testa negra (Esparza-Ibarra et al., 2015; Figura 1).

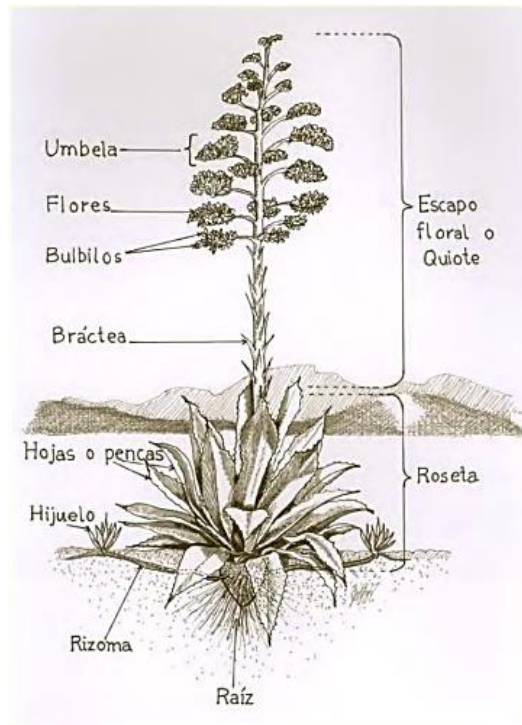


Figura 1. Morfología, composición y estructura de una planta de Agave (Gallardo Valdez, 2020)

El Agave es de gran importancia económica y cultural en México, desde hace siglos los pueblos indígenas y mestizos los han aprovechado como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, cobijo, ornato, fibras duras, textiles, abono, construcción, implementos agrícolas y principalmente en la producción de diferentes tipos de bebidas alcohólicas como el mezcal y el tequila.

Perteneciente a la familia de las Agavaceae el género Agave es endémica del continente americano con un total de 200 especies, de las cuales en México se encuentran el 75% es decir 150 especies; sin embargo, solo 116 son endémicas de nuestro territorio y alrededor de 15 son considerados como “Agaves mezcaleros” (Tabla 1), los cuales se distribuyen en 24 estados de la República Mexicana (Nava-Cruz et al., 2015).

Tabla 1. Algunas especies de Agave “mezcaleros” su manejo y distribución (Aguirre et al., 2005)

Nombre científico	Manejo	Distribución
<i>Agave angustifolia</i>	Se cultiva de manera intensiva en Oaxaca. En sonora, es la materia prima para la bacanora, se basa en poblaciones silvestres y cultivos	Crece en muy variados tipos de vegetación, de sonora hasta Yucatán. Es el maguey de más amplia distribución en México
<i>Agave durangensis</i>	Silvestre	Planicies áridas y sierra madre occidental, en durango y zacatecas
<i>Agave salmiana</i> <i>ssp. crassispina</i>	Silvestre, con manejo; se recuperan y plantan los hijuelos en sus áreas de distribución natural	Matorrales y pastizales de la Meseta Central, en el altiplano Potosino-Zacatecano
<i>Agave tequilana</i>	Exclusivamente cultivado, con base en hijuelos y cultivo in vitro. No existe en condiciones silvestres	En las áreas productoras de tequila: Jalisco, Michoacán, Guanajuato y Tamaulipas
<i>Agave americana</i> <i>var. oaxacensis</i>	Domesticado. La variedad oaxacensis de la especie A. americana se conoce solo asociada al hombre	Oaxaca

Los seres humanos que lo han poblado han sabido aprovechar al máximo los beneficios que producen estas especies; es por ello que los Agaves no solo tienen su máxima expresión de diversidad morfológica, filogenética y evolutiva, sino también cultural (García Mendoza, 2007).

1.2.1 *Agave convallis*

Denominado “Maguey jabalí” el cual muchas personas tienen la creencia de que su nombre se debe a lo puntiagudo de sus hojas, las cuales recuerdan a los colmillos de un jabalí, pero la realidad es completamente diferente. El nombre de Jabalí se debe a que dicho maguey se ocupaba en algunas comunidades del estado de Oaxaca para la extracción de ixtle contenidas en las pecas de este agave para la elaboración de cuerdas, a las cuales se les llama comúnmente como jabalinas.

El maguey Jabalí es endémico del estado de Oaxaca, principalmente de los distritos de Miahuatlán y Cuicatlán (Figura 2); entre otras regiones con clima seco, donde los suelos son delgados y calizos, con una elevación de entre 975 y 1,600 metros sobre el nivel del mar, 300 a 700 milímetros anuales de precipitaciones promedio y con temperaturas mayores a los 18 °C, ya que este espécimen es sensible al frío y no soporta las heladas (Palma et al., 2016).

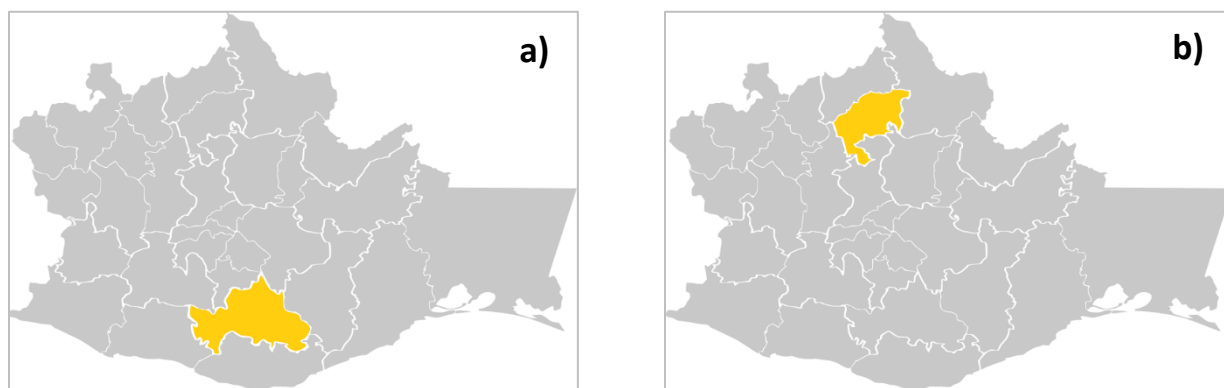


Figura 2. Ubicación del maguey Jabalí en los distritos de a) Miahuatlán y b) Cuicatlán en el estado de Oaxaca

Este agave pertenece al subgrupo littea, contiene una alta cantidad de saponinas, tanta que algunos biólogos decían que era imposible hacer mezcal, pero los maestros mezcaleros han logrado elaborar un mezcal de aromas y sabores complejos que se está convirtiendo en los favoritos de los consumidores (Nogales, 2018).

1.3 PRODUCCIÓN DE MEZCAL

La elaboración del mezcal en el estado de Oaxaca se realiza de manera ancestral debido a que en el procedimiento intervienen una serie de procesos artesanales, en los cuales se utilizan insumos e implementos elaborados de manera rustica (Figura 3).

La etapa más importante del proceso de elaboración del mezcal artesanal en Oaxaca es la fermentación, debido a que en ella se transforman los azúcares del Agave, en etanol, CO₂ y otros compuestos químicos. Dicha transformación se lleva a cabo por un consorcio microbiano integrado sobre todo por levaduras y bacterias (López-Sánchez et al., 2020).



Figura 3. Proceso de producción de Mezcal

1.3.1 Etapas de producción

La producción de mezcal comprende cinco etapas fundamentales, iniciando por la obtención de la materia prima a través del corte o cosecha del Agave, seguido de la cocción de las piñas, posteriormente su molienda, después la fermentación de las fibras junto con los jugos obtenidos y finalmente la destilación.

- **Corte o cosecha**

El proceso de producción del mezcal comienza con la cosecha del Agave maduro, entre los 10 y 25 años en especies grandes y entre 4 y 5 años en las especies pequeñas, en esta etapa las plantas son cortadas de su base y la mayor parte de sus hojas son retiradas por medio del jimado, obteniéndose las piñas de Agave, las cuales son transportadas al proceso de cocción.

- **Cocción**

La cocción del maguey se puede realizar en hornos de subsuelo, hornos verticales de mampostería, hidrolizadores o en autoclaves. Antes de meter las piñas al horno estas se pican con golpes de hacha para facilitar su cocción, mientras que, el horno debe precalentarse. Para lograr la plena cocción, el horneado debe durar aproximadamente tres días, una vez terminada esta fase, el Agave cambia de color blanco a caramelo, lo que indica que los almidones de la piña se han transformado en azúcares.

- **Molienda**

La molienda se puede realizar de distintas formas como son: macerado a mano, machacado en tahona (Pozo de cemento con un poste central y una rueda de piedra que gira por la tracción de una bestia de carga) o por una desgarradora apoyada de una prensa. Una vez terminada la molienda se obtiene el mosto y el bagazo; dicho mosto será bombeado a las tinajas de fermentación.

- **Fermentación**

La fermentación se puede llevar a cabo en tinas de madera, pilas forradas de madera o en tanques de acero inoxidable. En esta etapa se tienen dos elementos fundamentales: el agua y la temperatura; de esta última depende el tiempo que se tome en fermentar, que usualmente va de 3 a 5 días. Tiempo en el cual se logra convertir los azúcares de los mostos en alcohol. Al jugo fermentado se le conoce como mosto muerto cuya graduación alcohólica esta entre 6 y 7%.

- **Destilación**

Finalmente, para la destilación se pueden utilizar ollas de barro, alambiques de cobre o alambiques de acero inoxidable. En esta operación se lleva a cabo la separación del alcohol, aprovechando sus diferentes puntos de ebullición, para ello la mezcla se calienta en el alambique, se evapora y condensa lentamente a través de un serpentín, el cual deposita su contenido en un recipiente, al producto obtenido se le conoce como mezcal de primera destilación, blanco o joven (Pérez et al., 2016).

1.3.2 Tipos de mezcal

La NOM-070-SCFI-1994 considera dos tipos de mezcal, de acuerdo al porcentaje de carbohidratos provenientes del agave utilizado en su elaboración.

- **Tipo I. Mezcal 100% Agave**

Producto obtenido de la destilación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares de las cabezas maduras de los agaves, que fueron previamente cocidos y sometidos a una fermentación alcohólica con levaduras las cuales pueden ser cultivadas o no. Este tipo de mezcal puede ser joven, reposado o añejo y susceptible de ser abocado.

- **Tipo II. Mezcal**

Producto obtenido de la destilación de mostos en cuya formulación se adiciona hasta un 20% de otros carbohidratos permitidos por las disposiciones legales correspondientes.

1.3.3 Categorías del mezcal

De acuerdo con la NOM-070-SCFI-1994 las características adquiridas en procesos posteriores a la destilación, el mezcal se clasifica en 3 categorías

- **Mezcal añejo o añejado**

Producto capaz de ser abocado, sometido a un proceso de maduración de por lo menos 1 año, en recipientes de madera de roble blanco o encino.

- **Mezcal joven**

Producto obtenido de la destilación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares de las cabezas maduras de los agaves, que fueron previamente cocidos y sometidos a una fermentación alcohólica con levaduras las cuales pueden ser cultivadas o no.

- **Mezcal reposado**

Producto capaz de ser abocado, que se deja por lo menos 2 meses en recipientes de madera de roble blanco o encino para su estabilización.

1.3.4 Método artesanal

La tipología de la producción de Mezcal en el estado de Oaxaca es muy distinta y variada (Palma et al., 2016); sin embargo, es importante centrarse en la producción de tipo artesanal en donde la fermentación se realiza en tinas de madera con la ayuda de la microflora presente en la pina de maguey cocido, el agua o el medio circundante.

La fermentación se presenta por acción espontánea, en ella participan una gran variedad de microorganismos que poseen diferentes características y capacidades para realizar la fermentación de los mostos de agave cocido.

Las bebidas destiladas mexicanas involucran un proceso de fermentación muy complejo en el que intervienen bacterias (ácido lácticas y ácido acéticas) y levaduras (*Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*) (Lappe et al., 2008).

En el estado de Oaxaca coexisten diferentes especies de agave, sin embargo, el *Agave convallis*

es una especie utilizada con poca frecuencia para la producción de mezcal; cuyo proceso, algunos clasificarían de complicado. Esto debido a que dicho maguey suele esponjarse y expandirse, a causa de la cantidad de saponinas que produce, las cuales impiden muchas veces que se logre la fermentación debido a la gran cantidad de espuma o a que se desborda de las tinas donde se lleva a cabo la fermentación, del mismo modo en la destilación puede producir tanta espuma que no se logró condensar el vapor (Nogales, 2018).

1.4 PARÁMETROS Y CONDICIONES EN LA FERMENTACIÓN

En el proceso de elaboración del mezcal, una etapa fundamental para obtener un producto de calidad y estandarizado es la fermentación. En esta etapa se realiza el cambio bioquímico de los azúcares reductores provenientes del Agave en alcohol (principalmente etanol) y compuestos volátiles. Como en todos los procesos de producción de bebidas alcohólicas, existen variables del proceso que influyen en la productividad y calidad de las bebidas.

En el caso de la fermentación, la levadura, el contenido de azúcares, el método utilizado y otros componentes adicionados al mosto son variables que influyen en la productividad y características organolépticas finales de la bebida, ya que se produce etanol y otros compuestos, que definen directamente las principales características del mezcal (De León et al., 2008).

1.4.1 Microorganismos

El uso de microorganismos para transformar los azúcares en etanol, es un proceso factible de realizar. Tradicionalmente las levaduras son los principales microorganismos usados en la producción de alcohol y están ampliamente distribuidos en la naturaleza.

Existen numerosos estudios basados en la identificación de las dinámicas poblacionales responsables de estas fermentaciones, las cuales se ha traducido en un menor rendimiento y calidad sensorial, debido a las variaciones en el proceso de producción entre cada lote, ocasionado por la presencia de varias especies de microorganismos en el mosto como las levaduras y los hongos, así como de bacterias de diversos géneros, las cuales compiten por el consumo de los azúcares del medio, transformándolos en una gran variedad de compuestos orgánicos que generan una disminución en la producción de etanol ocasionando un destilado de baja calidad (Lappe et al.,2008).

1.4.2 Levaduras

Las levaduras han sido utilizadas, desde la antigüedad, en la elaboración de cervezas, pan y vino. Se conocen cepas diferentes y específicas para cada labor (panificación, destilería, producción, extractos de levadura y uso en animales) (Suárez Machín et al., 2016).

Las cepas de levaduras convencionales y no convencionales poseen la capacidad de producir etanol bajo distintas condiciones operativas y nutricionales durante la fermentación, mostrando distintos rendimientos en la producción de biomasa y etanol.

La fermentación del mosto es un proceso bioquímico complejo, en el que intervienen e interaccionan levaduras, bacterias y otros microorganismos. En el proceso de producción de mezcal se destacan las levaduras como las mayores responsables de la fermentación alcohólica, la principal reacción en la conversión de los azúcares del mosto en alcohol (Torija, 2002).

Para lograr una alta eficiencia durante la fermentación alcohólica es necesario realizar una previa selección de los microorganismos, quienes deben cumplir con los siguientes requisitos: alto rendimiento de etanol relacionado con la unidad de sustrato, gran capacidad de fermentación, tolerancia a altas concentraciones de etanol, tolerancia para bajos valores de pH, mínimos requerimientos de oxígeno, alta estabilidad bajo diferentes condiciones de fermentación, la utilización de una amplia gama de sustratos fermentables, entre otros (Téllez-Mora et al., 2012).

La actividad killer, es la capacidad de liberar toxinas que matan a otros microorganismos presente en el medio, es una característica deseable para algunos autores, ya que da una ventaja durante la producción de etanol. Una forma de observar las levaduras a simple vista es utilizando medios de cultivos para que las levaduras formen colonias que se puedan observar a simple vista, en la figura 4 se muestra una imagen con varias colonias de levaduras, las cuales presentan una forma y color distinto entre ellas. Es por ello, que se aíslan levaduras de diversas fuentes naturales, para evaluar su capacidad fermentativa, tolerancia al alcohol y presión osmótica.

Saccharomyces cerevisiae es una levadura que constituye el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad. Es una levadura heterótrofa, que obtiene la energía a partir de la glucosa y tiene una elevada capacidad fermentativa y puede aislarse con facilidad en plantas y tierra, así como del tracto gastrointestinal.



Figura 4. Levaduras que realizan la fermentación en el proceso de producción de mezcal. Izquierda: Medio de cultivo para el crecimiento de aglomerados de levaduras llamados colonias. Derecha: Colonias de levaduras de diferentes especies aisladas del proceso de producción de mezcal (Kirchmayr et al., 2014).

El uso más extendido está enmarcado en la panificación y en las industrias de fabricación de cerveza, vinos y alcohol (Suárez Machín et al., 2016).

Puede fermentar a temperaturas comprendidas entre 5 y 40 °C, aunque el óptimo se encuentra entre 25 y 30 °C y el tiempo de duplicación celular es alrededor de 120 min (Muruaga et al., 2012). Estas características hacen de esta levadura un microorganismo muy atractivo para su uso industrial. El desarrollo de *S. cerevisiae* en condiciones de baja presión de oxígeno genera, además de etanol, dióxido de carbono, glicerol y biomasa como los subproductos más importantes.

Durante la fermentación de bebidas alcohólicas intervienen principalmente levaduras del género *Saccharomyces*. Sin embargo, existen otros géneros de levaduras que también participan en los procesos fermentativos, y rara vez son tomados en cuenta, estas son las levaduras denominadas *no-Saccharomyces* (Escalante et al., 2012).

Algunas de las características de mayor relevancia en cualquier tipo de fermentación son el aroma y sabor, que estarán estrictamente relacionados con la materia prima a fermentar, y las especies de levaduras que realizan la fermentación. A los compuestos químicos relacionados con el sabor y aroma de la bebida se les denomina congenéricos y tienen la peculiaridad de encontrarse en muy bajas concentraciones, comparados con el etanol producido.

Por lo tanto, las levaduras *no-Saccharomyces* también son importantes en la fermentación ya que mediante la producción de congenéricos, enzimas y proteínas pueden enriquecer organoléptica y nutricionalmente las bebidas alcohólicas (Casas Acevedo et al., 2015).

De las especies *Saccharomyces*, Pérez y colaboradores en 2013 realizaron una fermentación alcohólica utilizando jugo de *Agave cupreata* y levaduras; *Kluyveromyces marxianus* presentó la mayor producción de etanol (12.46% v/v), obteniendo en el producto destilado (mezcal) al etanol, metanol, alcohol isoamílico, alcohol isobutílico y ácido acético, mediante cromatografía de gases, cuantificando el metanol y etanol de 1.89 y 46.75%, respectivamente.

Aminahue y colaboradores en 2018 aislaron del lactosuero cepas de *Kluyveromyces marxianus* tolerantes a factores de estrés del proceso de fermentación para la obtención de etanol y obtener biomasa para la producción del mismo. Analizaron 11 muestras de lactosuero, las cuales fueron enriquecidas con cloranfenicol para inhibir el crecimiento bacteriano, seleccionaron las levaduras fermentadoras de lactosa.

1.4.3 pH

El efecto de pH en una fermentación es realmente importante no solo en relación con el desarrollo de la levadura si no con la tasa de fermentación y con la formación de subproductos.

En estudios realizados con cepas aisladas de ponches azucarados, se encontró que la máxima producción de alcohol se obtiene a pH 4.25 y la menor a pH 3.7, probablemente porque este último es demasiado bajo para lograr una activación eficiente de las enzimas necesarias para la fermentación y el intercambio iónico al interior de la célula sufre un descontrol tal, que esta, concentra su energía en regular su sistema y no en fermentar el azúcar presente en el sustrato (Pramanik, 2003).

1.4.4 Temperatura

La tolerancia a temperaturas altas es una característica deseada en las levaduras utilizadas en los países tropicales, donde en algunas temporadas la temperatura supera los valores óptimos de crecimiento de los microorganismos mesófilos.

El uso de levaduras termotolerantes u otros organismos termófilos permite abaratar el proceso, ya que se evita el uso de sistemas de enfriamiento costosos. Además, evita las paradas debido al sobrecalentamiento, reduce la posibilidad de infección de los medios y minimiza los volúmenes de aguas residuales generados en las destilerías (Fernández et al., 2008).

Los organismos adaptados al frío pueden crecer incluso en temperaturas inferiores a los 0 °C y se clasifican como psicrófilos si su temperatura óptima máxima de crecimiento es 20 °C, y se denominan psicrotolerantes cuando los organismos tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 20 y 40 °C, pero son capaces de seguir creciendo en temperaturas cercanas a 0 °C (Madigan et al., 2004).

1.5 SAPONINAS

Las saponinas son compuestos glucosídicos de alto peso molecular, que contienen un esqueleto triterpénico o esteroideal, son utilizados por las plantas como mecanismo de defensa contra el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias. Su presencia ha sido reportada en más de 100 familias de plantas (Oleszek & Bialy, 2006).

Su estructura consta de una parte glucídica que pueden ser cadenas de arabinosa, galactosa, glucosa, ramnosa y xilosa, y una parte no glucídica denominada sapogenina o aglicona, la cual se puede clasificar entre saponinas triterpénicas o saponinas esteroidales (Figura 5). Las saponinas esteroidales se encuentran principalmente en las plantas monocotiledóneas, las cuales pertenecen a los géneros Agavaceae, Dioscoreaceae y Liliaceae (Martínez Martínez, 2001).

En la antigüedad las saponinas se utilizaban como detergentes debido a su naturaleza anfífilica con la presencia de una sapogenina liposoluble y cadenas de azúcares solubles en agua. Sin embargo, las saponinas poseen un amplio rango de actividad bioactiva, como lo es su actividad hemolítica, anticáncer, antitumoral, antimicrobial, fungicida, antiviral, antilevaduras, alelopática, insecticida, y molusquicida. Por lo tanto, no solo limitó su uso tradicional, sino que comenzó a buscar aplicaciones en la industria farmacéutica (Francis et al., 2002).

La concentración de saponinas se ve afectada por la especie de planta, el origen genético, así como también de los factores ambiental y agronómico (Guclu & Mazza, 2007).

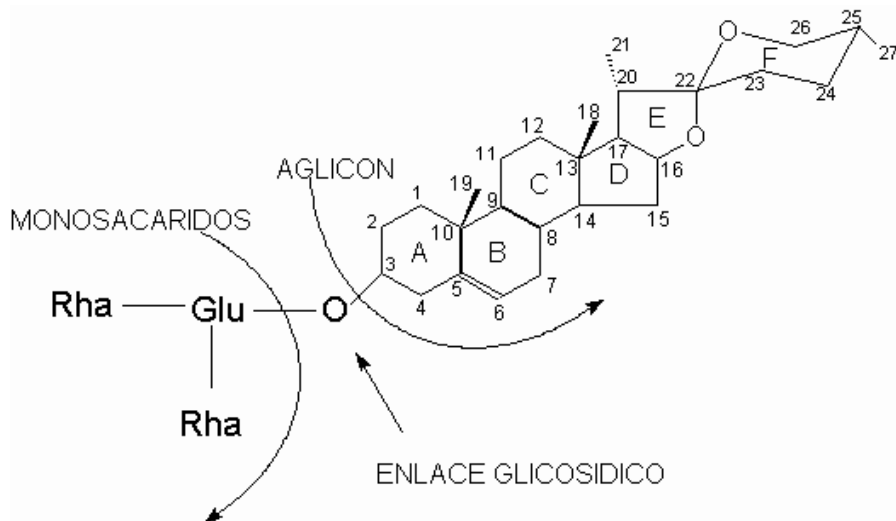


Figura 5. Estructura de una Saponina esteroideal (Flores, Huamán, & Tomás, 2013)

Es por eso que el ginseng es la planta que más ha sido estudiada en su caracterización y aislamiento de saponinas, ya que presenta diversas actividades biológicas. Sin embargo, las saponinas también se han encontrado en plantas como la alfalfa, la soya, los espárragos, el tomate y en algunos cereales como la avena (Wu et al., 2001).

Su distribución se ha encontrado en diferentes partes de las plantas; como son las raíces y/o las semillas; en el Agave la concentración más alta de saponinas se localiza en la hoja (Cheok et al., 2014).

1.5.1 Saponinas de Agave

Las saponinas esteroidales se dividen según su estructura en saponinas esteroidales de tipo espirostando o furostando. La estructura de las saponinas esteroidales espirostando consta de 27 carbonos, comprimidos por una estructura de seis anillos, mientras que las saponinas esteroidales furostando presentan en la posición 26 un enlace glicosilado y su estructura permanece pentacíclica (Yang et al., 2006; Figura 6).

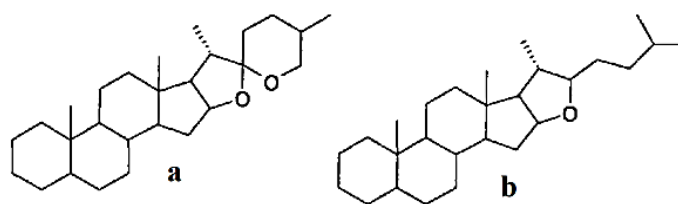


Figura 6. Estructura de sapogeninas de Agave (a) espirostano y (b) furostano (Yang et al., 2006)

1.5.2 Diosgenina

La diosgenina es una saponina esteroidal que se encuentra de manera natural en una gran variedad de plantas como son magueyes (genero *Agave*), izotes (genero *yuca*) y palma samandoca (*yucca carnerosana*) (Tomlinson & Akerele, 2015).

La diosgenina es una saponina esteroidal derivada de un esqueleto hexacíclico de 27 carbonos, con una cadena lateral de espiroacetal unida a los carbonos 16 y 17 del esteroide, con un doble enlace entre los carbonos 5 y 6 y el grupo hidroxilo en la tercera posición. Las cadenas de espiroacetal constan de un anillo de cinco miembros (E) y un anillo de seis miembros (F), ambos heterocíclicos. Los compuestos con un anillo F abierto se denominan como furostanos (Villagómez González, 2018; Figura 7).

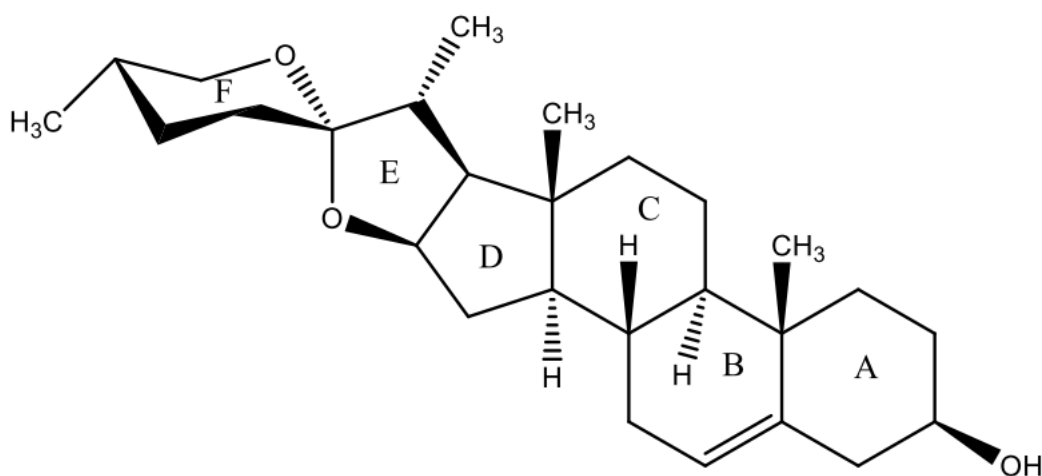


Figura 7. Estructura química de la diosgenina (Villagómez González, 2018)

1.6 PRUEBAS DE VALORACIÓN DE EXTRACTOS

Es fundamental saber las concentraciones a las que los metabolitos pueden ejercer eficazmente su actividad biológica sin suponer un riesgo para la salud. Para ello se llevan a cabo distintos estudios para determinar las dosis más factibles y seguras para ser usadas (Jie-Lun et al., 2012).

Existen diversas pruebas pero estas dependerán del tipo de ensayo que se vaya a efectuar; las más comunes son: Concentración Mínima Inhibitoria, Concentración Mínima Bactericida, Prueba de Viabilidad Celular y Susceptibilidad Antimicrobiana (Saravana et al., 2014).

1.6.1 Concentración Mínima Inhibitoria

La Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) es la concentración más baja (en $\frac{\mu g}{mL}$) de un fármaco antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo tras una incubación de 18-24 horas.

Las MIC se pueden determinar a través de diferentes pruebas; las más utilizadas son el método de dilución en caldo después de aislar un cultivo puro y el Antibiograma disco-placa que consiste en discos de papel secante impregnados del fármaco antimicrobiano y colocados sobre la superficie del medio en una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo. Después de la incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición con la cual se realiza la lectura de la CMI de forma indirecta mediante la correlación entre el diámetro del halo de inhibición y el valor de la CMI (Kirby et al., 1966).

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA

2.1 MUESTREO

Se realizó un muestreo de *Agave convallis*, siguiendo las reglas taxonómicas de identificación y considerando que sean plantas con estado de Madurez Fisiológico Pleno (MFP). *A. convallis* fue colectado en la localidad de San Pedro Teozacoalco, Nochixtlán Oaxaca, ubicado en las siguientes coordenadas, 17° 01' latitud norte y 97° 17' de longitud oeste, a una altura de 1590 msnm (Figura 8).

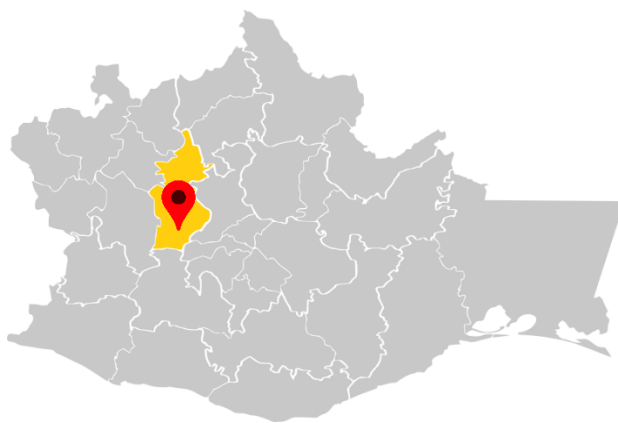


Figura 8. Ubicación de la localidad de San Pedro Teozacoalco, Nochixtlán Oaxaca

2.2 AISLAMIENTO

Se procedió a inocular las muestras por extensión de placa, este procedimiento consistió inicialmente en hacer diluciones con el jugo del mosto de la muestra.

Para las diluciones se utilizaron 6 tubos de vidrio, se le colocó a cada tubo estéril 9 mL de agua peptonada al 1%, con una pipeta estéril se tomó 1 mL de muestra original y se transfirió al primero de los tubos, se marcó el tubo como 1×10^{-1} . Luego se agitó bien el tubo con la primera dilución y con una nueva pipeta estéril, se transfirió 1 mL de esa primera disolución al segundo tubo, marcándolo como 1×10^{-2} ; y así se repitió con los 4 tubos restantes (Sanz Cervera, 2011; Figura 9).

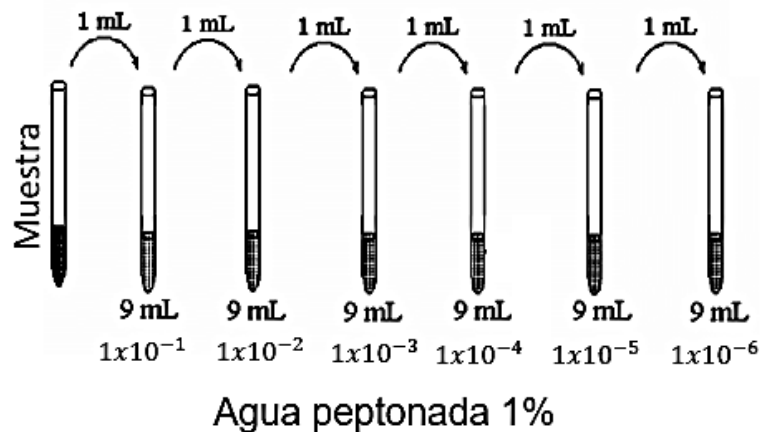


Figura 9. Diluciones seriadas de la muestra

Posteriormente se realizó la extensión en placa utilizando el medio sólido Extracto de Levadura-Peptona-Dextrosa (YPD), se transfirió con una pipeta estéril 50 μ L de cada dilución a una serie de placas de Petri marcadas previamente con el factor de dilución correspondiente. Para esta operación se empleó solo una pipeta y se comenzó por la placa de factor más alto (la más diluida). En seguida con un asa de Digralsky se procedió a extender la dilución 10 veces hacia la derecha y otras 10 hacia la izquierda (Figura 10). Después se realizó la incubación a una temperatura de 30 ± 2 °C durante 48 horas en posición invertida (Sanz Cervera, 2011).

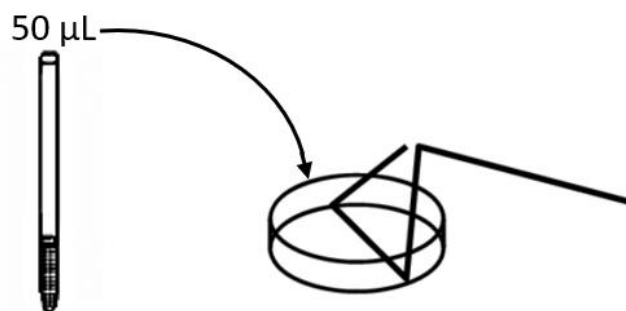


Figura 10. Extensión en placa

Finalmente, después del periodo de incubación, se examinaron las placas y se realizó la selección visual de colonias que presentaban características distintas entre ellas como su borde, color, consistencia, elevación, opacidad y tamaño.

2.3 PURIFICACIÓN

Para obtener cultivos puros de las cepas a caracterizar se utilizó la técnica de siembra por estría cruzada en placa, como se muestra en la figura 11. Para ello se procedió con los siguientes pasos:

1. Se esterilizo el asa en la flama del mechero
2. Se enfrió el asa en un extremo de la placa
3. Se tomo la muestra con el asa
4. Se estrió la superficie del medio, teniendo cuidado de no romper el agar
5. Se volvió a esterilizar el asa y se dejó enfriar
6. Se estrió el segundo sector, cruzando tres de las estrías con el primer sector para arrastrar microorganismos
7. Se estrió el tercer y cuarto sector de forma similar al segundo
8. Se realizó la incubación a una temperatura de 30 ± 2 °C durante 48 horas en posición invertida

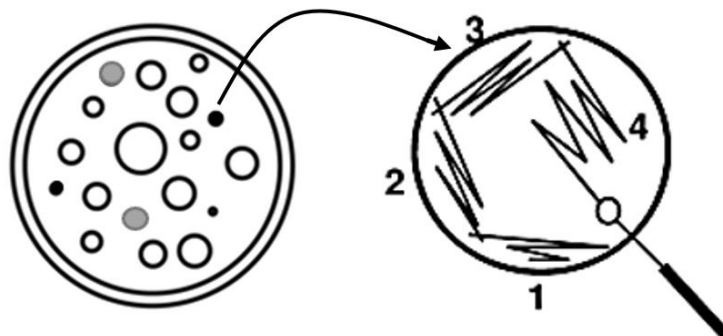


Figura 11. Técnica de siembra por estría cruzada en placa

2.4 CARACTERIZACIÓN

Para obtener las características de las levaduras, primero se aisló en cultivo puro cada una de las colonias y se observó sus características macroscópicas a simple vista; mientras que para observar las características microscópicas se realizó mediante observación al microscopio.

2.4.1 Observación macroscópica

Para la observación macroscópica se utilizó la terminología mencionada por Castañeda Briones, 2009.

Tabla 2. Caracterización Macroscópica de las colonias (Castañeda Briones, 2009)

CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA	
FORMA	Puntiforme, Circular, Irregular, Alargada, Filamentosa, Rizoide, etc.
TAMAÑO	Estimar el diámetro en mm.
SUPERFICIE	Lisa, Rugosa, Cerebrifonne, En Anillos Concéntricos, etc.
ELEVACIÓN	Aplanada, Elevada, Pulvinada, Convexa, Umbonada, etc.
BORDE	Entero o Continuo, Ondulado, Lobulado, Festoneado, Filamentoso, etc.
ESTRUCTURA INTERNA	Amorfa o Granulosa.
COLOR	Según sea observado por la luz reflejada o por la luz transmitida, puede ser de color blanco, amarillo, rojo ladrillo, anaranjado, etc.
OPACIDAD	Transparente, Mate, etc.
CONSISTENCIA	Seca, Viscosa, Membranosa, Gelatinosa, Cremosa, etc. Usar el asa bacteriológica para determinar la consistencia.

2.4.2 Observación microscópica

Para la observación microscópica se utilizó la técnica de tinción simple, como se muestra en la figura 12. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

1. Se preparo un frotis de levaduras utilizando 1 gota de solución salina sobre el portaobjetos
2. Con un asa estéril se tomó un poco de la muestra y se mezcló con la solución salina
3. Se extendió la muestra en forma uniforme
4. Se dejo secar al aire y posteriormente se fijó con calor
5. Se cubrió el frotis con abundante azul de metileno, esto se realizó encima del fregadero. Se dejo actuar durante 1 minuto
6. Se lavo con abundante agua destilada para quitar el exceso de colorante
7. Se dejo secar el portaobjetos al aire para eliminar el exceso de agua
8. Una vez seco se le agrego 1 gota de aceite de inmersión y se centró la preparación sobre la platina del microscopio, se ajustó la iluminación y se enfocó con el objetivo de 40X.

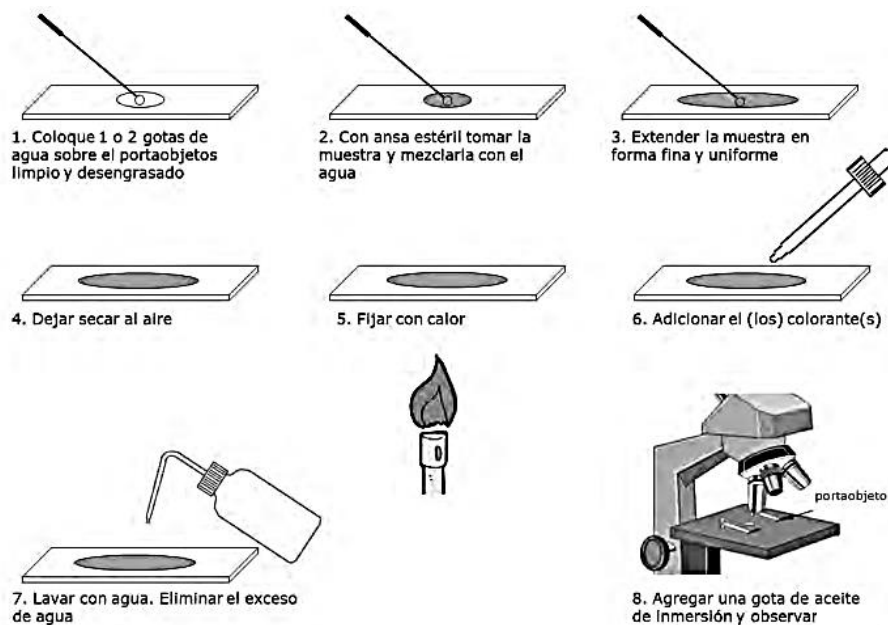


Figura 12. Técnica de tinción simple

2.5 AISLAMIENTO DIRIGIDO

Para el aislamiento dirigido se utilizaron dos medios distintos:

- Agar Rosa de Bengala + Cloranfenicol

Se aplicó la técnica de siembra por estría cruzada en placa, utilizando el medio Agar Rosa de Bengala + Cloranfenicol y se procedió a incubar a una temperatura de 30 ± 2 °C durante 7 días en posición invertida.

El Agar Rosa de Bengala es un medio neutral selectivo recomendado para la enumeración de hongos y levaduras. Es un agente selectivo que inhibe el crecimiento de bacterias y limita el tamaño y la altura de los hongos de crecimiento rápido, lo que permite el crecimiento e identificación de otras levaduras de crecimiento más lento; mientras que el cloranfenicol se utiliza como agente selectivo que inhibe el crecimiento de bacterias (Condalab, 2019).

- Medio Cromogénico

Se aplicó la técnica de siembra por estría cruzada en placa, utilizando el medio Cromogénico y se procedió a incubar a una temperatura de 32 ± 2 °C durante 48 horas en posición invertida.

El Agar Cromogénico para Candida es un medio Cromogénico diferencial y selectivo para el aislamiento e identificación de especies de Candida (MCD LAB, s.f.).

2.6 TÉCNICA DE FERMENTACIÓN DE AZÚCARES

Para la fermentación se utilizaron los siguientes carbohidratos estériles al 1%: Xilosa, Galactosa, Sacarosa, Manosa y Lactosa.

Primeramente, se colocó 4 ml de Caldo Base Rojo de Fenol con pH de 7.4 a 140 tubos de ensaye con tapa de rosca y se le agregó una campana Durham boca-abajo a cada uno, posteriormente se esterilizó cerrando en un 70% los tubos de ensaye.

Para la preparación de los azúcares se pesó 2.8 gramos de la azúcar a utilizar y se disolvió en 280 mL de agua destilada previamente esterilizada para 28 tubos de ensaye (Original y duplicado). Enseguida con una jeringa estéril se succiono el azúcar preparado y se colocó 1 ml en cada tubo de ensaye con Caldo Base Rojo de Fenol (Solo un carbohidrato a la vez), pasando por los filtros millipore, los cuales fueron esterilizados.

Para inocular los tubos con el organismo de prueba se tomó con un asa de platino la carga microbiana del cultivo fresco y se homogenizo con el Caldo Base Rojo de Fenol, dejando un tubo de ensaye como testigo. Finalmente se incubo a 35 ± 2 °C por 48 horas.

Después de haber inoculado el caldo con la carga microbiana y haber incubado por 48h se observaron los cambios de color (Figura 13) y se interpretaron los resultados en base a lo siguiente:

- **PRUEBA NEGATIVA PARA PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS**
Si no hay fermentación el caldo tiene una coloración rojiza.
- **PRUEBA POSITIVA PARA PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS**
Si hay fermentación del carbohidrato el caldo tornara de color amarillo.
- **PRUEBA POSITIVA PARA PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS Y PRODUCCIÓN DE GAS**
Si hay fermentación del carbohidrato el caldo tornara de color amarillo y si hay producción de gas se observara en forma de burbujas en la campana Durham.
- **PRUEBA DÉBIL PARA PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS**
Si hay una fermentación débil del carbohidrato el caldo tornara de color naranja.



Figura 13. Criterio de coloración para fermentación de carbohidratos: Rojo – Prueba Negativa, Amarillo – Prueba Positiva, Amarillo y Gas – Prueba Positiva y Producción de Gas, Naranja – Prueba Débil.

2.7 CONSERVACIÓN DE CEPAS

Para la conservación de las cepas de levadura se empleó el método de Ocares & Castro 2020, este método consistió en cuatro etapas detalladas a continuación:

1. Primeramente, se verificó que las placas Petri que contenían el cultivo microbiano no estuvieran quebradas, después se revisó la carga microbiana y se observó bajo la lupa estereoscópica para determinar que el organismo estuviera puro y finalmente se asignó un numero correlativo de acuerdo al código del Laboratorio de Control Ambiental del Instituto Tecnológico de Oaxaca de la siguiente manera:
 - 1) Institución (ITO)
 - 2) Clasificación (Y – Levaduras, L – Bacterias Ácido Lácticas, A – Bacterias Ácido Acéticas)
 - 3) Palenque de procedencia (I – San Dionisio Ocotepec, II – San Pablo Etla, III – Río Las Palmas, IV – San Pedro Teozacoalco, V – San Luis Amatlán Miahuatlán, VI –Tapanala Yautepec)
 - 4) Numeración
2. Se realizo un subcultivo del microorganismo utilizando el medio sólido Extracto de Levadura-Peptona-Dextrosa (YPD) y bajo condiciones de esterilidad. Con un asa de 10 µL se extrajo una colonia aislada y se utilizó la técnica de siembra por estría cruzada en placa. Luego de realizar la inoculación, se incubo a una temperatura de 30 ± 2 °C durante 48 horas en posición invertida.
3. El cultivo microbiano que se obtuvo fue utilizado para realizar las copias de seguridad, se utilizaron 39 tubos eppendorf previamente esterilizados, correspondientes a 13 copias de seguridad y sus 2 duplicados de cada cepa. Se utilizó un asa de 10 µL para retirar la colonia aislada de la placa Petri y se depositó en un tubo eppendorf de 2 mL de capacidad con 1 mL de glicerol estéril al 10% en su interior.

Cada tubo eppendorf se etiqueto con el numero correlativo que se le asigno en el punto 1 y posteriormente se almacenaron en un sistema de frio a -20°C.

4. Transcurridas 48 horas de la preservación se retiró del sistema de frío una serie de los duplicados y se utilizó como prueba de viabilidad, la cual sirvió para verificar si el microorganismo representaba un cultivo puro y viable postratamiento de preservación.

2.8 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

Para determinar la concentración mínima inhibitoria se empleó el método de Kirby – Bauer y colaboradores 1966 con pequeñas modificaciones, este método consistió primeramente en determinar aquellos aislamientos equivalentes entre 1×10^6 y $5 \times 10^6 \frac{UFC}{mL}$.

A partir de esos cultivos en Agar YPD, se realizó la suspensión de los microorganismos en solución salina al 0.85% y con turbidez de 0.5 McFarland, posteriormente se prepararon 104 placas de Petri (52 placas para el experimento con extractos crudos y 52 para el experimento con diosgenina pura), con agar Müller-Hinton, suplementado con 2% de glucosa y azul de metileno.

Para la preparación de los discos de papel se utilizaron 4 concentraciones distintas, por lo tanto, se pesó el equivalente a 0 µg, 52 µg, 260 µg y 520 µg del antibiótico a utilizar (Extractos crudos o diosgenina pura); para el caso de la diosgenina pura se disolvió en 52 mL de agua destilada estéril cada uno. Cada disco de papel Whatman N° 1 estéril, de 7.25 mm de diámetro, se cargó con 1 ml de la solución para las diferentes concentraciones.

Después, se realizó una siembra de la suspensión de microorganismos con asa de Digralsky en la placa de agar Müller-Hinton y se dejó secar durante 10 a 15 minutos. Una vez que se inóculo el microorganismo con ayuda de unas pinzas metálicas esterilizadas se depositaron suavemente 4 discos impregnados de antibiótico en la placa como se muestra en la figura 14, se dejó incubar a 36 ± 2 °C por 24 horas.



Figura 14. Distribución de los discos de papel en la placa Petri

Finalmente, se observó o no, la inhibición alrededor del disco impregnado de antibiótico y posteriormente se midió con una regla el diámetro de la zona de inhibición, en mm. El diámetro del halo de inhibición se utilizó como indicativo de la sensibilidad o la resistencia a cada antibiótico.

Este paso del procedimiento se realizó con una repetición para cada experimento (con extractos crudos y con diosgenina pura) como estimador de la precisión experimental en el análisis.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

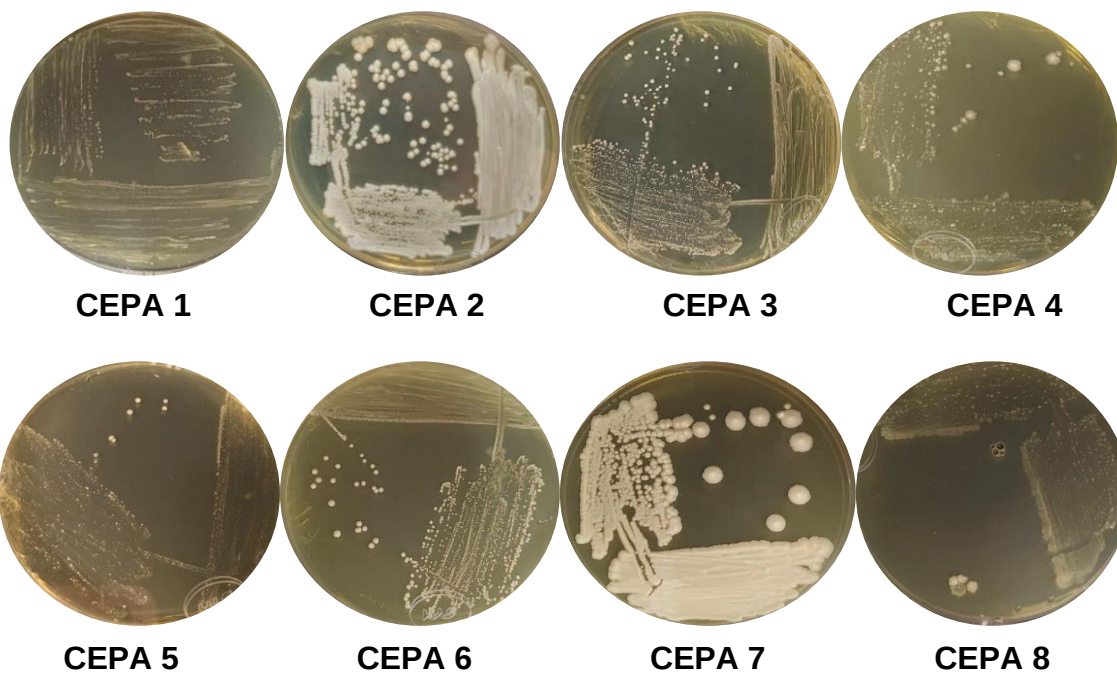
3.1 DATOS DE LA MUESTRA

Tabla 3. Datos recabados de la muestra

MOSTO DE AGAVE CONVALLIS	
LUGAR	San Pedro Teozacoalco
DÍAS DE FERMENTACIÓN	4
pH	3.7
°BRIX	4.5
TEMPERATURA	23°C

3.2 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN

Se aislaron y purificaron en medio sólido Extracto de Levadura-Peptona-Dextrosa (YPD), 13 cepas de levaduras (Figura 15), por medio de una selección visual de colonias que presentaban características distintas entre ellas su borde, color, consistencia, elevación, opacidad y tamaño. Se incubaron a una temperatura de 30 ± 2 °C durante 48 horas.



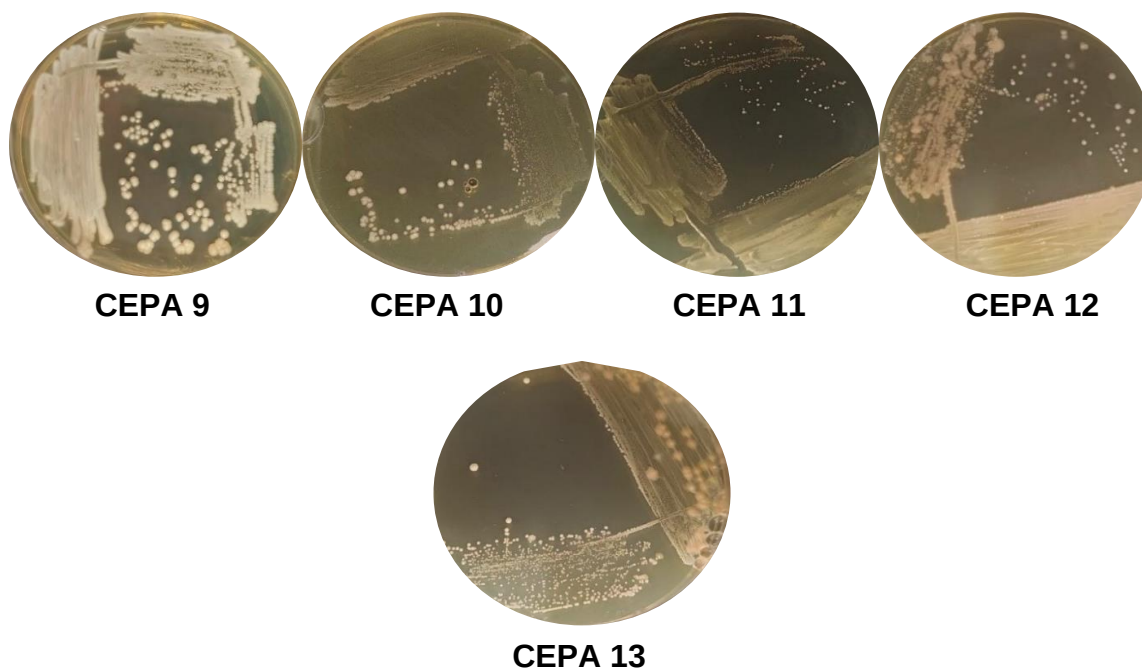


Figura 15. Cepas aisladas de Levaduras en medio sólido Extracto de Levadura-Peptona-Dextrosa (YPD)

3.3 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

Tabla 4. Características macroscópicas de las cepas aisladas de Levadura en medio solido YPD

CEPA	FORMA	SUPERFICIE	ELEVACIÓN	BORDE	COLOR	OPACIDAD	CONSISTENCIA
1	Puntiforme	Lisa	Plana	Entero	Crema	Mate	Seca
2	Circular	Lisa	Convexa	Entero	Blanco	Mate	Cremosa
3	Circular	Lisa	Convexa	Entero	Blanco	Brillosa	Cremosa
4	Irregular	Rugosa	Plana	Ondulado	Crema	Mate	Seca
5	Circular	Rugosa	Elevada	Entero	Blanco	Mate	Cremosa
6	Circular	Lisa	Convexa	Entero	Crema	Brillosa	Cremosa
7	Irregular	Rugosa	Convexa	Ondulado	Blanco	Mate	Cremosa
8	Puntiforme	Lisa	Plana	Ondulado	Crema	Mate	Seca
9	Irregular	Rugosa	Elevada	Ondulado	Blanco	Mate	Cremosa
10	Circular	Lisa	Elevada	Entero	Crema	Mate	Cremosa
11	Circular	Lisa	Convexa	Entero	Blanco	Mate	Seca
12	Circular	Rugosa	Convexa	Entero	Crema	Mate	Cremosa
13	Irregular	Rugosa	Elevada	Ondulado	Crema	Mate	Cremosa

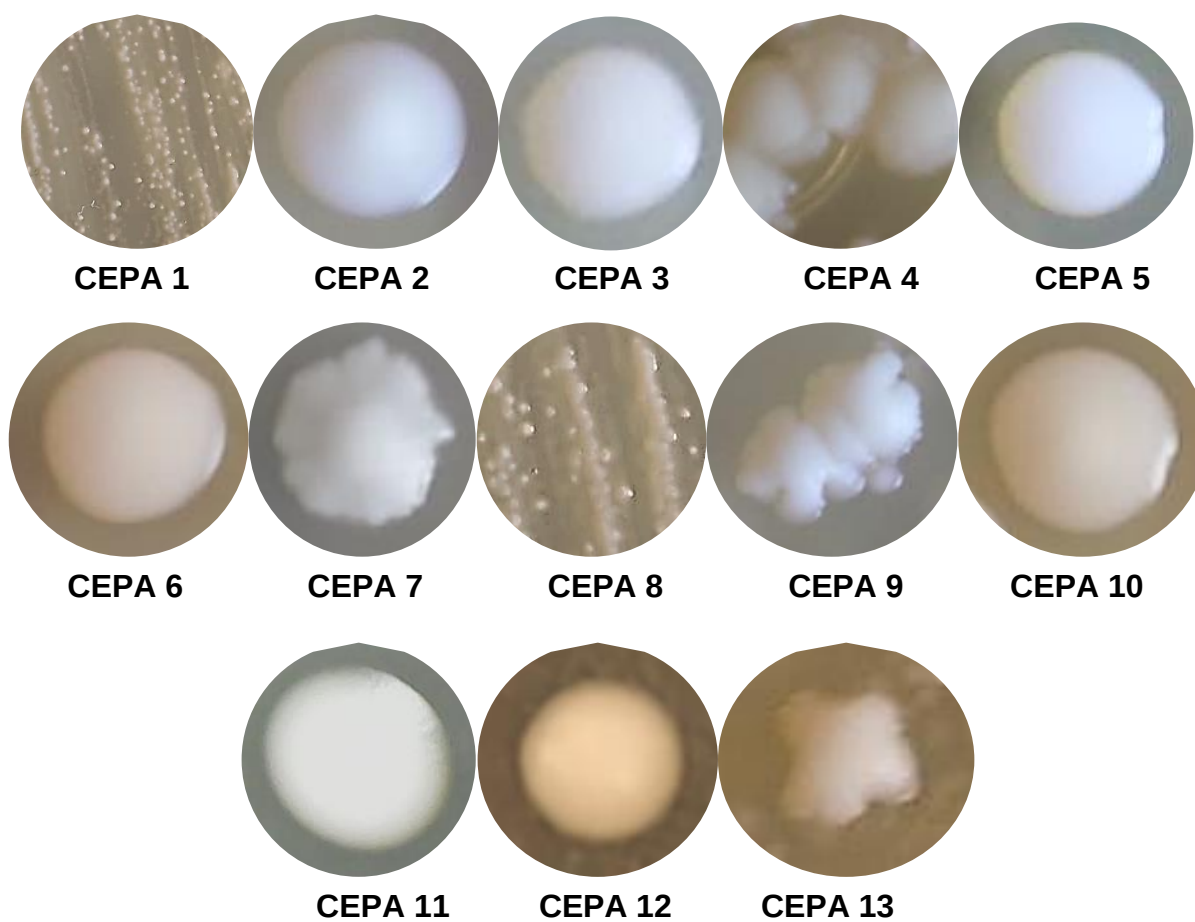
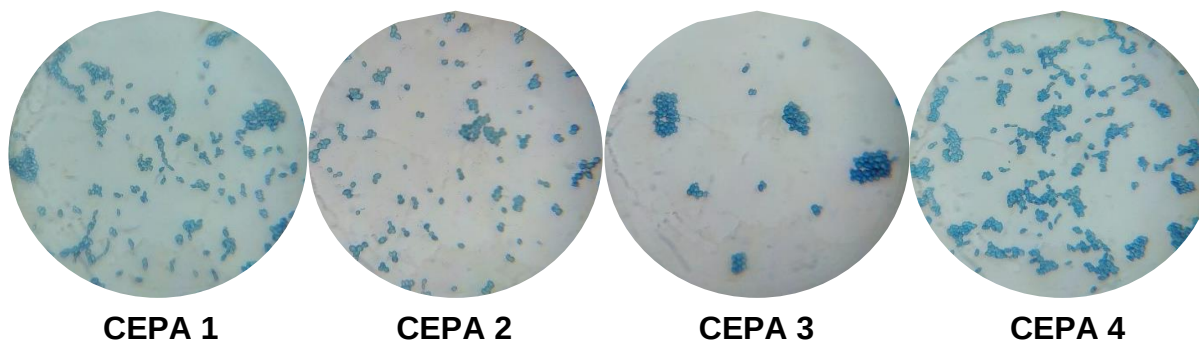


Figura 16. Morfología macroscópica de las cepas aisladas de Levadura

3.4 CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS



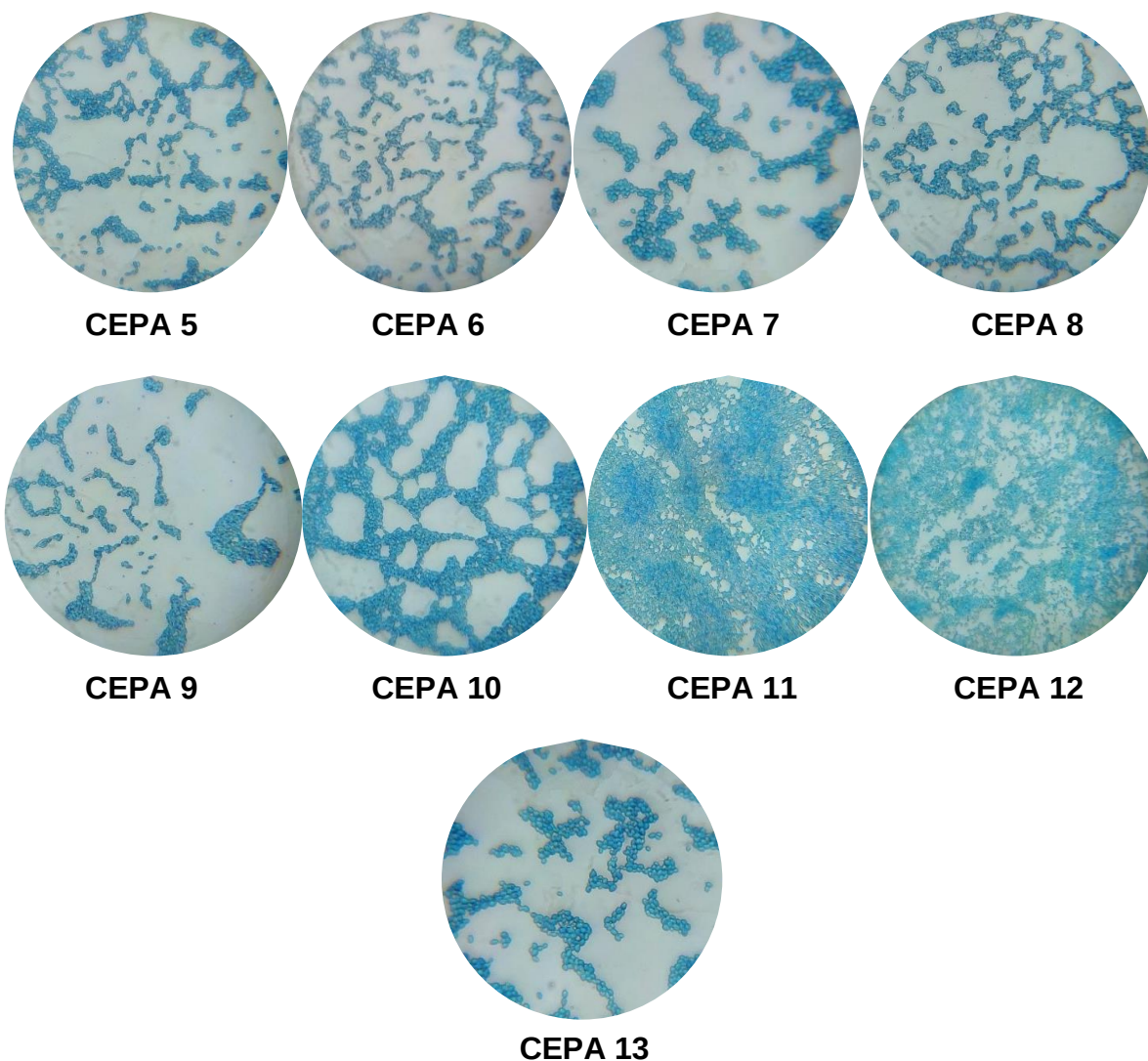


Figura 17. Morfología microscópica de las cepas aisladas de Levadura

3.5 DESARROLLO DE LAS CEPAS EN AISLAMIENTO DIRIGIDO

Se observó en la figura 15 que todas las cepas tuvieron un buen crecimiento en medio sólido Extracto de Levadura-Peptona-Dextrosa (YPD), entre tanto en Agar Rosa de Bengala (ARB) las cepas 2, 7 y 12 tuvieron un buen crecimiento, las demás presentaron un crecimiento débil (Figura 18), al igual que en Agar Cromogénico para Candida (ACC) las cepas 2, 7 y 12 tuvieron un buen crecimiento, las demás presentaron un crecimiento débil excepto la cepa 9 que tuvo un crecimiento nulo (Figura 19).

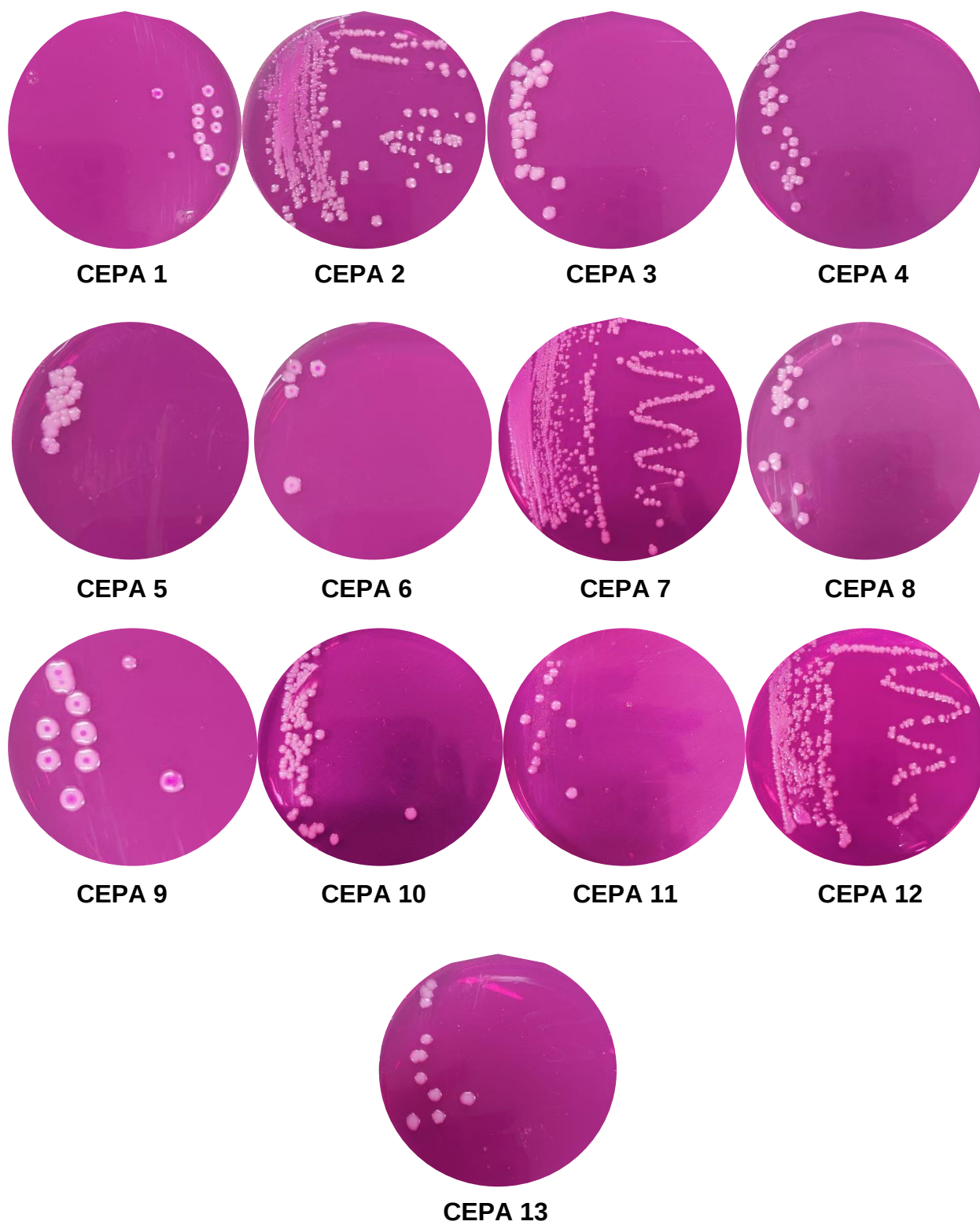


Figura 18. Cepas aisladas de Levaduras en Agar Rosa de Bengala (ARB)

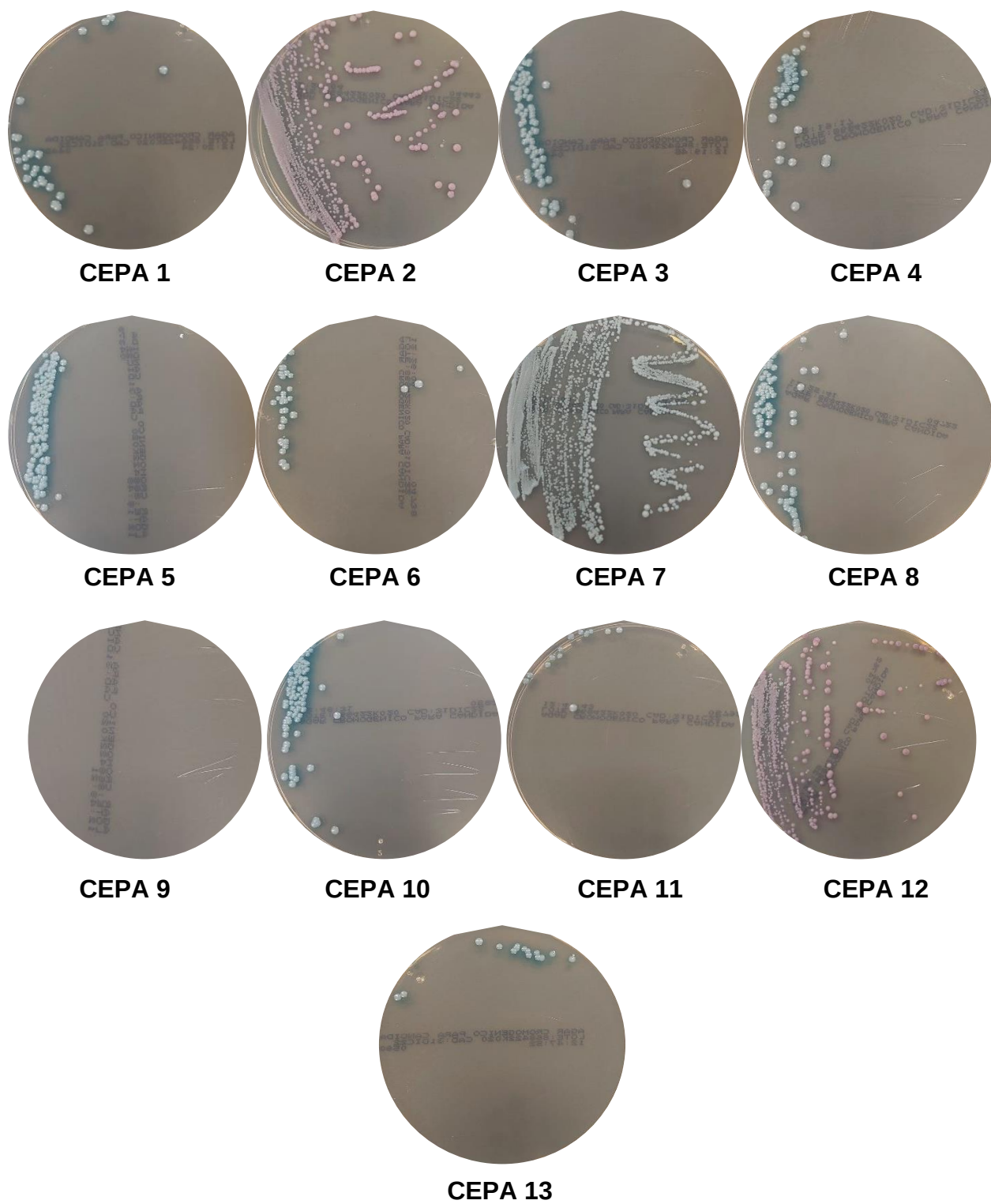


Figura 19. Cepas aisladas de Levaduras en Agar Cromogénico para *Candida* (ACC)

Tabla 5. Crecimiento en aislamiento dirigido

		CEPAS												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
MEDIO	YPD	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	ARB	+	++	+	+	+	+	++	+	+	+	+	++	+
	ACC	+	++	+	+	+	+	++	+	-	+	+	++	+

Crecimiento: Nulo (-), Débil (+), Bueno (++)

3.6 FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Tabla 6. Resultados de la fermentación de carbohidratos

		CEPAS												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
CARBOHIDRATOS	Xilosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Galactosa	++	++	+	-	+	+	+++	-	-	-	++	+	+
	Sacarosa	++	+++	+	++	++	++	+++	+	+	+	++	++	+
	Manosa	++	+++	++	+	+	++	+++	+	+	+	++	++	++
	Lactosa	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	++	++	++

Resultados: Prueba Negativa (-), Prueba Débil (+), Prueba Positiva (++) , Prueba Positiva y Producción de Gas (+++)

De acuerdo a los resultados obtenidos en la fermentación de carbohidratos se observó que para la Xilosa todas las cepas presentaron una coloración naranja lo que indico que eran pruebas débiles para producción de ácidos.

Para la Galactosa las cepas 1, 2 y 11 presentaron coloración amarilla lo que indico que eran pruebas positivas, las cepas 3, 5, 6, 12 y 13 presentaron una coloración naranja lo que indico que eran pruebas débiles, las cepas 4, 8, 9 y 10 presentaron una coloración rojiza lo que indico que eran pruebas negativas, mientras que la cepa 7 presento una coloración amarilla y presencia de una burbuja en la campana Durham indicando una prueba positiva y producción de gas.

Para la Sacarosa las cepas 1, 4, 5, 6, 11 y 12 presentaron coloración amarilla lo que indico que eran pruebas positivas, las cepas 2 y 7 presentaron una coloración amarilla y presencia de una burbuja en la campana Durham indicando una prueba positiva y producción de gas, mientras que las cepas restantes 3, 8, 9, 10 y 13 presentaron una coloración naranja lo que indico que eran pruebas débiles.

Para la Manosa las cepas 1, 3, 6, 11, 12 y 13 presentaron coloración amarilla lo que indico que eran pruebas positivas, las cepas 2 y 7 presentaron una coloración amarilla y presencia de una burbuja en la campana Durham indicando una prueba positiva y producción de gas, mientras que las cepas restantes 4, 5, 8, 9 y 10 presentaron una coloración naranja lo que indico que eran pruebas débiles.

Para la Lactosa las cepas 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9 y 10 presentaron una coloración naranja lo que indico que eran pruebas débiles, las cepas 6 y 7 presentaron una coloración rojiza lo que indico que eran pruebas negativas, mientras que las cepas restantes 11, 12 y 13 presentaron coloración amarilla lo que indico que eran pruebas positivas.

3.7 IDENTIFICACIÓN DE CEPAS

Tabla 7. Cepas identificadas hasta género y código asignado de acuerdo a la estructura del Laboratorio de Control Ambiental del Instituto Tecnológico de Oaxaca

Agave Convallis San Pedro Teozacoalco		
CEPA	CÓDIGO	GÉNERO
1	ITOYIV034	Candida
2	ITOYIV035	Kluyveromyces
3	ITOYIV036	Candida
4	ITOYIV037	Candida
5	ITOYIV038	Candida
6	ITOYIV039	Candida
7	ITOYIV040	Kluyveromyces
8	ITOYIV041	Saccharomyces
9	ITOYIV042	Saccharomyces
10	ITOYIV043	Saccharomyces
11	ITOYIV044	Candida
12	ITOYIV045	Kluyveromyces
13	ITOYIV046	Candida

3.8 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LOS EXTRACTOS CRUDOS SOBRE LAS LEVADURAS

Tabla 8. *Tamaño del halo de inhibición (en mm) de los extractos crudos sobre las levaduras*

CONCENTRACIÓN	CEPA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0 $\frac{\mu g}{mL}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 $\frac{\mu g}{mL}$	11	13	12	13	8	10	14	11	12	11	8	12	9
5 $\frac{\mu g}{mL}$	14	18	14	15	14	13	18	17	17	16	13	17	14
10 $\frac{\mu g}{mL}$	18	23	17	18	20	18	23	21	22	22	17	22	17

Halo: Nulo (-)

Tabla 9. *Tamaño del halo de inhibición (en mm) de los extractos crudos sobre las levaduras (Repetición)*

CONCENTRACIÓN	CEPA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0 $\frac{\mu g}{mL}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 $\frac{\mu g}{mL}$	10	13	12	12	8	10	14	10	13	10	8	11	9
5 $\frac{\mu g}{mL}$	15	18	14	14	14	13	18	16	16	15	13	16	14
10 $\frac{\mu g}{mL}$	18	23	17	18	20	18	23	20	21	21	17	21	17

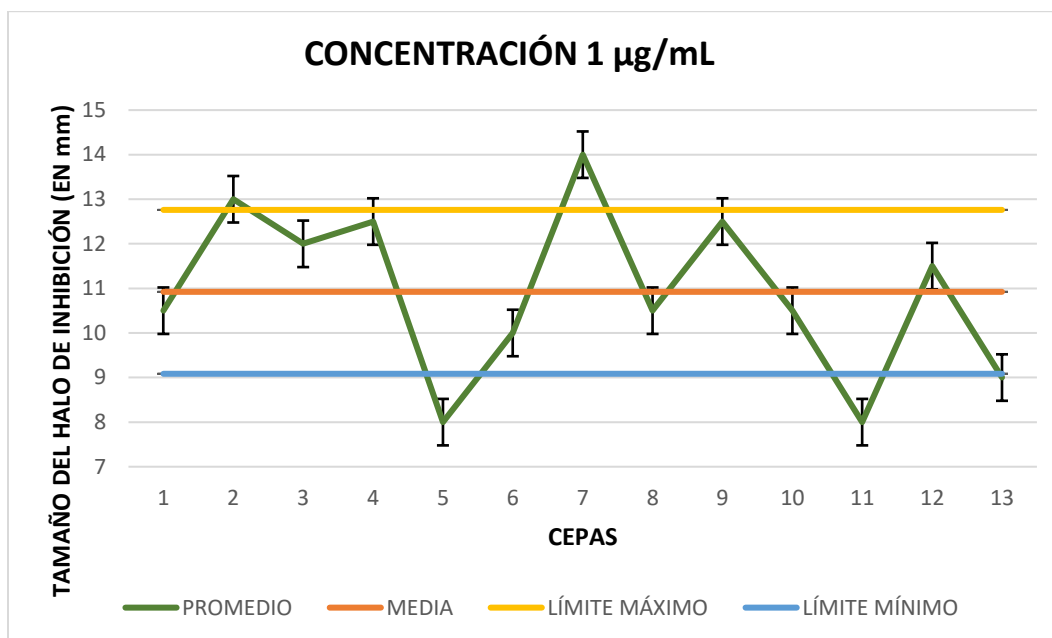
Halo: Nulo (-)

Una vez obtenido el tamaño de los halos de inhibición de las 13 cepas y sus repeticiones correspondientes se procedió a realizar un análisis de varianza (Tabla 10).

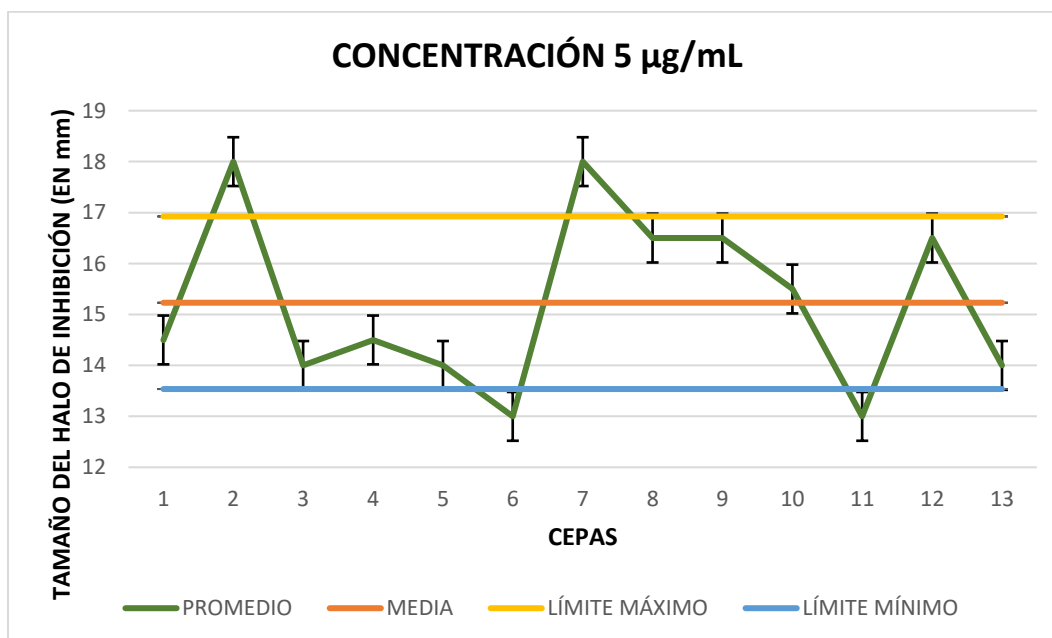
Tabla 10. Análisis de varianza de los halos de inhibición (Extractos crudos sobre las levaduras)

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los Cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	5553.8462	3	1851.2820	1205.7448	2.40373E-63	2.7266
Columnas	174.8461	25	6.9938	4.5551	1.75444E-07	1.6532
Error	115.1538	75	1.5354			
Total	5843.8461	103				

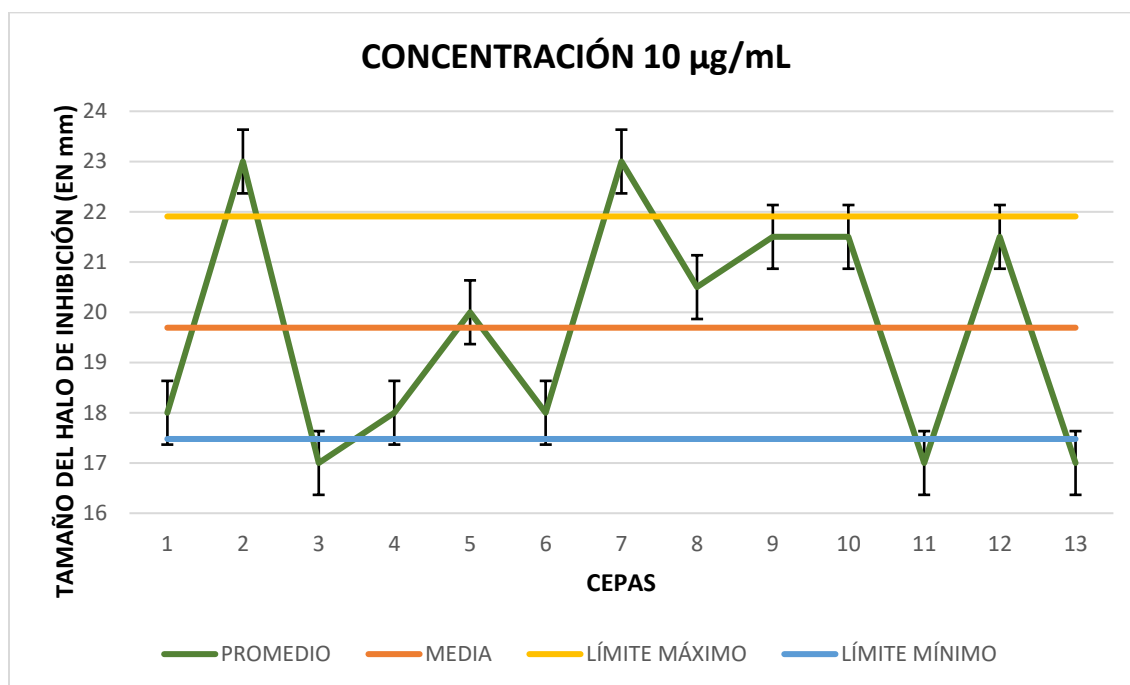
Posteriormente se realizó una gráfica de líneas para mostrar la tendencia que presentaba cada una de las cepas, para ello se calculó la desviación estándar, la media, el límite máximo y el límite mínimo para cada una de las concentraciones utilizadas; excepto para la concentración de $0 \frac{\mu g}{mL}$, ya que no hubo ninguna variación entre las cepas.



Gráfica 1. Control de desviación estándar para la concentración de 1 $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ de los halos de inhibición de los extractos crudos sobre las levaduras



Gráfica 2. Control de desviación estándar para la concentración de 5 $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ de los halos de inhibición de los extractos crudos sobre las levaduras



Gráfica 3. Control de desviación estándar para la concentración de 10 $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ de los halos de inhibición de los extractos crudos sobre las levaduras

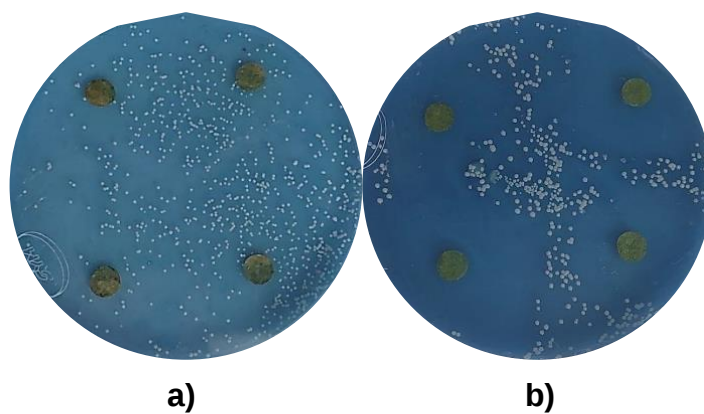


Figura 20. Crecimiento de la cepa 5 (ITOYIV038) a una concentración de a) 0 $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ no presenta halo de inhibición y b) 10 $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ presenta un halo de inhibición de 20 mm.

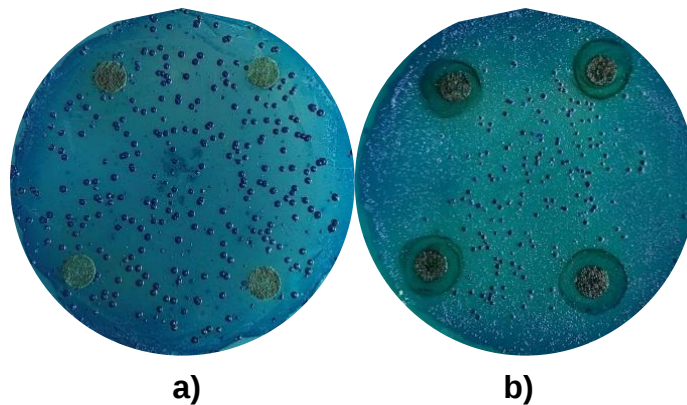


Figura 21. Crecimiento de la cepa 7 (ITOYIV040) a una concentración de a) $0 \frac{\mu g}{mL}$ no presenta halo de inhibición y b) $1 \frac{\mu g}{mL}$ presenta un halo de inhibición de 14 mm.

3.9 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LA DIOSGENINA SOBRE LAS LEVADURAS

Tabla 11. Tamaño del halo de inhibición (en mm) de la diosgenina sobre las levaduras

CONCENTRACIÓN	CEPA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
$0 \frac{\mu g}{mL}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$1 \frac{\mu g}{mL}$	6	5	8	7	7	8	6	6	7	6	8	5	7
$5 \frac{\mu g}{mL}$	9	8	12	10	9	12	9	10	11	9	11	8	11
$10 \frac{\mu g}{mL}$	11	11	15	14	14	16	13	12	14	12	15	10	15

Halo: Nulo (-)

Tabla 12. Tamaño del halo de inhibición (en mm) de la diosgenina sobre las levaduras (Repetición)

CONCENTRACIÓN	CEPA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0 $\frac{\mu g}{mL}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 $\frac{\mu g}{mL}$	7	5	8	7	6	8	7	6	7	6	8	5	6
5 $\frac{\mu g}{mL}$	10	8	12	9	10	12	10	9	11	9	11	8	10
10 $\frac{\mu g}{mL}$	12	11	15	14	13	16	13	12	14	13	15	10	15

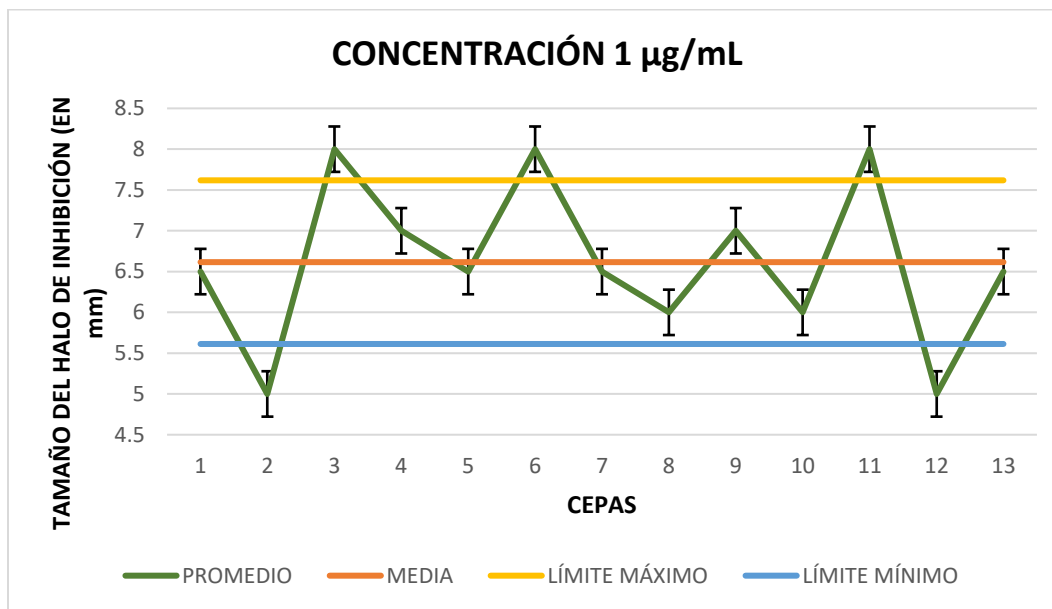
Halo: Nulo (-)

Una vez obtenido el tamaño de los halos de inhibición de las 13 cepas y sus repeticiones correspondientes se procedió a realizar un análisis de varianza (Tabla 13).

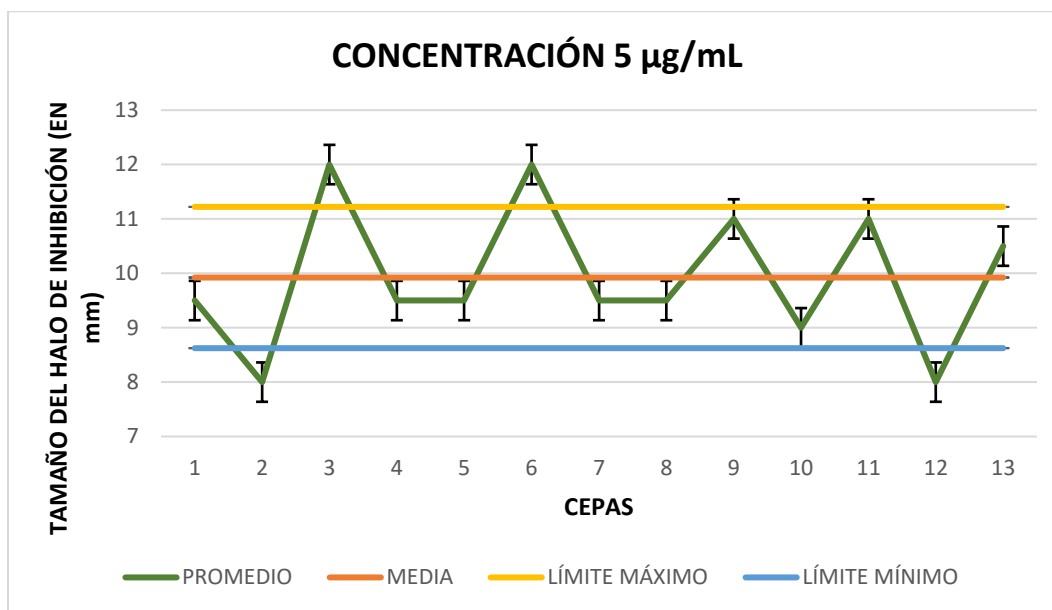
Tabla 13. Análisis de varianza de los halos de inhibición (Diosgenina sobre las levaduras)

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los Cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	2500.6442	3	833.5480	1211.4170	2.02311E-63	2.7266
Columnas	97.5096	25	3.9004	5.6685	2.46291E-09	1.6532
Error	51.6058	75	0.6881			
Total	2649.7596	103				

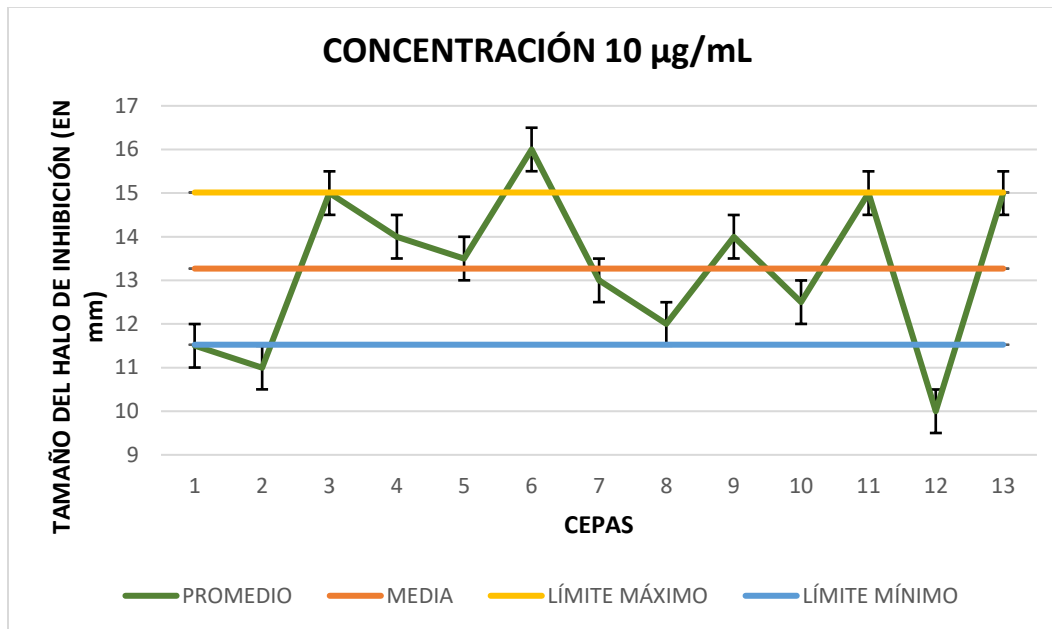
Posteriormente se realizó una gráfica de líneas para cada concentración excepto para la concentración de $0 \frac{\mu g}{mL}$.



Gráfica 4. Control de desviación estándar para la concentración de $1 \frac{\mu g}{mL}$ de los halos de inhibición de la diosgenina sobre las levaduras



Gráfica 5. Control de desviación estándar para la concentración de $5 \frac{\mu g}{mL}$ de los halos de inhibición de la diosgenina sobre las levaduras



Gráfica 6. Gráfico de control de desviación estándar para la concentración de $10 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ de los halos de inhibición de la diosgenina sobre las levaduras

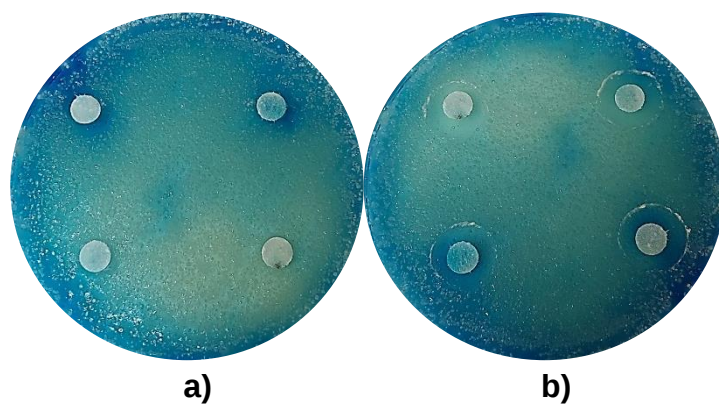


Figura 22. Crecimiento de la cepa 10 (ITOYIV043) a una concentración de a) $0 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ no presenta halo de inhibición y b) $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ presenta un halo de inhibición de 6 mm.

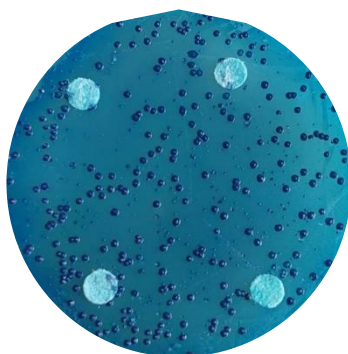


Figura 23. Crecimiento de la cepa 7 (ITOYIV040) a una concentración de $0 \frac{\mu g}{mL}$ no presenta halo de inhibición

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

Se aislaron 13 cepas de la muestra de San Pedro Teozacoalco y por métodos convencionales se identificaron un total de siete cepas del género *Candida*, tres *Kluyveromyces* y tres *Saccharomyces*.

Se determinó por medio de un análisis de varianza los halos de inhibición causados por el extracto crudo sobre las levaduras: primeramente para la concentración de $0 \frac{\mu g}{mL}$ de extracto crudo todas las cepas de la 1 a la 13 no presentaron halo de inhibición, para la concentración de $1 \frac{\mu g}{mL}$ las cepas 5 y 11 presentaron el menor halo (8 mm) mientras que la cepa 7 presento el mayor halo (14 mm), para la concentración de $5 \frac{\mu g}{mL}$ las cepas 6 y 11 presentaron el menor halo de inhibición (13 mm) mientras que las cepas 2 y 7 presentaron el mayor halo (18 mm) y finalmente para la concentración de $10 \frac{\mu g}{mL}$ las cepas 3, 11 y 13 presentaron el menor halo de inhibición (17 mm) mientras que las cepas 2 y 7 presentaron el mayor halo (23 mm).

Esto se observó en los gráficos de control de desviación estándar (Gráfica 1-3) presentados para cada concentración. Finalmente se obtuvo que el valor de F calculado es mayor que el valor crítico para F obtenido en tablas, por lo tanto, esto quiere decir que los extractos crudos si tienen un efecto significativo sobre las levaduras.

Se estableció a través de un análisis de varianza los halos de inhibición causados por la diosgenina sobre las levaduras: primeramente para la concentración de $0 \frac{\mu g}{mL}$ de diosgenina todas las cepas de la 1 a la 13 no presentaron halo de inhibición, para la concentración de $1 \frac{\mu g}{mL}$ las cepas 2 y 12 presentaron el menor halo (5 mm) mientras que las cepas 3, 6 y 11 presentaron el mayor halo (8 mm), para la concentración de $5 \frac{\mu g}{mL}$ las cepas 2 y 12 presentaron el menor halo de inhibición (8 mm) mientras que las cepas 3 y 6 presentaron el mayor halo (12 mm) y finalmente para la concentración de $10 \frac{\mu g}{mL}$ la cepa 12 presento el menor halo de inhibición (10 mm) mientras que la cepa 6 presento el mayor halo (16 mm).

Esto se observó en los gráficos de control de desviación estándar (Gráfica 4-6) presentados para cada concentración. Finalmente se obtuvo que el valor de F calculado es mayor que el valor crítico para F obtenido en tablas, por lo tanto, esto quiere decir que la diosgenina si tiene un efecto significativo sobre las levaduras.

Se compararon los resultados obtenidos del análisis de varianza entre los extractos crudos y la diosgenina; los valores más altos de inhibición lo presentaron los extractos crudos, esto debido a que esta sustancia presenta diferentes componentes no solo saponinas como en el caso de la diosgenina que era una sustancia pura.

REFERENCIAS

- Aguirre, X., Ruiz, R., & Altenbach, S. (2005). Mezcales y diversidad. *CONABIO*.
- Aminahue, C., Pereyra, C., Díaz Vergara, L., Foschesato, A., Montenegro, M., & Cavaglieri, L. (2018). Selección de Levaduras Resistentes al Estrés del Proceso Fermentativo y Caracterización de la Fisiología de su Crecimiento. *Revista Tecnología Y Ciencia*, 30: 45-52.
- Casas Acevedo, A., Aguilar González, C. N., De la Garza Toledo, H., Morlett Chávez, J. A., Montet, D., & Rodríguez Herrera, R. (2015). Importancia de las levaduras no-Saccharomyces durante la fermentación de bebidas alcohólicas. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, (65): 73-79.
- Castañeda Briones, M. T. (2009). Microbiología Aplicada. Manual de Laboratorio. *Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Azcapotzalco*, 64-65.
- Cheok, C. Y., Salman, H. A., & Sulaman, R. (2014). Extracción y cuantificación de saponinas. *Investigación Internacional de Alimentos*, 59: 16-40.
- Condalab. (13 de Abril de 2019). *Condalab "inspired by knowledge"*. Obtenido de https://amyd.quimica.unam.mx/pluginfile.php/9878/mod_folder/content/0/Agar%20Sabourad%20Rosa%20de%20Bengala.pdf?forcedownload=1
- De León, A., Escalante, P., Barba de la Rosa, A., & Blaschek, H. (2008). Optimization of fermentation conditions for the production of the mezcal from Agave salmiana using response surface methodology. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 47 (1), 76-82.
- Escalante, W. E., Rychteraa, M., Melzocha, K., Hatta Sakodab, B., Quillama Poloc, E., Ludeña Cervantes, Z., . . . Chaquilla Quilcad, G. (2012). Actividad fermentativa de Hanseniaspora uvarum y su importancia en la producción de bebidas Fermentadas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 31(1): 57-63.
- Esparza-Ibarra, E. L., Violante-González, S. J., Monks, J. C., Iñiguez, C., Araujo-Andrade, & Rossel-Kipping, E. D. (2015). Los agaves mezcaleros del Altiplano Potosino y Zacatecano. Estudios en Biodiversidad. *University of Nebraska-Lincoln*, 227-245.
- Fernández, T., Marcet, M., Olivera, W., & Martín, C. (2008). Isolation and evaluation of thermotolerant strains of Saccharomyces cerevisiae for aguardientes and rums production. *Journal of Food*, 64-70.
- Flores, T., Huamán, J., & Tomás, G. (2013). ESTUDIO COMPARATIVO DE TRES METODOLOGÍAS CUANTITATIVAS DE EXTRACCIÓN DE SAPONINAS DE LA MELISA OFFICINALIS "TORONJIL". *Revista Peruana De Química E Ingeniería Química*, 16 (2), 47-51.

- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H., & Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition* 2002 Dec; 88(6), 587-605.
- Gallardo Valdez, J. (2020). BREVIARIO MEZCALERO: Regionalismos y términos comunes del proceso de elaboración del mezcal. *Red Temática Mexicana Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves*, 16.
- García Mendoza, A. J. (2007). Los Agaves de México. *Ciencias, Universidad Autónoma de México*. 087, 14.23.
- Guclu, O., & Mazza, G. (2007). Saponinas: propiedades, aplicaciones y procesamiento. *Reseñas críticas en ciencia de los alimentos y nutrición*, 47: 231-258.
- Jie-Lun, H., Shao-Ping, N., Dan-Fei, H., Chang, L., Ming-Yong, X., & Yin, W. (2012). Actividad antimicrobiana de la fracción rica en saponinas de la torta de *Camellia oleifera* y su efecto sobre la viabilidad celular de los macrófagos de ratón RAW 264.7. *Revista de Ciencias de la Alimentación y la Agricultura*. Vol. 92., 2443-2449.
- Kirby, W., Bauer, A., Sherris, J., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology* 45:493.
- Kirchmayr, M., Arellano, M., Estarrón, M., Gallardo, J., Gschaedler, A., López, J., . . . Ramírez, E. (2014). Manual para la estandarización de los procesos de producción del mezcal guerrerense. *Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.*, 75.
- Lappe, R., Moreno, R., Arrizón, J., Herrera, T., García, A., & Gschaedler, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Research*, 8 (7), 1037-1052.
- López-Sánchez, C., Espinoza-Martínez, V. A., & Palma-Cruz, F. J. (2020). Consorcio microbiano de la fermentación del mezcal artesanal de San Dionisio Ocotepc, Oaxaca. *Revista del Centro de graduados e Investigación. Instituto Tecnológico de Mérida*, 35(83): 42–45.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2004). *Biología de los microorganismos*. Décima edición. Pearson Prentice Hall: Madrid.
- Martínez Martínez, A. (2001). Saponinas Esteroidales. *Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmaceutica. Medellín*, 22.
- MCD, L. (s.f.). MCD LAB "ESPECIALISTAS EN MEDIOS DE CULTIVO". Obtenido de https://mcd.com.mx/index.php?controller=attachment&id_attachment=22740
- Molina-Guerrero, J. A., Botello-Alvarez, J. E., Estrada-Baltazar, A., Navarrete-Bolaños, J. L., Jiménez-Islas, H., Cárdenas-Manríquez, M., & Rico-Martínez, R. (2007). Compuestos volátiles en el mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6(1), 41-50.
- Muruaga, M. L., Perotti, N. I., & Abate, C. M. (2012). Selección e Identificación de Levaduras Hiperproductoras de Etanol. *Revista Ciencia*, 118-124.

- Nava-Cruz, N., Medina-Morales, M., Martinez, J., Rodriguez, R., & Aguilar, C. (2015). Biotecnología del agave: una visión general. *Reseñas críticas en biotecnología* 35(4), 546-559.
- Navarrete-Bolaños, J. L., Serrato-Joya, O., Botello-Alvarez, E., Jimenez-Islas, H., Cardenas-Manriquez, M., Conde-Barajas, E., & Rico-Martínez, R. (2007). Analyzing microbial consortia for biotechnological processes design. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 437-449.
- NFR. (Marzo de 2011). *Nacional Financiera Rural, Secretaría de Relaciones exteriores*. Obtenido de Monografía del Mezcal: <https://embamex.sre.gob.mx/belice/images/stories/docs/mezcal.pdf>
- Nogales, L. (1 de Abril de 2018). *Mezcología: Compartimos la magia del mezcal*. Obtenido de Agaves mezcaleros de Oaxaca.
- NOM-070-SCFI-1994. (17 de Agosto de 1994). *Diario Oficial de la Federación*. Obtenido de Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4729420&fecha=17/08/1994#gsc.tab=0
- NOM-070-SCFI-2016. (18 de Agosto de 2016). *Diario Oficial de la Federación*. Obtenido de Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones: https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/6437/seeco11_C/seeco11_C.html
- Ocares, Y., & Castro, J. F. (2020). Preservación de Microorganismos por Congelación. *Instituto de Investigaciones Agropecuarias. BOLETÍN INIA N° 428*, 119-134.
- Oleszek, W., & Bialy, Z. (2006). Determinación cromatográfica de saponinas vegetales. *Revista de cromatografía*, A62: 1-4.
- Palma, F., Pérez, P., & Meza, V. (2016). Diagnóstico de la Cadena de Valor Mezcal en las Regiones de Oaxaca. 1-83.
- Pérez Hernández, E., Chávez Parga, M. D., & González Hernández, J. C. (2016). Revisión del agave y el mezcal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 148-164.
- Pérez, E., González-Hernández, J. C., Chávez-Parga, M. C., & Cortés-Penagos, C. (2013). Caracterización fermentativa de levaduras productoras de etanol a partir de jugo de Agave cupreata en la elaboración de mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(3): 451-461.
- Pramanik, K. (2003). Parametric Studies on Batch Alcohol Fermentation Using Saccharomyces Yeast Extracted from Toddy. *Journal of Chinese Institute of Chemical Engineers, Vol 34, No. 4*, 487-492.
- Sanz Cervera, S. A. (2011). Prácticas de microbiología (2a edición). *Universidad de la Rioja, Servicio de Publicaciones*, 14-24.
- Suárez Machín, C., Garrido Carralero, N. A., & Guevara Rodríguez, C. A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 50(1): 20-28.

- Téllez-Mora, P., Peraza-Luna, F. A., Feria-Velasco, A., & Andrade-González, I. (2012). Optimización del proceso de fermentación para la producción de tequila, utilizando la metodología de superficie de respuesta (msr). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11(1), 163-176.
- Tomlinson, T., & Akerele, O. (2015). Plantas medicinales: su papel en la salud y la biodiversidad. *Prensa de la Universidad de Pensilvania*.
- Torija, M. M. (2002). Ecología de levaduras: Selección y adaptación a fermentaciones vínicas. *Tesis de Doctorado en Bioquímica, Universidad Pública Tarragona*.
- Villagómez González, B. B. (2018). SÍNTESIS Y ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA SOBRE LA LÍNEA CELULAR MCF-7 DE NUEVOS DERIVADOS TRIAZOLICOS DE DIOSGENINA. *Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca*, 23.
- Wu, J., Lin, L., & Chau, F. (2001). Extracción asistida por ultrasonido de saponinas de ginseng a partir de raíces de ginseng y células de ginseng cultivadas. *Ecoquímica de ultrasonidos* (8), 347-352.
- Yang, C., Zhang, Y., Jacob, M., Khan, S., Zhang, Y., & Li, X. (2006). Actividad antifúngica de las saponinas esteroideas C-27. *Agentes antimicrobianos y quimioterapia* 50 (5), 1710-1714.

ANEXOS

Preparación de medio sólido Extracto de Levadura-Peptona-Dextrosa (YPD)

Para la preparación de 520 ml de medio sólido YPD se pesaron 5.2 g de extracto de levadura, 10.4 g de peptona, 10.4 g de dextrosa y 13 g de Agar; los cuales se añadieron en un vaso de precipitado de 1000 ml, luego con una probeta se agregó un volumen de 520 ml de agua destilada, después con una varilla agitadora se homogenizó perfectamente de manera que no se generarán grumos y posteriormente se vertió el medio en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml, el cual se calentó con agitación frecuente y se hirvió durante 1 minuto para disolver completamente, después se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y se dejó enfriar. Finalmente se procedió al vaciado en las 26 cajas de Petri estériles en un ambiente aséptico.

Preparación de medio Agar Rosa de Bengala + Cloranfenicol

Para la preparación de 520 ml de Agar Rosa de Bengala comercial; se pesó 16.64 g del medio, el cual se añadió en un vaso de precipitado de 1000 ml y con una probeta se agregó un volumen de 520 ml de agua destilada, después con una varilla agitadora se homogenizó perfectamente de manera que no se generarán grumos y posteriormente se vertió el medio en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml, el cual se calentó con agitación frecuente y se hirvió durante 1 minuto para disolver completamente; después se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y se dejó enfriar. Finalmente se procedió al vaciado en las 26 cajas de Petri estériles en un ambiente aséptico.

Preparación de medio Cromogénico

Para la preparación de 520 ml de medio Cromogénico comercial; se pesaron 24.8 g del medio, el cual se añadió en un vaso de precipitado de 1000 ml y con una probeta se agregó un volumen de 520 ml de agua destilada, después con una varilla agitadora

se homogenizó perfectamente de manera que no se generarán grumos y posteriormente se vertió el medio en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml, el cual se calentó con agitación frecuente y se hirvió durante 1 minuto para disolver completamente (No sobrecalentar más de 100°C), se dejó enfriar y después se procedió al vaciado en las 26 cajas de Petri estériles en un ambiente aséptico. Finalmente se dejó solidificar, se almaceno a 5 ± 2 °C y se mantuvo en la oscuridad.

Preparación de Caldo Base Rojo de Fenol

Para la preparación de 560 ml de Caldo Base Rojo de Fenol comercial; se pesó 8.4 g del medio, el cual se añadió en un vaso de precipitado de 1000 ml y con una probeta se agregó un volumen de 560 ml de agua destilada, después con una varilla agitadora se homogenizó perfectamente de manera que no se generarán grumos y posteriormente se vertió el medio en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml, el cual se calentó con agitación frecuente y se hirvió durante 1 minuto para disolver completamente; una vez frio se vertió el caldo en los 140 tubos de ensaye colocando 4 ml en cada uno, se le agrego una campana Durham boca-abajo y se cerró en un 70% los tubos de ensaye. Finalmente se esterilizó en autoclave a 116 – 118 °C durante 15 minutos (No sobrecalentar) y se dejó enfriar.

Preparación de Agar Müeller-Hinton + 2% de glucosa + Azul de metileno

Para la preparación de 520 ml de Agar Müeller-Hinton comercial; se pesaron 19.76 g del medio Müeller-Hinton, 10.4 g de glucosa y 2.6×10^{-4} g de azul de metileno; los cuales se añadieron en un vaso de precipitado de 1000 ml, luego con una probeta se agregó un volumen de 520 ml de agua destilada, después con una varilla agitadora se homogenizó perfectamente de manera que no se generarán grumos y posteriormente se vertió el medio en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml, el cual se calentó con agitación frecuente y se hirvió durante 1 minuto para disolver completamente, después se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y se dejó enfriar. Finalmente se procedió al vaciado en las 26 cajas de Petri estériles en un ambiente aséptico.