



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



TECNM
TECNOLÓGICO NACIONAL DE
MÉXICO



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN DESARROLLO REGIONAL Y
TECNOLÓGICO

TESIS

“BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DE LA FERMENTACIÓN DEL
MEZCAL ARTESANAL TOLERANTES A ETANOL “

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestro en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico

PRESENTA

Antonio de Jesús Paz Miguel

DIRIGIDA POR

Dr. Felipe de Jesús Palma Cruz
Dra. Claudia López Sánchez

ASESORA

Dra. Peggy Elizabeth Álvarez Gutiérrez

Oaxaca de Juárez Oaxaca, agosto de 2024



Instituto Tecnológico de Oaxaca
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Oaxaca de Juárez, Oaxaca, 28/octubre/2024

No. de oficio: DEPI-813/2024

ASUNTO: Autorización de impresión de tesis.

HUITZILÍ DÍAZ JAIMES
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE SERVICIOS ESCOLARES
PRESENTE

Por este medio, comunico a usted que de acuerdo con las disposiciones establecidas en los Lineamientos para la Operación de Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México, dependiente de la Secretaría de Educación Pública, el estudiante **Antonio De Jesús Paz Miguel** con número de control M22161621, ha cumplido con todas las recomendaciones que el Comité Revisor hizo respecto a su tesis cuyo título es "Bacterias lácticas aisladas de la fermentación del mezcal artesanal tolerantes a etanol", para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico.

Por lo anterior, la División a mi cargo le concede la autorización para que proceda el trámite correspondiente y la impresión de la misma.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica
Tecnología Propia e Independencia Económica



MARCO ANTONIO SÁNCHEZ MEDINA
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ccp. Archivo
MASM/EPHcmh



Av. Ing. Víctor Brevo Ahuja No. 125 Esquina Calzada Tecnológico, C.P. 68030.
E-mail: depi_oaxaca@tecnm.mx www.oaxaca.tecnm.mx



Oaxaca de Juárez, Oaxaca, 28/ octubre/ 2024

Cof. No. DEPI-214/2024

ASUNTO: Autorización de impresión de tesis.

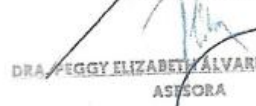
ANTONIO DE JESÚS PAZ MIGUEL
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN DESARROLLO REGIONAL Y TECNOLÓGICO
PRESENTE

De acuerdo con las disposiciones para la Operación de Estudios de Posgrado e Investigación del Tecnológico Nacional de México, dependiente de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo con respecto a su Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico, cuyo título es "Bacterias lácticas aisladas de la fermentación del mesquite artesanal tolerantes a etanol", los abajo firmantes, integrantes de la Comisión Revisora le concedemos la autorización para que proceda a la impresión de la misma.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica-
Tecnología Probia e Independencia Económica


DR. FELIPE DE JESÚS PALMA CRUZ
DIRECTOR DE TESIS


DRA. CLAUDIA LÓPEZ SÁNCHEZ
CO-DIRECTORA


DRA. PEGGY ELIZABETH ÁLVAREZ GUTIÉRREZ
ASESORA


Vc.Ba.
DR. MARCO ANTONIO SÁNCHEZ MEDINA
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN





EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS



CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez, el día 22 del mes de noviembre del año 2024, el que suscribe Antonio de Jesús Paz Miguel estudiante del programa de Maestría en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico, con número de control M22161621, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis, que se desarrolló bajo la dirección de Dr. Felipe de Jesús Palma Cruz y cede los derechos del trabajo titulado:

BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DE LA FERMENTACIÓN DEL MEZCAL ARTESANAL TOLERANTES A ETANOL

al TecNM/Instituto Tecnológico de Oaxaca para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información del presente trabajo no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido solicitándolo a la siguiente dirección o contacto: antonio.pazmiguel@gmail.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Atentamente.

Antonio de Jesús Paz Miguel
Nombre y firma

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A lo largo del desarrollo de esta tesis, conté con el apoyo de personas e instituciones cuya colaboración fue invaluable.

En primer lugar, agradezco profundamente a Haydee, por su constante motivación, compañía y confianza en mi capacidad. Tus palabras y acciones siempre me recordaron la importancia de seguir adelante, incluso en los momentos más desafiantes.

A mi querida familia, por su amor incondicional, paciencia y apoyo en cada paso de este proceso. Gracias por ser mi refugio y mi mayor fuente de fortaleza. Cada logro alcanzado es, en gran parte, gracias a ustedes.

Extiendo mi gratitud al CONACHYT, por su respaldo financiero y por brindarme la oportunidad de continuar mi formación académica. Este apoyo hizo posible no solo este trabajo, sino también mi crecimiento profesional y personal.

A mi director el Dr. Felipe de Jesús Palma Cruz, mi codirectora la Dra. Claudia López Sánchez y mi asesora la Dra. Peggy Elizabeth Álvarez Gutiérrez por su guía, paciencia y enseñanzas durante todo el desarrollo de este proyecto. Sus conocimientos y su compromiso han sido una inspiración constante para superar los retos y avanzar con seguridad.

Finalmente, agradezco a todas las personas que, de manera directa o indirecta, contribuyeron a la realización de este trabajo.

INDICE

RESUMEN	11
INTRODUCCION	12
OBJETIVOS	14
OBJETIVO GENERAL.....	14
OBJETIVOS ESPECIFICOS	15
CAPITULO 1. MARCO TEORICO.....	15
1.1 ¿Qué es el mezcal?	16
1.2 Características del Mezcal.....	16
1.2.1 Etapas de producción	16
1.2.2 Fermentación alcohólica.	17
1.2. 3 Glucolisis.....	18
1.2.4 Compuestos Volátiles.	18
1.2.5 Microorganismos involucrados.....	19
1.3 Bacterias ácido - Lácticas (BAL).....	19
1.3.1 Géneros reportados y de mayor interés de las BAL	21
1.3.2 Clasificación de bacterias acido lácticas de acuerdo con su ruta metabólica.	23
1.3.3 Clasificación de acuerdo con su temperatura	26
1.4 El ADN.....	27
1.4.1 Función de los ácidos nucleicos.....	28
1.4.2 Identificación por métodos moleculares.	30
1.5 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	30
1.5.1 Desnaturalización Inicial	¡Error! Marcador no definido.
1.5.2 Ciclos de la PCR.....	¡Error! Marcador no definido.
1.5.3 Desnaturalización	¡Error! Marcador no definido.
1.5.4 Alineamiento	¡Error! Marcador no definido.
1.5.5 Extension	¡Error! Marcador no definido.
1.5.6 Extension final	35
1.5.6.1 Condiciones del PCR	35
1.6 Gen 16 s ribosomal	35
1.7 Métodos de Analisis del ADN.....	36
1.7.1 Cuantificacion del ADN.....	36
1.7.2 Comprobación del ADN mediante electroforesis.	37

1.7.3 Secuenciación de Ácidos nucleicos.	38
1.8 Analisis de secuencias en programas bioinformáticos	39
1.8.1 BLAST (Basic Local Alignment search tool).	40
.....	41
1.9 Crecimiento microbiano y preinóculo	42
1.10 Tolerancia a etanol.....	43
1.10.1 ¿Qué es la tolerancia al etanol?	43
CAPITULO 2. MATERIALES Y METODOS	48
2.1 Obtención de la muestra.....	48
2.2 Aislamiento por métodos de diluciones	48
2.3 Aislamiento en medio selectivo para la BAL	50
2.4 Morfología microscópica	50
2.5 Pruebas bioquímicas y aislamientos dirigidos de las BAL.....	51
2.5.1 Fermentación Heteroláctica y Homoláctica.....	51
2.5.3 Formación de CO_2 en caldo MRS	53
2.5.4 Prueba de la catalase	53
2.5.5 Fermentación de carbohidratos	53
2.5.6 Reducción de nitratos	54
2.5.7 Oxidasa	54
2.5.8 Medio Litmus Milk	55
2.5.9 Crecimiento en agar LBS.....	55
2.6 Extracción de ADN	56
2.7 PCR	57
CAPITULO 3. RESULTADOS	59
3.1 Muestreo.....	59
3.2 Aislamiento	60
3.3 Caracterización macroscópica.....	60
3.4 Caracterización Bioquímica	61
3.5 Identificación Molecular.....	65
3.6 Tolerancia de etanol	69
3.7 Caracterización cinética.....	70

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Composición química del medio MRS selectivo para bacterias lácticas	50
Tabla 2.	Medio M5 g/l.....	51
Tabla 3.	Crecimiento en M17	52
Tabla 4.	Componentes del Agar LBS	55
Tabla 5.	Pruebas Bioquímicas selectivas para bacterias lácticas del palenque 1	61
Tabla 6.	Pruebas bioquímicas selectivas para bacterias lácticas. Palenque 2.....	62
Tabla 7.	Pruebas Bioquímicas Selectivas enfocadas a bacterias lácticas palenque 2. 62	
Tabla 8.	Pruebas bioquímicas selectivas para bacterias lácticas palenque 3	64
Tabla 9.	Pruebas bioquímicas selectivas para bacterias lácticas palenque 4.	64
Tabla 10.	Pruebas bioquímicas selectivas para bacterias lácticas palenque 4.	64
Tabla 11.	 Especies encontradas en el palenque 1 San Dionisio Ocotepc, <i>Agave angustifolia</i> Haw	66
Tabla 12.	Especies encontradas en el palenque 2 San pablo Etlá, <i>Agave angustifolia</i> Haw.....	67
Tabla 13.	Especies encontradas en el palenque 3 Río las Palmas, <i>Agave potatorum</i> Zucc.....	68
Tabla 14.	Especies encontradas en el palenque 4 San Pedro Teozacoalco, <i>Agave angustifolia</i> Haw.....	69
Tabla 15.	Velocidades específicas de crecimiento de 4 cepas de <i>Lactobacillus</i>	72

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Proceso de producción de mezcal en Oaxaca. Fuente: López 2020.	17
Figura 2.	Fermentación alcohólica. Fuente : Espinoza (2014).	18
Figura 3.	Fermentación homoláctica	25
Figura 4.	Fermentación Heteroláctica. Ruta Embden-Meyerhoff.....	26
Figura 5.	Estructura del ADN.....	28
Figura 6.	Etapas de la PCR.....	32
Figura 7.	Etapas de la PCR. Temperaturas, tiempos y ciclos estándares	34
Figura 9.	Proceso BLAST genérico	41
Figura 10.	Concentración de biomasa y sustrato. Fuente: Dunn 2003.	42
Figura 11.	Localización de los palenques en Oaxaca.....	49
Figura 12.	Procedimiento del metodo de diluciones	49
Figura 13.	Reacción en cadena de la polimerasa . Fuente Biorender 2023	58
Figura 14.	Localización de los palenques en Oaxaca.....	60
Figura 15.	Morfología de las cepas encontradas en los 4 palenques estudiados	61
Figura 16.	Frecuencia de cepas por palenque.....	66
Figura 17.	Porcentaje de sobrevivencia de cepas de lactobacillus plantarum	70
Figura 18.	Cel / ml y D.O generada en 24 h.	71
Figura 19.	Consumo de glucosa a las 24 h por 4 cepas de Lactobacillus	72
Figura 20.	Cinéticas de tolerancia de etanol.....	73

RESUMEN

El proceso de fermentación del mezcal en Oaxaca ocurre de manera natural por fermentación espontánea por diversos microorganismos, entre los que destacan levaduras y bacterias lácticas y acéticas, y a pesar del fuerte arraigo cultural y la gran importancia económica que representa la bebida, la microflora involucrada en el proceso de fermentación, no ha sido completamente identificada y caracterizada. Las bacterias lácticas (BAL) son Gram-positivas, catalasa-negativas y facultativo-anaerobias. Estas bacterias desempeñan un papel importante en el medio ambiente, son importantes en la fermentación espontánea de materiales orgánicos que contienen monosacáridos y disacáridos, un proceso que ha sido reconocido desde la antigüedad como un método de bioconservación de alimentos. Por ello, se identificaron por métodos convencionales y moleculares las bacterias lácticas presentes en la fermentación de cuatro palenques (fábricas de mezcal) de Oaxaca. Para el aislamiento, el medio seleccionado fue MRS (Man Rogose & sharpe), y para los medios dirigidos fueron Agar LBS para *Lactobacillus*, M17 para *Lactococcus* y MSE para *Leuconostoc*. Para la extracción de ADN se utilizó el Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit. Posteriormente, se realizó un test rápido de tolerancia al etanol al 0%, 6% y 8% para seleccionar aquellas cepas resistentes a este medio; Las bacterias seleccionadas fueron sometidas a cinéticas de crecimiento de 24 horas de duración, tomando muestras cada 3 horas para observar su comportamiento (generación de biomasa, UFC/ml, ART, así como tasa de crecimiento específico). Se encontraron un total de 31 cepas, de las cuales 25 correspondían al género *Lactobacillus*. Sólo 4 cepas de *Lactobacillus plantarum* lograron crecer en concentraciones de etanol de hasta 8% vv, correspondientes a los palenques de San Dionisio Ocotepec, Tlacolula y Río las Palmas, Concepción Buenavista, Coixtlahuaca. La cepa OAXLIII019 fue la que mostró mayor crecimiento celular, alcanzando los valores más altos a las 9 horas.

Palabras clave:

Bacterias Lácticas, Mezcal, Fermentación, DNA, PCR, Pruebas Bioquímicas.

INTRODUCCION

El proceso de fermentación en el mezcal se produce de forma espontánea por diversos microorganismos, entre los que destacan levaduras y bacterias. Sin embargo, a diferencia de otros procesos fermentativos la microflora que interviene en la fermentación no ha sido completamente identificada y caracterizada aun cuando este es un producto de fuerte arraigo cultural y gran importancia económica (Durán *et al.*, 2007).

Durante las fermentaciones de tipo espontánea no se obtiene el producto de la acción de una única especie, ya que en ellas se llevan a cabo procesos bioquímicos muy complejos, en los que intervienen e interaccionan levaduras y bacterias (Torija., 2002).

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 o 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).

Dentro de estos compuestos se encuentran los alcoholes superiores, los acetales y los ésteres. Existen en la literatura diversos trabajos sobre los factores que influyen en la formación de compuestos organolépticos, sin embargo, en el caso del mezcal el conocimiento científico sobre este tema es incipiente y el resto de la información disponible se basa sobre la experiencia acumulada durante años por los productores de mezcal.

El proceso de fermentación inicia en el mosto, donde se encuentran microorganismos autóctonos como levaduras, bacterias lácticas, bacterias etanólicas. Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son un grupo microorganismos fundamentales en la biotecnología alimenticia (Escalante *et al.*, 2004).

El principal argumento a favor indica que en estas fermentaciones se consiguen características organolépticas típicas de la zona que no estarían presentes si se utilizara un inóculo de cepas foráneas. La composición cualitativa y cuantitativa de la microbiota presente a lo largo de la fermentación del mosto puede depender principalmente de los

siguientes factores: La región de origen de la materia prima, el procedimiento de producción, la temperatura y el pH (Torija., 2002).

En estudios realizados por López-Sánchez *et al.*, 2020, se han encontrado en el mezcal levaduras del género *Saccharomyces*, existen otras levaduras no-*Saccharomyces* como *Candida*, *Kluyveromyces* y *Schizosaccharomyces*. En el caso de las bacterias ácido-lácticas hasta el momento se ha encontrado tres géneros; *Lactobacillus*, *Weisella* y *Leuconostoc*.

En estudios realizados por López-Sánchez *et al.*, 2020, se han encontrado en el mezcal levaduras del género *Saccharomyces*, existen otras levaduras no-*Saccharomyces* como *Candida*, *Kluyveromyces* y *Schizosaccharomyces*. En el caso de las bacterias ácido-lácticas hasta el momento se ha encontrado tres géneros; *Lactobacillus*, *Weisella* y *Leuconostoc*.

De la gran diversidad de microorganismos de interés biológico, las bacterias lácticas juegan un papel importante En el medio ambiente, son importantes en la fermentación espontánea de materiales orgánicos que contienen monosacáridos y disacáridos, proceso que es reconocido desde tiempos ancestrales como método de bioconservación de alimentos (Ramírez *et al.*, 2011).

Las BAL inhiben un gran número de microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, entre otros debido a la producción de ácidos láctico y acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo, acetoina, péptidos antifúngicos, bacteriocinas y otros metabolitos secundarios que debido a su actividad se utilizan como bioconservantes de productos alimenticios, incluyendo productos lácteos como quesos, frutas y verduras (Cheong *et al.*, 2014).

Estas bacterias se definen como una clase funcional que designa un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas, no patógenas, toxigenicas, fermentadoras, caracterizadas por producir 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 (Crittenden., 2009).

El grupo se subdivide en bacterias homo y heterofermentativas en función de los productos de su metabolismo. Las homofermentativas se caracterizan porque el único producto de la fermentación de los carbohidratos es el ácido láctico, mientras que las segundas pueden originar, además dióxido de carbono, etanol o ácido acético (Gálvez *et al.*, 2007). Los géneros más utilizados para la obtención de alimentos y bebidas fermentadas son *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y dentro del género *Streptococcus*, la especie *S. thermophilus* VBGF56 (Ferreira., 2012).

En la industria, las bacterias lácticas (BAL) se utilizan con éxito como probióticos en alimentos funcionales y nutraceuticos (Rodicio *et al.*, 2004). Recientemente, se ha comenzado a investigar el potencial de las BAL como biorrefinerías para la producción de biocombustibles y ácidos orgánicos (Mazzoli *et al.*, 2014). Las características de las BAL, junto con los diversos metabolitos que producen, ofrecen un gran potencial biotecnológico que aún no ha sido plenamente aprovechado en nuestro entorno. El primer paso para esto es el aislamiento, identificación y caracterización de estas bacterias mediante técnicas fenotípicas y moleculares. Las técnicas fenotípicas son los métodos tradicionales de identificación y permiten detectar diversos rasgos expresados por las bacterias; sin embargo, tienen limitaciones, ya que las cepas de una misma especie no siempre presentan características homogéneas. En contraste, las técnicas moleculares se fundamentan en el análisis del material genético de los microorganismos, lo que les confiere ventajas de especificidad, sensibilidad y rapidez (Palomino *et al.*, 2014).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la tolerancia a etanol de cepas de bacterias ácido-lácticas identificadas de manera polifásica que participan en la fermentación del mezcal artesanal de Oaxaca

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aislar, purificar e identificar por métodos fenotípicos y genotípicos a las bacterias lácticas de la fermentación del mezcal artesanal en cuatro palenques (fábricas de mezcal) de Oaxaca.
- Determinar la tolerancia al etanol, de las cepas de bacterias lácticas de la fermentación del mezcal artesanal.
- Realizar cinética de crecimiento de las bacterias más resistentes a etanol

CAPITULO 1. MARCO TEORICO

1.1 ¿Qué es el mezcal?

El mezcal es una bebida alcohólica, tradicional de México, la cual es obtenida por procesos artesanales en su mayoría, así como también por procesos tecnificados, que incluyen las siguientes etapas de producción: la selección y corte de la materia prima, la cocción del agave, la molienda del mosto, la fermentación del jugo fructosado, la destilación, la rectificación y la maduración del destilado. Eventos durante cualquiera de estas etapas tienen el potencial de afectar la calidad sensorial y química del producto final, así como sus rendimientos. Estas características son factores clave para una buena aceptación por el consumidor en función de las características organolépticas que percibe, como el sabor, el aroma y el cuerpo. (Pérez *et al.*, 2016).

1.2 Características del Mezcal

El mezcal es obtenido a partir de las plantas de agaves pertenecientes a la familia Agavácea. En México este género es muy diverso y está representado por 136 especies de *agave* (Flores *et al.*, 2009). Sin embargo, el mezcal se obtiene únicamente a partir de unas cuantas especies. La bebida es producida en diferentes estados de la república mexicana. La mayor producción se da en el estado de Oaxaca a partir de las especies de mostos destilados del agave *espadín Agave angustifolia* y del tobalá silvestre *Agave potatorum* Zucc (Colunga.,2007). En Oaxaca, el mezcal es producido en diferentes regiones como Tlacolula, Sola de Vega, Matatlán, Ejutla, Miahuatlán, Yautepec, Ocotlán, Zimatlán (Palma-Cruz, 1991)

1.2.1 Etapas de producción

La producción de mezcal comprende cinco etapas: corte o cosecha del Agave, cocción, molienda, fermentación y destilación, como se muestra en la figura 1. La fermentación es la etapa más importante y crítica del proceso, pues de ello dependerán las cualidades sensoriales del producto final; es espontánea, con la participación de la microbiota nativa,

la cual transforma a los azúcares que contiene el Agave en etanol, CO_2 , y otros compuestos que forman parte integral de la rica gama de sabores y aromas del mezcal (López-Sánchez *et al.*, 2020).



Figura 1. Proceso de producción de mezcal en Oaxaca. Fuente: López 2020.

1.2.2 Fermentación alcohólica.

Se puede considerar que la fermentación tiene tres grandes objetivos como menciona (Kirchmayr *et al.*, 2014):

1. Lograr una máxima conversión de los azúcares de los agaves en alcohol.
2. Generar compuestos volátiles agradables que repercutirán en la calidad del mezcal producido.
3. Evitar la producción de sustancias no deseadas como la acidez.

La fermentación del mezcal en Oaxaca es una de las etapas más importantes del proceso, ya que es aquí donde se transforman los azúcares del Agave, en etanol y otros compuestos químicos, Dicha transformación es llevada a cabo por un consorcio microbiano integrado principalmente por levaduras y bacterias (López-Sánchez *et al.*, 2020).

1.2. 3 Glucólisis

Lehninger 2009, menciona que en este proceso se convierte un mol de glucosa en dos moles de etanol, dos moles de dióxido de carbono y dos moles de ATP. La sacarosa, al ser un dímero de glucosa y fructosa, es primero hidrolizada por la enzima invertasa y posteriormente fermentada. Cada molécula de glucosa es convertida a dos moléculas de piruvato o ácido pirúvico en un proceso llamado glucólisis. El piruvato es transformado a acetaldehído mediante la enzima piruvato-descarboxilasa y el acetaldehído da paso a la formación de etanol mediante la enzima alcohol-deshidrogenasa. Como en la figura 2

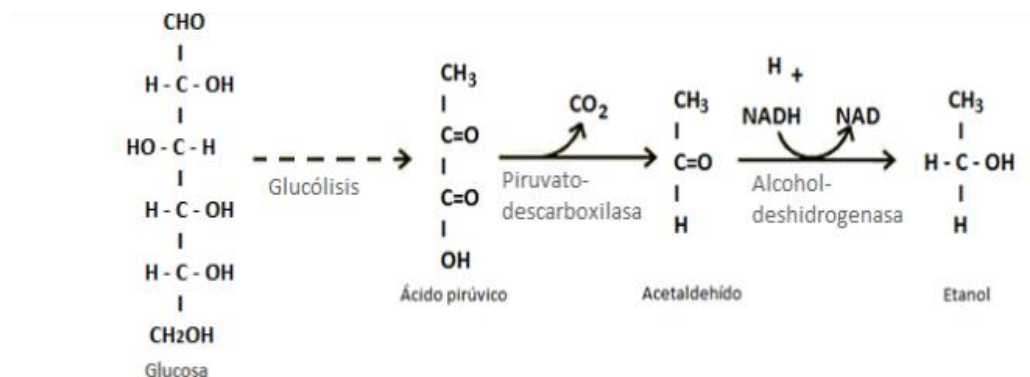


Figura 2. Fermentación alcohólica. Fuente : Espinoza (2014).

1.2.4 Compuestos Volátiles.

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 o 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).

Dentro de estos compuestos se encuentran los alcoholes superiores, los acetales y los ésteres. Existen en la literatura diversos trabajos sobre los factores que influyen en la formación de compuestos organolépticos, sin embargo, en el caso del mezcal el

conocimiento científico sobre este tema es incipiente y el resto de la información disponible se basa sobre la experiencia acumulada durante años por los productores de mezcal.

1.2.5 Microorganismos involucrados

Las bebidas fermentadas que se producen de forma tradicional como el mezcal, se obtienen mediante fermentaciones espontáneas, es decir, no se añaden inóculos comerciales, sino que actúan los microorganismos naturales presentes en el sustrato. Durante este tipo de fermentaciones no se obtiene el producto de la acción de una única especie, ya que en ellas se llevan a cabo procesos bioquímicos muy complejos, en los que intervienen e interaccionan levaduras y bacterias (Torija., 2002).

El principal argumento a favor indica que en estas fermentaciones se consiguen características organolépticas típicas de la zona que no estarían presentes si se utilizara un inóculo de cepas foráneas. La composición cualitativa y cuantitativa de la microbiota presente a lo largo de la fermentación del mosto puede depender principalmente de los siguientes factores: La región de origen de la materia prima, el procedimiento de producción, la temperatura y el pH (Torija., 2002).

En estudios realizados por López., 2020, se han encontrado en el mezcal levaduras del género *Saccharomyces*, existen otras levaduras no-*Saccharomyces* como *Candida*, *Kluyveromyces* y *Schizosaccharomyces*. En el caso de las bacterias ácido lácticas hasta el momento se ha encontrado tres géneros; *Lactobacillus*, *Weisella* y *Leuconostoc*.

1.3 Bacterias ácido - Lácticas (BAL).

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son bacterias Gram-positivas, catalasas negativas, y anaerobio-facultativas (Settanni *et al.*, 2010). Para su aislamiento se han empleado diversos medios de cultivo como Man Rogosa Sharpe (MRS) y Rogosa Agar, mejor conocido como *Lactobacillus* selection Agar (LBS) para *Lactobacillus* spp, M17 para

Lactococcus spp y el medio MSE (Mayeux, Sandine & Elliker) para *Leuconostoc* spp. (Mayeux *et al.*, 1962). Utilizando éstos medios es posible realizar un aislamiento dirigido de BAL, en que los géneros más importantes en la industria alimenticia son; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Leroy., 2002).

Desde hace miles de años se han usado microorganismos para la obtención de alimentos fermentados y como métodos de conservación de estos, En 1857 Louis Pasteur describe su interacción con los alimentos, fue ahí donde se inicia la investigación de microorganismos en alimentos (Stiles *et. al.*, 1997).

Las BAL forman parte del grupo de microorganismos presentes en alimentos estudiados a través del tiempo, actualmente, se analiza a manera de detalle la funcionalidad de estas bacterias en una amplia variedad de alimentos, plantas y animales, el papel que desempeñan en el medio en el que se desarrollan, como fermentadores principales, conservadores naturales, brindadores de características organolépticas y funcionalidad en alimentos. En plantas y animales forman parte del microbiota, brindando nutrimentos esenciales para su desarrollo o protección frente a patógenos, y en humanos

específicamente la importancia de su actividad antiinflamatoria, antiolesterolémica y antimicrobiana (Moreno *et al.*, 2008).

Las BAL son un grupo de bacterias relacionadas que producen ácido láctico como el principal metabolito (Devlieghere *et al.*, 2004), son microorganismos nutricionalmente exigentes, capaces de hidrolizar péptidos de la leche. La concentración de aminoácidos libres en la leche es muy limitada, así el crecimiento sostenido de BAL depende de la producción de proteinasas peptidasas y sistema de transporte de aminoácidos y péptidos específicos (Pescuma *et al.*, 2008).

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) desdoblan carbohidratos y producen ácido láctico y otros metabolitos descendiendo el pH hasta 4,7 (Axelsson *et al.*, 2004). Se clasifican en

homo o heterofermentativas (Escobar., 1999). Las bacterias homofermentativas sintetizan sólo ácido láctico sin liberar CO₂. Entre ellas está *Lactobacillus plantarum*, utilizado para fabricación de masas ácidas, leches ácidas, cárnicos madurados y vegetales fermentados (Onilude *et al.*, 2005). Las bacterias hetero fermentativas generan, además de ácido láctico, una cantidad apreciable de etanol, acetato y CO₂, como *Lactobacillus brevis* y *Leuconostoc sp* (Madigan., 2003).

También contribuyen al sabor, aroma, textura y al valor nutricional de alimentos fermentados a través de la producción de exopolisacáridos (EPS), debido a su actividad metabólica sobre proteínas, azúcares y lípidos, lo que contribuye a la digestibilidad de los alimentos y a la preservación del producto final (Pescuma *et al.*, 2008).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) desdoblan carbohidratos y producen ácido láctico y otros metabolitos descendiendo el pH hasta 4,7 (Axelsson 2004). Se clasifican en homo o heterofermentativas (Escobar 1999). Las bacterias homofermentativas sintetizan sólo ácido láctico sin liberar CO₂. Entre ellas está *Lactobacillus plantarum*, utilizado para fabricación de masas ácidas, leches ácidas, cárnicos madurados y vegetales fermentados (Onilude 2005). Las bacterias heterofermentativas generan, además de ácido láctico, una cantidad apreciable de etanol, acetato y CO₂, como *Lactobacillus brevis* y *Leuconostoc sp.* (Madigan 2003).

También contribuyen al sabor, aroma, textura y al valor nutricional de alimentos fermentados a través de la producción de exopolisacáridos (EPS), debido a su actividad metabólica sobre proteínas, azúcares y lípidos, lo que contribuye a la digestibilidad de los alimentos y a la preservación del producto final (Pescuma *et al.*, 2008).

1.3.1 Géneros reportados y de mayor interés de las BAL .

Las características que comparten la mayoría de estas bacterias son: la morfología cocoide, bacilar o cocobacilar, Gram positivos, no esporulados, aerotolerantes, microaerófilos o anaerobios facultativos, mesófilos, no poseen citocromos, catalasa negativos (en algunos casos pueden presentar actividad de pseudocatalasa), acidófilos o

acidotolerantes, de metabolismo quimiorganotrofo y estrictamente fermentativo, produciendo ácido láctico como principal producto de la fermentación. (Sáenz 2008).

A continuación, se describen a los géneros más importantes en la industria alimentaria:

1.*Lactococcus*: contiene 12 especies (*L. fujiensis*, *L. garvieae*, *L. lactis*, *L. piscicum*, entre otras), es representado por la especie tipo *Lactococcus lactis*, con dos subespecies *lactis* y *cremoris*. Las bacterias de este género son cocos dispuestos individualmente, en pares o cadenas cortas, con carácter homofermentativo y especies capaces de crecer a 7°C o menos. (Jay., 2006). es un microorganismo mesófilo, capaz de fermentar la lactosa produciendo ácido láctico en gran cantidad, de la misma forma es capaz de producir algunas sustancias antibacterianas conocidas como bacteriocinas, entre las cuales destacan la nisina y la diplococcina. (Rodríguez et al., 2007). Puede ser utilizada tecnológicamente como biopreservador, controlando el crecimiento de bacterias patógenas como el *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e incluso algunas especies del género *Clostridium*, los cuales son responsables de serios problemas de conservación en diversos productos lácteos. (Leroy et al., 2004).

2.*Leuconostoc*: contiene 18 especies (*L. mesenteroides*, *L. pseudomesenteroides*, *L. citreum*, *L. kimchii*, entre otras.) Son cocos ovoides que en mayoría de los casos están dispuestos en cadenas, intrínsecamente resistente a la vancomicina. Todo el género tiene carácter heterofermentativo y pueden producir dextranos a partir de sacarosa. (Dworking et al., 2006). Esta bacteria es ampliamente utilizada en la elaboración de quesos de cabra artesanales, así como uno de los responsables de darle la viscosidad al pulque.

3.*Pediococcus* actualmente contiene 9 especies (*P. acidilactici*, *P. cellicola*, *P. claussenii*, *P. damnosus*, entre otras.). Estas bacterias suelen disponerse en pares o tétradas, y se dividen a lo largo de dos planos de simetría, como *Tetragenococcus* y *Aerococcus* y son estrictamente homofermentativos. (Haakensen et al., 2009). son las principales especies utilizadas en suplementos probióticos para animales y humanos,

así como en la producción de bacteriocinas (pediocina) e inóculo en los procesos fermentativos para evitar contaminaciones. (Endo *et al.*, 2016).

4. *Streptococcus* actualmente contiene más de 50 especies. La división celular en este género se produce a lo largo de un eje único en estas bacterias, por lo que se disponen en cadenas o pares. Existen especies patógenas para el ser humano, siendo las más importantes los *Streptococcus* alfa-hemolíticos (*S. pneumoniae* y *S. viridans*) y beta-hemolíticos de los grupos A y B de acuerdo con la clasificación de Lancefield. Algunos *Streptococcus* de uso alimenticio pertenecen al grupo viridans, pseudotaxonomía empleada para referirse a especies que no poseen antígenos de Lancefield y son alfa-hemolíticas como *S. thermophilus*, y no hemolíticas (Facklam, 2002). *S. thermophilus* en la industria de la alimentación tiene un papel esencial, ya que se usa como cultivo para elaborar productos fermentados, en el cuerpo humano tiene varias funciones importantes: mejorar la digestión de la lactosa convirtiéndola en ácido láctico, controlar las diarreas causadas por bacterias patógenas gracias a la barrera que forman en la flora intestinal, y controlar la gastritis e infecciones causadas por *Helicobacter pylori*.

5. *Lactobacillus*: contiene más de 180 especies (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, entre otros.) Este género posee una morfología de bastón, una alta tolerancia al peróxido de hidrógeno, muchos *Lactobacillus* poseen metabolismo homofermentativo, y algunas especies, heterofermentativo. Son aerotolerantes a pesar de la ausencia completa de la cadena respiratoria. (Archibald 1981). Estas bacterias son probióticos ya que ayudan en la flora intestinal, ayudan a mejorar la digestión, tienen efecto antibacteriano.

1.3.2 Clasificación de bacterias ácido lácticas de acuerdo con su ruta metabólica.

Sáenz 2008 clasifica a las BAL de la siguiente manera:

- Homofermentativas obligadas: incluyen a las especies del grupo *Thermobacterium* y *Lactobacillus* como *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb.*

gasseri. *Lb. Helveticus*, oxidan la glucosa y otras hexosas hasta ácido láctico a través de la vía fermentativa Embden- Meyerhof- Parnas, mediante la participación de la enzima llamada fructosa 1,6-difosfato aldosa. Estas bacterias carecen de las enzimas glucosa 6- fosfato deshidrogenada y 6- fosfogluconato deshidrogenasa, debido a ello no son capaces de fermentar las pentosas ni el gluconato.

- Heterofermentativas obligadas: estas bacterias (*Leuconostoc* y *Lactobacillus* *Lb. sóme*, *Lb buchneri* y *Lb. reuteri*; *Lb. fermentum*; *Lb. brevis*; *Lb. Bifermentans* y *Betabacterium*) degradan la glucosa y otras hexosas hasta ácido láctico, dióxido de carbono, ácido acético o etanol y las pentosas hasta ácido láctico y ácido acético, a través de la ruta metabólica de las pentosas fosfato(fosfocetolasa), con la participación de la enzima fosfocetolasa y carecen de la enzima 1,6-difosfato aldosa.
- Heterofermentativas facultativas: el resto de las bacterias lácticas (*Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* y *Tetragenococcus*) fermentan las hexosas casi exclusivamente hasta ácido láctico por la vía Embden- Meyerhof- Parnas, pero algunos microorganismos a pesar de no presentar la enzima fosfocetolasa, en condiciones limitantes de carbohidratos y anaerobiosis, producen además ácido fórmico, ácido acético y etanol. Con lo que respecta a la utilización de las pentosas, la mayoría de estos.
- microorganismos son capaces de fermentarlas por acción de fosfocetolasa inducible, produciendo cantidades equivalentes de ácido láctico y ácido acético.

La clasificación de las bacterias lácticas (BAL) en homofermentativas obligadas o heterofermentativas obligadas se basa en la presencia o ausencia de las enzimas aldolasa o fosfocetolasa, que son fundamentales en las vías de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) y fosfocetolasa, respectivamente. Las BAL homofermentativas obligadas presentan aldolasa y no tienen fosfocetolasa, mientras que las BAL heterofermentativas obligadas muestran el patrón inverso. Por otro lado, las BAL heterofermentativas

facultativas poseen las enzimas necesarias para ambas rutas metabólicas (Holzapfel et al., 2014).

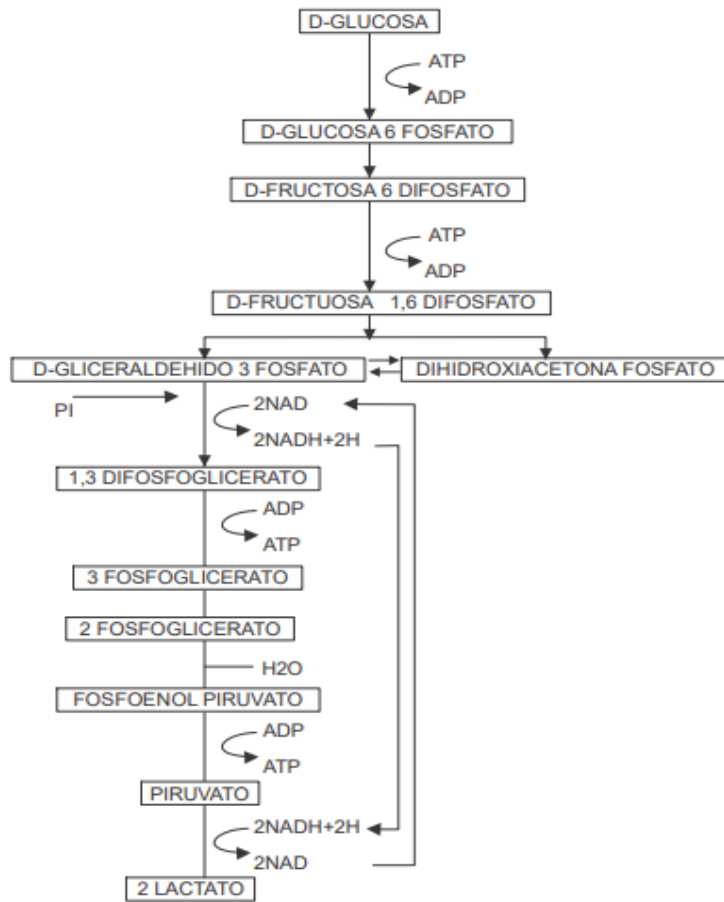


Figura 3. Fermentación homoláctica

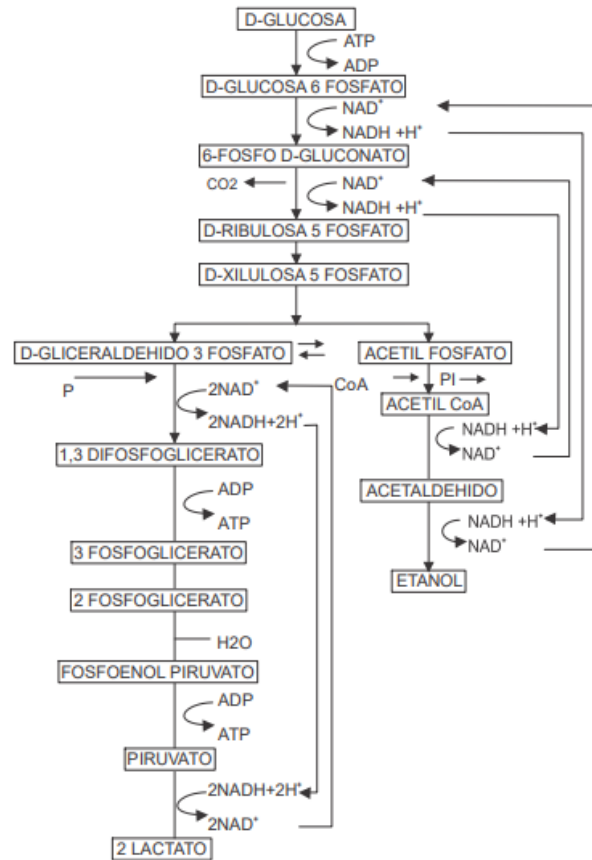


Figura 4. Fermentación Heteroláctica. Ruta Embden-Meyerhoff.

1.3.3 Clasificación de acuerdo con su temperatura

Las BAL también se clasifican según la temperatura ideal de crecimiento en: mesófilas y termófilas.

- Mesófilas

Temperatura óptima de incubación, 20-25 °C; volumen de cultivo líquido, 1-2%; tiempo de incubación, 18-20 horas; acidez final, 0,8% de ácido láctico. Especies: *Lactococcus lactis subs lactis*, *Lactococcus lactis subs cremoris*, *Lactococcus lactis*,

biovariedad diacetylactis, *Leuconostoc mesenteroides* subs *cremoris*. Utilización: kumis, quesos semimadurados (Blanco *et al.*, 2006).

- Termófilas

Temperatura óptima de incubación, 40-45 °C; volumen de cultivo líquido, 2-3%; tiempo de incubación, 2-4 horas; acidez final, 0,9% de ácido láctico. Especies: *Lactobacillus delbruekii subsp bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus salivarius subsp thermophilus* (Blanco *et al.*, 2006)

1.4 El ADN

El ADN tiene una estructura de doble hélice. Cada hélice es un polímero que consta de millones de nucleótidos, que son sus unidades monoméricas. Cada nucleótido está compuesto por una desoxirribosa, una base que puede ser púrica o pirimidínica, y un grupo fosfato. Las dos cadenas de ADN son antiparalelas y se conectan mediante puentes de hidrógeno que se establecen entre bases complementarias (A·T y G·C) de ambas hebras. Esta disposición forma la estructura de doble hélice, en la cual las bases de los nucleótidos están orientadas hacia el interior, mientras que los grupos fosfato y las desoxirribosas se sitúan en el exterior, formando los esqueletos fosfodiéster de cada hélice. Los pares de nucleótidos están separados por 3.4 Å, y se produce una vuelta de la hélice cada diez pares de nucleótidos (34 Å). La variación fundamental entre todas las moléculas de ADN que constituyen el material genético de los organismos vivos radica en la secuencia de estos cuatro tipos de nucleótidos, que poseen las bases A, T, G y C en cada molécula de ADN (Necochea *et al.*, 2004).

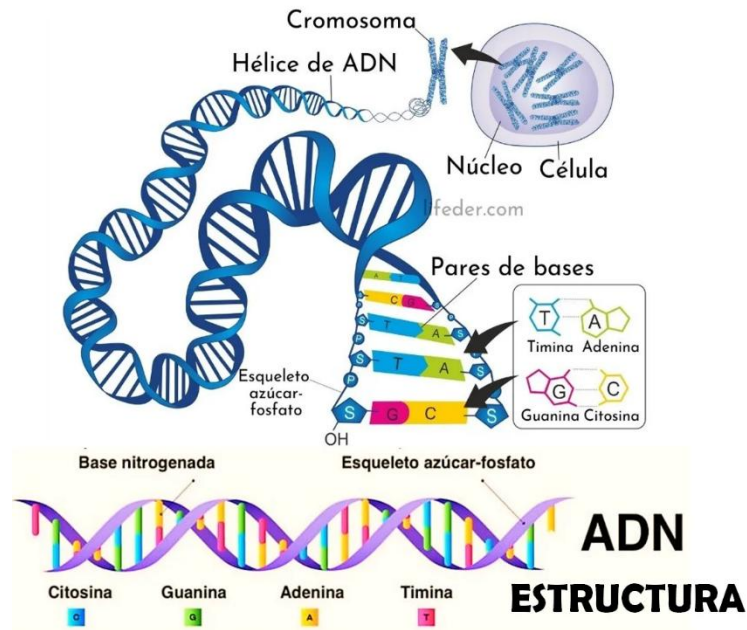


Figura 5. Estructura del ADN

1.4.1 Función de los ácidos nucleicos.

Los ácidos nucleicos cumplen funciones esenciales en el almacenamiento, expresión y replicación de la información biológica. En términos generales, todas las moléculas de ADN presentan una configuración similar. Sin embargo, el ADN de cada especie de organismo posee una secuencia de bases única, y su estructura primaria se organiza en unidades funcionales denominadas genes. La información contenida en esta secuencia tiene diversas funciones. Los genes estructurales son responsables de codificar enzimas, proteínas estructurales y proteínas reguladoras. El primer paso en la síntesis de proteínas consiste en la producción de una molécula de ARN, utilizando como molde un segmento de una de las cadenas de ADN. Durante el proceso de transcripción, el orden de los desoxirribonucleótidos de uno o más genes se transfiere secuencialmente a una cadena complementaria de ribonucleótidos. Este proceso es llevado a cabo por la enzima ARN polimerasa y, al igual que la replicación del ADN, ocurre en la dirección de 5' a 3'. En los procariontes, debido a la ausencia de una membrana

nuclear, las moléculas de ARN que se generan a partir de los genes son traducidas de inmediato en los ribosomas para formar proteínas. En contraste, en los eucariontes, el ARN transcrito es transportado del núcleo al citoplasma a través de la membrana nuclear. Además, los genes de los eucariontes contienen intrones, que son segmentos de ADN que interrumpen la región codificante del gen (exón). Al transcribirse un gen en el núcleo de las células eucariotas, el ARN resultante incluye tanto las regiones de los intrones como las de los exones. Esta molécula de ARN se somete a un proceso de "maduración" para convertirse en ARNm maduro, que se exporta del núcleo al citoplasma, donde posteriormente se traduce en proteína (De Necochea et al., 2004).

1.4.2 Identificación por métodos moleculares.

Según Romero et al. (2014), una de las principales ventajas de las técnicas moleculares sobre los métodos fenotípicos es su capacidad para distinguir microorganismos que están estrechamente relacionados, incluso a nivel de cepa, y su aplicación es universal. La aplicación de estas técnicas comienza con la extracción de ADN, donde la obtención de datos confiables y reproducibles depende en gran medida de la pureza e integridad del ADN extraído. Este proceso implica el aislamiento y purificación de las moléculas de ADN y se basa en sus características fisicoquímicas.

La electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida es una de las metodologías más comunes en laboratorios para trabajar con ácidos nucleicos. A través de la electroforesis, es posible separar fragmentos de ADN y ARN según su tamaño, visualizarlos con una tinción sencilla y así determinar el contenido de ácidos nucleicos en una muestra, lo que proporciona estimaciones sobre su concentración y grado de integridad. Además, se pueden extraer los fragmentos de ADN de interés del gel para su uso en diversas aplicaciones.

La electroforesis en geles de agarosa se utiliza comúnmente para separar y purificar fragmentos de ADN cuando no se requiere un alto poder de resolución. En contraste, la electroforesis en geles de poliacrilamida, aunque limita el tamaño de los fragmentos que se pueden separar (5-600 pb), ofrece un mayor poder de resolución, permitiendo la separación de moléculas que difieren en solo un par de bases. Estos geles se corren de forma vertical y su elaboración y manipulación son más complejas.

Los geles de agarosa tienen un menor poder de resolución en comparación con los de poliacrilamida, ya que no pueden separar moléculas de ADN que difieren en menos de aproximadamente 50 pb. Sin embargo, su rango de separación es más amplio (desde 50 pb hasta aproximadamente 40 kb), dependiendo de la concentración del gel (0.3-2% p/v); a menor concentración de agarosa, mayor es el tamaño de las moléculas que se pueden separar, y viceversa. Este amplio rango de tamaños hace que los geles de agarosa sean ideales para analizar productos de digestiones con enzimas de restricción, lo cual se puede combinar con otras técnicas como el Southern blot y también para evaluar los productos de una reacción de PCR. Los geles de agarosa convencionales se corren en una cámara de electroforesis horizontal, donde se aplica un campo eléctrico uniforme y constante.

1.5 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es un rápido procedimiento usado para amplificar un segmento específico de ADN, técnica análoga al proceso de replicación del ADN que tiene lugar en las células. Una de las razones de su éxito es la simplicidad de la reacción y la facilidad para realizar cada una de las etapas, por lo que es usada en análisis de ADN y en los análisis de los procesos celulares y moleculares. Las aplicaciones de esta técnica son muy diversas, estas incluyen la clonación directa del ADN genómico o ADN complementario, mutagénesis in vitro e ingeniería del ADN, ensayos para detectar la presencia de agentes infecciosos, diagnósticos prenatales o enfermedades genéticas, análisis de la variación de secuencias alélicas y la secuenciación directa del ADN genómico y complementario. Para su implementación es necesario conocer las secuencias del ADN que flaquean el fragmento que se desea amplificar, y a partir de esta información se pueden sintetizar químicamente los

oligonucleótidos u oligonucleótidos complementarios a cada una de las hebras de la doble hélice de ADN, Los reactivos requeridos para la PCR incluyen la enzima Taq ADN polimerasa, los eslabones de las hebras de ADN o deoxiribonucleósidos trifosfatos (dNTP's) y al amortiguador apropiado para la enzima, el cual es generalmente optimizado con diferentes concentraciones de magnesio, un cofactor de la reacción de polimerización. Este último elemento es uno de los componentes críticos de la PCR, ya que no solo afecta la enzima, sino también al ensamblaje de los oligonucleótidos. La técnica de PCR incluye tres etapas críticas definidas por tiempos y temperaturas específicas: 1) desnaturalización, 2) alineación y 3) extensión (Figura 4). Cada una de estas etapas es repetida 30-40 veces en ciclos térmicos. En el primer ciclo la doble hélice template o molde es desnaturalizada por calor a una temperatura de 90° C, al separarse las dos hebras de ADN, la región de interés por ser amplificada se vuelve más accesible. La mezcla de reacción es enfriada a una temperatura entre 40-60° C permitiendo que el grueso de las hebras se mantenga separadas, pero a la vez, permitiendo la hibridación de las secuencias pequeñas más homologas presentes, en este caso los oligonucleótidos adicionados, los cuales se encuentran presentes en exceso. Durante la última etapa caracterizada por la temperatura a 72° C, se lleva a cabo la extensión del nuevo ADN, mediante la acción de una ADN polimerasa termoestable, la Taq ADN polimerasa (Hernández Mota., 2009).

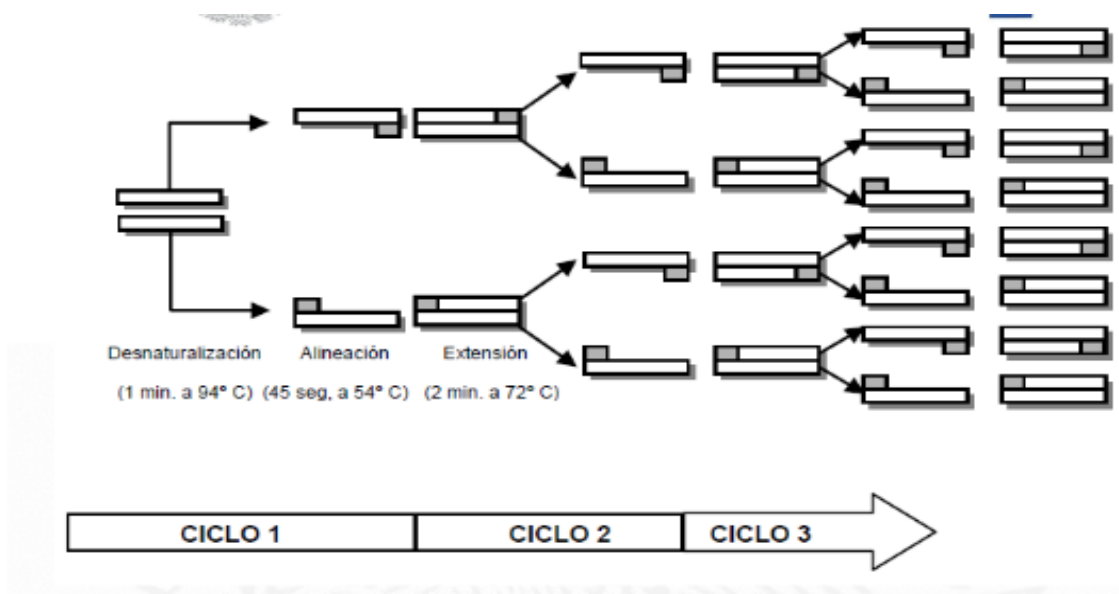


Figura 6. Etapas de la PCR

El avance más significativo en la técnica fue el descubrimiento de las ADN polimerasas termoestables y termoactivas, que mantienen su actividad a altas temperaturas. En 1976 se aisló la primera de estas polimerasas, conocida como Taq polimerasa, a partir de la bacteria *Thermus aquaticus*, que habita en ambientes acuáticos con temperaturas cercanas a los 100 °C. Esta nueva enzima facilitó la simplificación y automatización del proceso de PCR, eliminando la necesidad de agregar polimerasa en cada ciclo. Aunque la Taq polimerasa es la enzima más utilizada en PCR, presenta la desventaja de carecer de actividad “correctora” (actividad nucleasa 3' → 5'), lo que puede dar lugar a errores durante la replicación del ADN. No obstante, se han descubierto ADN polimerasas termoestables, termoactivas y de alta fidelidad (con actividad “correctora”) derivadas de bacterias del dominio Archaea, como la ADN polimerasa Pfu de *Pyrococcus furiosus* (Díaz et al., 2022).

En la actualidad, para llevar a cabo la PCR, se necesita mezclar en microtubos el ADN molde, la ADN polimerasa, los desoxirribonucleótidos (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), una

solución amortiguadora, un cofactor para la polimerasa (generalmente magnesio) y los iniciadores. La reacción se lleva a cabo en dispositivos llamados termocicladores, que se programan para generar los ciclos de temperatura necesarios para la amplificación (Díaz et al., 2022).

1.5.1 Desnaturalización Inicial

Generalmente, la PCR comienza con un ciclo de desnaturalización, donde se separa la doble hélice del ADN al romperse los puentes de hidrógeno. La temperatura y el tiempo para esta etapa dependen de las características del ADN y de la ADN polimerasa utilizada, y por lo general se establece entre 94 y 96 °C durante 5 a 10 minutos.

1.5.2 Ciclos de la PCR

A continuación, se realizan ciclos sucesivos de desnaturalización, alineamiento y extensión, que suelen repetirse entre 25 y 35 veces.

1.5.3 Desnaturalización

Durante esta etapa, es crucial que el ADN molde se desnaturalice por completo. Para lograrlo adecuadamente, se recomienda mantener temperaturas de 94 °C durante 30 segundos a 1 minuto. Si el ADN tiene un alto contenido de guanina y citosina, se sugiere aumentar el tiempo o la temperatura. La actividad de la enzima disminuye rápidamente a partir de los 95 °C, por lo que a estas temperaturas o superiores se aconseja reducir el tiempo de incubación.

1.5.4 Alineamiento

Al bajar la temperatura de incubación, los iniciadores se unen al ADN molde en las zonas 3' complementarias. Ambos iniciadores se unen específicamente al ADN, flanqueando el fragmento que se desea amplificar. La temperatura y el tiempo de esta etapa dependen

de tres factores relacionados con los iniciadores: concentración, número de bases y porcentaje de guanina-citosina. En práctica, la temperatura de alineamiento oscila entre 45 y 65 °C, con un tiempo de incubación de 30 segundos a 1 minuto. Esta temperatura se calcula en función de las características de los oligonucleótidos utilizados. La temperatura a la que la mitad de los oligonucleótidos se unen a su objetivo (T_m) se calcula considerando el tamaño de los oligos y su contenido de GC (%GC). Tras la desnaturalización de las hebras de ADN, se incuba a una temperatura cercana a la T_m para que los oligonucleótidos puedan encontrar y unirse a su región complementaria en el molde.

1.5.5 Extensión

Esta etapa, también conocida como elongación, amplificación o polimerización, implica la síntesis de la nueva cadena de ADN a partir del extremo 3' del iniciador mediante la acción de la ADN polimerasa, que utiliza los cuatro dNTP como sustratos. En la mayoría de las reacciones, la etapa de extensión se lleva a cabo a 72 °C, ya que es la temperatura en la que la Taq polimerasa (la enzima más comúnmente utilizada) muestra su máxima actividad. El tiempo de extensión varía según la longitud del fragmento que se amplifica, dado que la Taq polimerasa puede añadir entre 500 y 1000 nucleótidos por minuto.

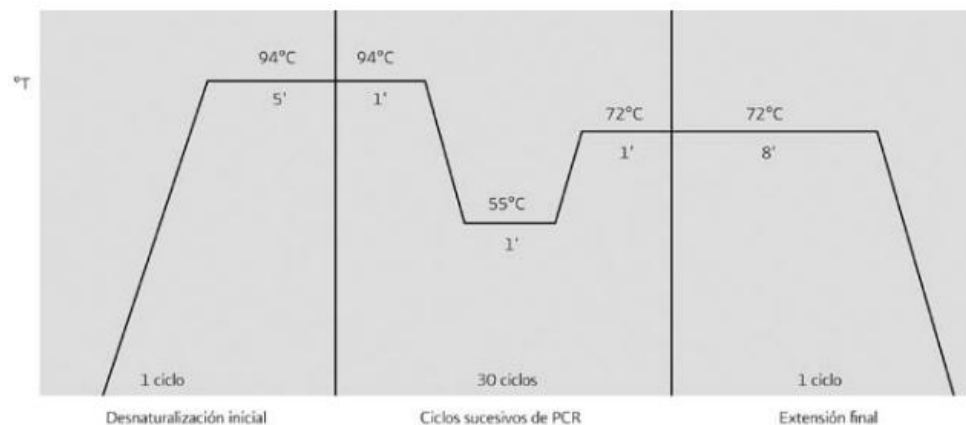


Figura 7. Etapas de la PCR. Temperaturas, tiempos y ciclos estándares

1.5.6 Extension final

1.5.6.1 Condiciones del PCR

Es recomendable comenzar con las mismas condiciones que se han reportado para el oligonucleótido en uso. En el caso de un oligonucleótido diseñado en el laboratorio (o uno no reportado), se puede iniciar la técnica bajo condiciones estándar y, según los resultados, hacer modificaciones si es necesario (tabla 7). Se sugiere comenzar con un número reducido de muestras (por ejemplo, de 5 a 10 ADNss diferentes), y una vez que se haya establecido la PCR, se puede proceder a realizar el experimento con las muestras requeridas (García et al., 2022).

Una recomendación crucial es asegurarse de que la mezcla de PCR sea lo más homogénea posible. Un error común en este proceso se produce al congelar y descongelar los reactivos, ya que esto puede alterar sus concentraciones y/o generar gradientes en los tubos. Para lograr una mezcla homogénea y obtener resultados reproducibles, es fundamental que todos los reactivos se descongelen completamente sobre hielo. Además, para garantizar que se utilice la misma cantidad de cada reactivo en el experimento, se deben invertir los tubos y darles pequeños golpecitos con los dedos; dado que el contenido tiende a quedar adherido a las paredes, se puede utilizar una pico fuga (una centrífuga pequeña) para reunir el líquido, aunque también se puede juntar a mano con sacudidas fuertes hacia abajo, aunque esto último no es tan efectivo. Estas pautas se aplican a todos los reactivos, excepto a la polimerasa, que nunca se retira del congelador a -20°C ; cuando se necesita, se extrae directamente del congelador. Una vez que la mezcla se ha realizado en el tubo y se ha añadido la Taq, se invierte suavemente varias veces (sin generar burbujas, ya que esto puede desnaturalizar la polimerasa) y se coloca la mezcla en la pico fuga. Finalmente, los tubos deben mantenerse en hielo o a 4°C hasta que se introduzcan en el termociclador, para evitar que la polimerasa sintetice fragmentos inespecíficos (García et al., 2022).

1.6 Gen 16 s ribosomal

El ribosoma bacteriano está compuesto por dos subunidades 30S y 50S, la subunidad 30S contiene la molécula de ARNr 16S y la subunidad 50S contiene ARNr 5S y 23S. Los fragmentos 5S, 16S y 23S se han empleado en estudios filogenéticos, siendo el 16S el más adecuado en el estudio de procariotas con cerca de 1550 pares de bases. Los genes ARNr 16S y 23S contienen secuencias conservadas, variables e hipervariables. Actualmente, la secuenciación de los genes ribosómicos 16S es la herramienta más poderosa y fiable en los estudios de relaciones filogenéticas entre bacterias. Esta molécula, considerada un marcador, contiene regiones altamente conservadas y presencia universal. Esta técnica consiste en amplificar los genes por PCR usando iniciadores universales de regiones conservadas a ambos lados del gen. Una vez obtenida la secuencia, puede ser alineada, comparada con las secuencias almacenadas en bases de datos y calculada su similitud (Rodicio *et al.*, 2004). Muchas especies de las BAL han sido identificadas a través de esta técnica.

1.7 Métodos de Analisis del ADN

1.7.1 Cuantificacion del ADN

Una vez obtenido el material genético, es crucial evaluar el rendimiento mediante espectrofotometría. La ley de Beer-Lambert establece que la concentración de una molécula en solución está relacionada con la cantidad de luz absorbida por las moléculas disueltas. Una de las características del ADN es su capacidad para absorber luz ultravioleta (UV) a 260 nm, lo que permite estimar su concentración a través de espectrofotometría. Cuando la longitud de la celda que contiene el ADN es de 1 cm, la absorbancia se iguala a la densidad óptica (DO). Para el ADN genómico o de doble cadena, una densidad óptica de 1 equivale a 50 µg/ml. Es fundamental tener en cuenta el factor de dilución para convertir la concentración a nanogramos por microlitro (ng/µl). Con algunos equipos, como el espectrofotómetro NanoDrop, no es necesario diluir la muestra, ya que el equipo proporciona directamente la concentración en ng/µl. Dado que para una reacción de PCR se requieren entre 10 y 200 ng, es necesario alcanzar al

menos 5 ng/μl de ADN en cada muestra. Si se recuperan 50 μl, el rendimiento neto de la extracción sería de 0.25 μg. Concentraciones más bajas complican la estandarización de la PCR y otras técnicas. Para evaluar la pureza del ADN, se compara la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Se considera que una proporción de 1.8 indica ADN puro, mientras que proporciones inferiores sugieren la presencia de proteínas. Otra medida para valorar la pureza de los ácidos nucleicos es la relación 260/230, cuyos valores aceptables oscilan entre 2.0 y 2.2; una relación inferior indica la presencia de contaminantes como carbohidratos o fenol (Velázquez et al., 2009).

1.7.2 Comprobación del ADN mediante electroforesis.

Además de conocer la cantidad y calidad del ADN por espectrofotometría, es importante conocer si el ADN obtenido está integro. La integridad del ADN se puede observar mediante electroforesis en gel de agarosa. Si el ADN está integro, se debe observar una banda estrecha cercana al pozo en que se colocó la mezcla de ADN. Si está fragmentado, se observará una banda de más de un cm de ancho o un sendero luminoso en el carril de la muestra (Figura 7). El ADN fragmentado dificulta la amplificación de productos de PCR de alto peso molecular y afecta la reproducibilidad de las técnicas. (Velázquez *et al.*, 2009).

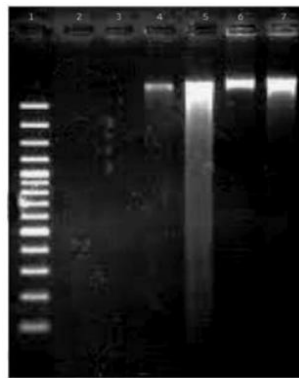


Figura 8. Gel de agarosa para visualizar la integridad del ADN. Carril 1. Marcador de peso molecular, carril 2 y 3 vacíos, carril 4 y 7 muestras con poca fragmentación, carril 5 muestra fragmentado. Carril 6 muestra íntegra.

La idea es poder analizar el o los fragmentos obtenidos en el PCR, y la electroforesis, ya sea en geles de agarosa o de acrilamida, permite separar estos fragmentos de acuerdo al

tamaño de cada uno. Tanto la agarosa como la acrilamida forman una especie de red con agujeros de tamaños diferentes, por la cual obligamos a pasar los fragmentos de ADN, “jalándolos” a través de corriente eléctrica, hacia el polo positivo, ya que la carga de una molécula de ADN es negativa por la presencia de grupos fosfato (P⁻). Los fragmentos más pequeños pasarán primero a través de la red de agujeros, mientras que los más grandes se irán retrasando y atorando en los hoyos; de esta manera los fragmentos de tamaños similares migrarán a ritmos similares. Si hay muchos fragmentos de un mismo tamaño se agruparán todos juntos, por lo que podremos verlos formando lo que llamamos una banda en el gel. García *et al.*, 2022).

1.7.3 Secuenciación de Ácidos nucleicos.

Inicialmente, se creía que la secuenciación de ácidos nucleicos era considerablemente más complicada que la de las proteínas, lo que provocó escaso avance hasta la década de 1960. Esto se debió, en parte, a la falta de sustratos puros de tamaño adecuado para desarrollar métodos eficaces, así como a la complejidad de los ácidos nucleicos. Se pensaba que la interpretación de los resultados de la secuenciación de ácidos nucleicos, que consisten en cuatro monómeros, sería más desafiante que la de las proteínas, que contienen 20 aminoácidos; por lo tanto, se requería el aislamiento de productos de degradación de mayor tamaño para poder superponerlos y deducir sus secuencias. Sin embargo, tener solo cuatro componentes se consideraba una ventaja para facilitar los análisis finales. Al principio, la principal dificultad era la interpretación de los resultados, pero a medida que las técnicas mejoraron y se empezaron a estudiar moléculas más largas, la complejidad del análisis se volvió más relevante. Actualmente, la secuenciación de ácidos nucleicos es más rápida y sencilla que la de proteínas (Necochea et al., 2004).

La estrategia básica para la secuenciación de ácidos nucleicos es similar a la utilizada para las proteínas. Esta incluye: 1) la degradación específica y fraccionamiento de los polinucleótidos de interés en fragmentos suficientemente pequeños para ser secuenciados; 2) la secuenciación de esos fragmentos pequeños; y 3) el ordenamiento de los fragmentos a través de la repetición de los pasos anteriores, utilizando un procedimiento de degradación que genera una serie de fragmentos de polinucleótidos que se superponen en los puntos de corte de la serie inicial.

En 1977, se introdujeron dos protocolos para la secuenciación de ADN. El primero fue el método de Maxam y Gilbert. Este método, al igual que el de Sanger, genera una autoradiografía que permite leer una secuencia. Sin embargo, en este caso, se determina la secuencia de una molécula de ADN utilizando reactivos químicos que cortan fragmentos marcados en sus extremos 5'. El segundo método es el de Sanger, que utiliza una hebra de ADN de cadena sencilla como plantilla para sintetizar la hebra complementaria, la cual se termina en posiciones específicas. En ambos métodos, la secuencia de la molécula se establece a partir de las diferencias en los tamaños de los fragmentos generados (Necochea et al., 2004).

1.8 Analisis de secuencias en programas bioinformáticos

Podemos definir la Bioinformática como la aplicación de tecnología informática para la gestión y el análisis de datos biológicos. Por otra parte, El Instituto Nacional de Salud (NIH) de Estados Unidos utiliza una definición más completa y define a la bioinformática como la investigación, el desarrollo o aplicación de herramientas computacionales y enfoques informáticos para ampliar el uso de datos médicos, de salud o de comportamiento biológico,

incluidas las competencias de adquirir, almacenar, organizar, archivar, analizar o visualizar estos datos. Por lo tanto, no podemos obviar que la bioinformática se ha convertido en una disciplina excepcional, ya que permite a los científicos descifrar y gestionar las enormes cantidades de datos que se generan a diario o que ya están disponibles. (Lopera et al., 2008).

1.8.1 BLAST (Basic Local Alignment search tool).

BLAST o “Basic Local Alignment Search Tool” es posiblemente la herramienta bioinformática más popular. El programa fue creado por Eugene Myers, Stephen Altschul, Warren Gish, David J. Lipman y Webb Miller en el NCBI (National Center for Biotechnology Information) y publicado en 1990, convirtiéndose en uno de los artículos más citados de la década de los 90 (en la actualidad tiene más de 32.000 referencias). La característica que distingue a BLAST de herramientas más tradicionales, como Smith-Waterman, es su énfasis en reducir el tiempo necesario para realizar el alineamiento local, a cambio de sacrificar la sensibilidad. Dicha eficiencia temporal se logra gracias al uso de un algoritmo heurístico, no garantizándose, por tanto, el descubrimiento de la solución (alineamiento) óptimo. (Carrión, 2011)

El propio NCBI proporciona una versión de código abierto del programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Este hecho ha permitido la aparición de un gran número de variantes, desde optimizaciones hasta implementaciones ad-hoc que resuelven con soltura determinados problemas. Asimismo, el NCBI tiene habilitado un servidor web público que permite realizar búsquedas contra las bases de datos contenidas en el NCBI. Aunque, de esta manera, se garantiza que las bases de datos utilizadas están actualizadas, el uso limitado del servidor impide alinear un gran número de secuencias. Para hacer uso de BLAST, en primer lugar, es necesario conocer sus parámetros principales. Por un lado, están los diferentes tipos de programas integrados en la herramienta. Hay un total de cinco programas BLAST diferentes, los cuales se pueden distinguir por el tipo de secuencia a buscar (ADN o proteína) y el tipo de base de datos contra la que se hace la búsqueda:

- BLASTP compara una secuencia de aminoácidos contra una base de datos de proteínas.
- BLASTN compara una secuencia de nucleótidos contra una base de datos de nucleótidos.
- BLASTX compara una secuencia de nucleótidos contra una base de datos de proteínas.
- TBLASTN compara una proteína contra una base de datos de nucleótidos.
- TBLASTX compara una secuencia de un nucleótido contra una base de datos de nucleótidos.

Además de la base de datos a utilizar, también es necesario especificar la base de datos sobre la que se quiere realizar la búsqueda. Una de las más utilizadas es la base de datos nr (colección de secuencias „no redundantes” de GenBank y otros bancos de secuencias). El otro parámetro fundamental es la secuencia de entrada, o fichero con las secuencias de entrada. Dichas secuencias deben estar en el formato estándar denominado FASTA o GI (número de registro asociado a la secuencia, en caso de tenerlo (Carrión , 2011).

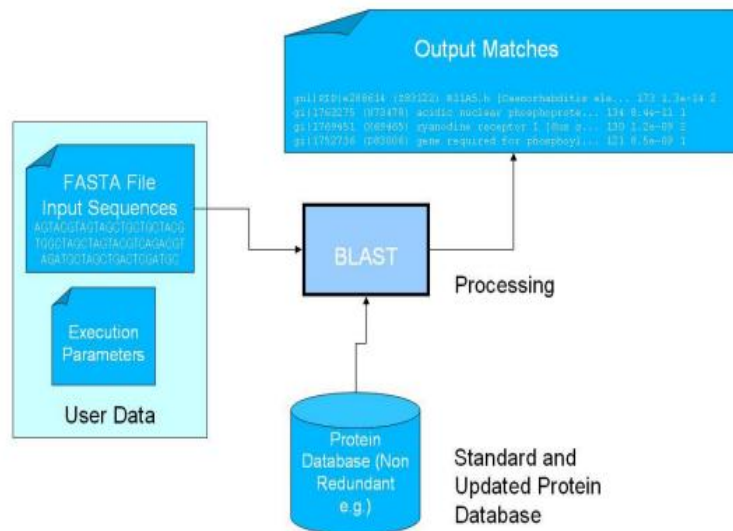


Figura 9. Proceso BLAST genérico

1.9 Crecimiento microbiano y preinóculo

El crecimiento bacteriano inicia al inocular nutrientes con una pequeña cantidad de células. Durante el crecimiento bacteriano se identifican claramente cuatro fases. Una fase de latencia en la cual los microorganismos se adaptan al medio en el cual iniciarán la fase de crecimiento exponencial, durante esta fase el crecimiento bacteriano es máxima y es la más importante durante todo el proceso de producción. Al presentarse un agotamiento de los nutrientes iniciales se inicia una fase estacionaria donde los microorganismos limitan su crecimiento y posteriormente entran a la fase de muerte

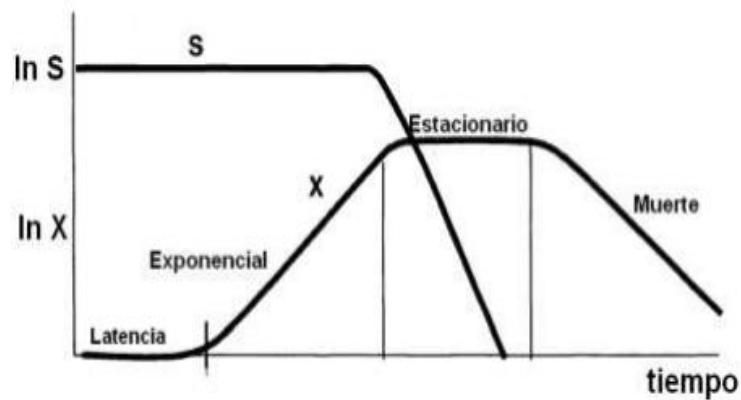


Figura 10. Concentración de biomasa y sustrato. Fuente: Dunn 2003.

Otro factor de suma importancia en la fermentación de azúcares es la preparación del preinóculo e inóculo, esto quiere decir que para obtener rendimientos altos de etanol se debe utilizar un inóculo adaptado a el medio de cultivo y a las condiciones de temperatura, pH y agitación a las que se llevará a cabo la fermentación (Doelle *et al.*, 1993).

1.10 Tolerancia a etanol

1.10.1 ¿Qué es la tolerancia al etanol?

La tolerancia al etanol se refiere a la capacidad de ciertos microorganismos, como las bacterias lácticas, para sobrevivir y proliferar en entornos con concentraciones significativas de etanol. Esta tolerancia es crucial en varios procesos industriales, especialmente en la fermentación alcohólica, donde el etanol es un subproducto clave. La concentración de etanol en el medio puede afectar de manera significativa la viabilidad y la actividad metabólica de las bacterias, lo que hace que la tolerancia al etanol sea un rasgo deseable en organismos que participan en procesos fermentativos. (Papadimitriou *et al.*, 2016).

La respuesta bacteriana al estrés por alcohol se ha estudiado durante más de 40 años, y el efecto fisiológico del estrés por alcohol ha sido bien descrito. Estos estudios investigaron principalmente los mecanismos por los cuales los compuestos alcohólicos afectan la membrana bacteriana. Por ejemplo, los alcoholes interactúan directamente con la bicapa lipídica debido a su anfipilicidad, y la fluidez de la membrana se altera por la inserción de alcoholes en las membranas celulares (Ingram 1976).

Este daño a la membrana causa varias perturbaciones a las células, como fuga de iones o pérdida de energía. La modificación de la composición de la membrana mediante

manipulación genética también confiere tolerancia al alcohol (Luo *et al.* 2009). Estos estudios ilustran que modificar la composición de la membrana puede mitigar parcialmente la toxicidad de los alcoholes.

1.10.2 ¿En qué se basa?

Wang *et al.*, 2022 menciona que la base de la tolerancia al etanol en bacterias lácticas está en la capacidad de estas células para resistir los efectos dañinos del etanol en su membrana celular, enzimáticas y otros procesos intracelulares. El etanol puede causar daño celular al aumentar la permeabilidad de la membrana, desnaturalizar proteínas y alterar el equilibrio de los ácidos grasos en la membrana. Las bacterias que presentan tolerancia al etanol han desarrollado mecanismos para mitigar estos efectos, tales como:

- Modificación de la membrana celular: Alteraciones en la composición de ácidos grasos de la membrana para mantener su integridad y funcionalidad en presencia de etanol.
- Expulsión de etanol: Algunos microorganismos pueden usar bombas de eflujo para expulsar el etanol fuera de la célula, reduciendo así su concentración intracelular.
- Protección de proteínas: Producción de chaperonas moleculares que ayudan a las proteínas a mantener su estructura y función a pesar de las condiciones estresantes inducidas por el etanol.

Además del comportamiento de estrés cruzado, la adquisición de tolerancia al estrés en células bacterianas a veces va acompañada de un "costo de aptitud", una reducción de

la aptitud (crecimiento o viabilidad en este caso) en ausencia de estrés. Este fenómeno está bien estudiado en el campo de la resistencia a los antibióticos en bacterias (Andersson y Hughes 2010).

La aptitud en ausencia de estrés es importante para la producción de biocombustibles y la tolerancia al alcohol. Un posible enfoque para superar este problema es mejorar la aptitud en la condición de cultivo (p. ej., medio, temperatura, escala de cultivo), que no depende de la presencia o ausencia de estrés por alcohol. (Jian *et al.*, 2012).

Los compuestos alcohólicos activan varias redes de respuesta al estrés , por ejemplo, los mecanismos reguladores del estrés de la envoltura, el estrés oxidativo y el ciclo respiratorio se ven afectados por los alcoholes. Estas respuestas son inducidas por el daño de la membrana y los cambios fisiológicos del estado celular (por ejemplo, cambios en la fluidez de la membrana, mal plegamiento de proteínas, fuga de iones). Para establecer una estrategia racional para mejorar la tolerancia bacteriana al alcohol, es necesario comprender las actividades celulares relacionadas con la toxicidad del alcohol. Creemos que los avances en las tecnologías ómicas, incluidas las tecnologías transcriptómicas, proteómicas, metabolómicas y genómicas, pueden ayudarnos a comprender el impacto del estrés alcohólico bacteriano. (Garbe *et al.*, 2001).

1.10.3 ¿Quiénes la presentan?

La tolerancia al etanol es un rasgo común en muchas bacterias lácticas, que son un grupo heterogéneo de bacterias Gram-positivas, no esporuladas, aerotolerantes o anaeróbicas facultativas, que producen ácido láctico como principal producto de la fermentación de carbohidratos. Específicamente, especies como *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, y *Pediococcus* han demostrado una notable capacidad para tolerar altos niveles de etanol, lo que las hace valiosas en la producción de alimentos y bebidas fermentadas, como el vino, la cerveza y productos lácteos. (Papadimitriou *et al.*, 2016).

Los microorganismos son capaces de producir alcoholes, lo que los convierte en una fuente importante de energía alternativa que puede reemplazar a los combustibles fósiles. Sin embargo, estos alcoholes pueden ser tóxicos para los propios microorganismos ya que retardan o inhiben el crecimiento celular y disminuyen el rendimiento de la producción. Una solución es mejorar la tolerancia al alcohol de dichos organismos productores de alcohol. (Horinouchi, *et al* .,2018).

La tolerancia al alcohol de las bacterias es generalmente inferior a la de la levadura; por lo tanto, la toxicidad del alcohol es un problema más grave para la bioproducción con bacterias. Una estrategia para superar este problema es desarrollar cepas que tengan tolerancia a los compuestos objetivo. (Horinouchi, *et al* .,2018).

1.10.4 ¿Qué ventajas les confiere?

La capacidad de tolerar etanol confiere varias ventajas competitivas a las bacterias lácticas en entornos fermentativos :(Wang 2022).

- Supervivencia en entornos hostiles: La tolerancia al etanol permite a estas bacterias sobrevivir y continuar metabolizando en ambientes donde otras bacterias podrían sucumbir debido a la toxicidad del etanol.
- Contribución al proceso fermentativo: Las bacterias lácticas que toleran el etanol pueden coexistir con levaduras durante la fermentación alcohólica, contribuyendo a la complejidad del sabor y la textura de productos como el vino y la cerveza.

- Competencia ecológica: En ambientes fermentativos donde se acumula etanol, las bacterias que pueden tolerarlo tienen una ventaja selectiva sobre aquellas que no pueden, permitiéndoles dominar el ecosistema microbiano.

La pared celular es un objetivo importante en nuestra lucha contra las bacterias patógenas, incluidas las bacterias lácticas patógenas. La síntesis de la pared celular puede inhibirse mediante antibióticos que bloquean ciertos pasos enzimáticos o capturan uno de los precursores (Silver 2003).

Las bacterias probióticas empleadas para aplicaciones que pueden favorecer la salud son principalmente lactobacilos, que se enfrentan a una variedad de factores de estrés durante su producción y uso. Antes de que una bacteria probiótica comience a cumplir su función biológica en el intestino, debe sobrevivir a una serie de desafíos ambientales (Mills *et al.*, 2011). Inicialmente, las bacterias probióticas deben procesarse en una forma de producto adecuada para permitir el consumo oral en cantidades adecuadas, y luego deben sobrevivir a las duras condiciones impuestas durante su paso por el tracto gastrointestinal (Corcoran *et al.*, 2008). Aunque no se consideran estrictamente probióticos, cada vez hay más pruebas de que las bacterias muertas aún pueden tener un efecto promotor de la salud (Lew *et al.*, 2013).

La envoltura celular es la barrera física que separa la célula de su entorno y, como tal, la primera línea de defensa contra las perturbaciones ambientales. Se ha demostrado que los cambios en la composición química tanto de la pared celular como de la membrana celular desencadenados por el estrés ayudan a la supervivencia celular. Mantener la integridad de la pared celular en condiciones de estrés es una cuestión de vida o muerte para las bacterias. La envoltura celular también es un orgánulo celular importante con varias funciones fisiológicas. Por lo tanto, no es sorprendente que la envoltura celular sea el objetivo directo de una multitud de antimicrobianos (Bush 2012). En los últimos años, se ha demostrado que las LAB, al igual que otras bacterias, controlan de cerca la integridad de la envoltura celular y que se inducen mecanismos de reparación especializados en caso de daño (Jordan *et al.*, 2008).

CAPITULO 2. MATERIALES Y METODOS .

2.1 Obtención de la muestra

Se obtuvieron muestras (mostos) del palenque Teozacoalco, Las palmas, San Pablo Etla, San Dionisio de diferentes agaves, diferente tiempo de fermentación y diferente pH, según el método desarrollado por Espinoza *et al.*, 2021.

2.2 Aislamiento por métodos de diluciones

Las muestras de los mostos de fermentación se recogieron de forma aséptica directamente de la fermentación en cada uno de los cuatro palenques. Los sitios en los que se realizó el estudio fueron los siguientes: palenque 1 ubicado en el municipio de San Dionisio Ocotepec, con una altitud de 1620 msnm (16°46'01.100 N, 96°22'01.100 O); palenque 2 en San Pablo Etla con una altitud de 1726 m.s.n.m. (17°09'01.400 N y 96°44'04.900 W); y el palenque 3 en el Río de Las Palmas Coixtlahuaca perteneciente al municipio de Concepción Buenavista con una altitud de 1734 msnm (17°57'04.300 N y 97°27'02.500 W). Finalmente, el palenque 4 correspondió al municipio de San Pedro Teozacoalco con una altitud de 1586 msnm (17°01'00.100 N y 97°17'01.200 W). La temperatura, el pH, y los sólidos solubles totales de cada uno de los recipientes de fermentación se determinaron in situ.

Las muestras se refrigeraron a 4 °C hasta su procesamiento. Las muestras de mosto se llevaron al laboratorio de control ambiental del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica del Tecnológico Nacional de México. Ingeniería Química y Bioquímica del Tecnológico Nacional de México, en el campus Oaxaca.

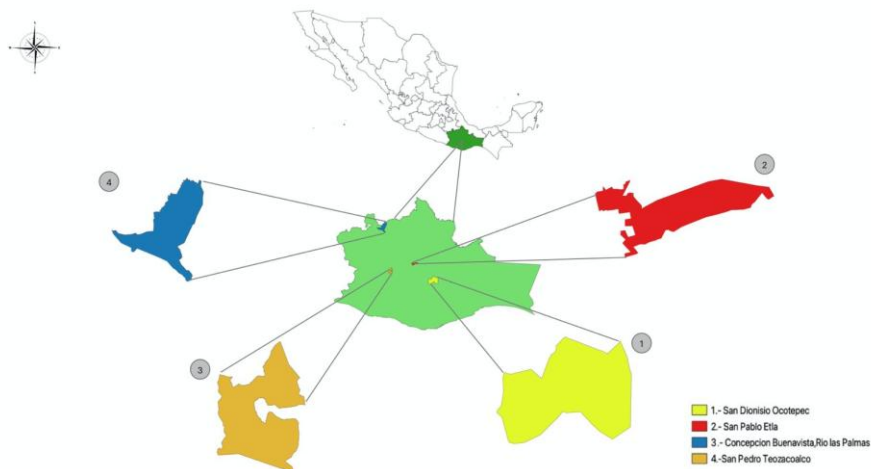


Figura 11. Localización de los palenques en Oaxaca

La técnica para el aislamiento es el de diluciones seriadas en agua peptonada estéril al 1% tomando de las diluciones 1×10^{-4} y 1×10^{-5} , 50 μ l para siembra en cajas Petri en el medio de crecimiento agar WLD. Las cajas se incubaron a 35 °C por 3 días en una incubadora marca ECOSHEL modelo 9052L y se seleccionaron las cepas que por morfología macroscópica observada en un microscopio estereoscópico SWIFT MA725 presentaran las características siguientes: colonias redondas, bordes regulares y pequeñas. (Murray 2021).

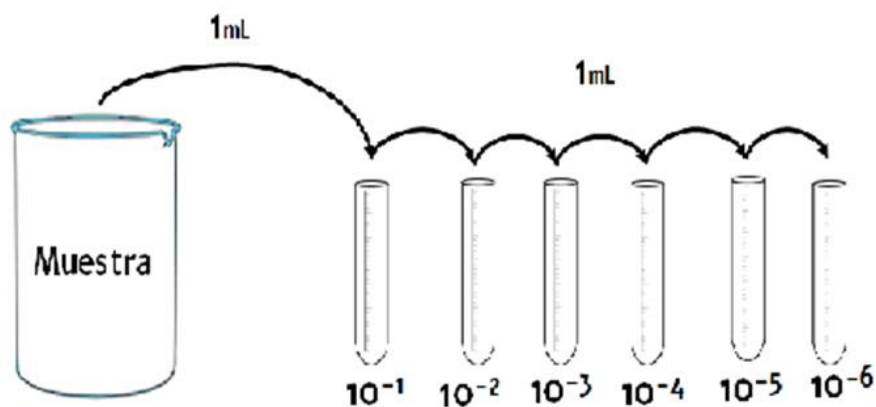


Figura 12. Procedimiento del método de diluciones

2.3 Aislamiento en medio selectivo para la BAL

Cada colonia se sembró en el medio MRS por técnica de estría cruzada en cuatro cuadrantes por agotamiento hasta obtener cultivo axénico

Tabla 1. Composición química del medio MRS selectivo para bacterias lácticas

COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO SLECTIVO PARA BACTERIAS LÁCTICAS MAN ROGOSE & SHARPE	
(gr/L)	
Dextrosa	20.0 g/l
Peptona bacteriológica	10.0 g/l
Extracto de carne	8.0 g/l
Acetato de sodio	5.0 g/l
Extracto de levadura	4.0 g/l
Fosfato dipotásico	2.0 g/l
Tween 80	1.0 g/l
Citrato de amonio	2.0 g/l
Sulfato de magnesio	0.2 g/l
Sulfato de Manganeso	0.05 g/l
Agar bacteriológico	25 g/l

2.4 Morfología microscópica

Se realizó en un microscopio óptico marca Brand VELABTM, Modelo VE-B10; mediante tinción Gram; las cuales corresponden a Gram +, siendo bacilos, cocos, cocos en forma de cadena no esporuladas.

El tamaño de las colonias bacterianas es uniforme entre una misma especie.

- La forma está determinada por los bordes y el grosor de la colonia.
- El borde puede ser liso o rugoso e irregular; la colonia, abultada o plana.
- La textura de la colonia es también importante. Puede variar desde seca a viscosa, con superficie lisa o granular.

2.5 Pruebas bioquímicas y aislamientos dirigidos de las BAL.

Las pruebas bioquímicas consisten en distintos test químicos aplicados a un medio biológico en los cuales es conocida su reacción, nos permite identificar distintos microorganismos presentes. Su sistema de funcionamiento generalmente consiste en determinar la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se le incorpora a un medio de cultivo y que la bacteria al crecer incorpora o no.

Se emplea a para la identificación de forma clara y precisa, la cual por la presencia de o ausencia de una enzima, de un grupo de enzimas o de una vía metabólica completa en uno o más microorganismo se utilizan principalmente para identificar y clasificar bacterias.

2.5.1 Fermentación Heteroláctica y Homoláctica.

Se elaboro medio mejorado propuesto por Zúñiga et al. (1993) denominado como medio M5 compuesto por:

Tabla 2. Medio M5 g/l

Compuesto	Cantidad
-----------	----------

<i>Triptona</i>	1.6 g
<i>Extracto de levadura</i>	0.8 g
<i>Fructosa</i>	0.4 g
<i>Fosfato de potasio monobásico</i>	0.4 g
<i>Tween 80</i>	0.16 ml
<i>Sulfato de magnesio heptahidratado</i>	0.032 g
<i>Sulfato de manganeso monohidratado</i>	0.008 g
<i>Verde de bromocresol</i>	0.0106 g
<i>Agar técnico</i>	25 g

Se ajusta el pH a 6.5 se esteriliza bajo una presión de 15 lb durante 20 minutos se inocularon las bacterias además se incubaron en una temperatura de 28 °C durante un periodo de 48 horas. Se consideran BAL homolácticas si el medio azul vira a amarillo y serán BAL heterolácticas si el medio permanece azul.

2.5.2 Crecimiento en M17

Tabla 3. Crecimiento en M17

<i>Compuesto</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Acido ascórbico</i>	0.15 g
<i>Extracto de carne</i>	0.15 g
<i>Lactosa</i>	1.5 g
<i>Peptona de carne</i>	0.75 g
<i>Agra técnico</i>	7.5 g
<i>Peptona de caseína</i>	2.25 g
<i>Sulfato magnésico</i>	0.075 g
<i>Fosfato de sodio monohidratado</i>	5.7 g
<i>Extracto de levadura</i>	0.75 g

Se esteriliza con una presión de 12 a 14 lb durante 15 minutos además se ajustar el pH a 7 hasta 7.4 con una temperatura de 28 a 30°C con periodo de tiempo de 48 horas. Sin embargo, así como peptona de carne y caseína, el extracto de carne de vaca, proporcionan nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El extracto de levadura es la fuente de vitaminas, particularmente del grupo B. La lactosa es el carbohidrato que actúa como fuente de energía. El ácido ascórbico estimula el crecimiento de estreptococos (*Lactococcus lactis*). El sulfato de magnesio proporciona iones esenciales para el crecimiento. El agar es el agente solidificante.

2.5.3 Formación de $C O_2$ en caldo MRS

Se disuelven los gramos correspondientes del caldo MRS en agua destilada, se colocaron 5 ml en tubos de ensayo y se le agregaron campanas de Durham, se esterilizarán a 10 lb por 10 minutos. Se inoculan las BAL con la ayuda de un haza de platino y se incubaron a 35 °C durante un periodo de 72 horas, la formación de una burbuja en la campana de Durham indicará la formación de Gas.

2.5.4 Prueba de la catalase

Para la realización de la prueba se opta por realizar un frotis en el portaobjetos con las células de las bacterias y se agregó unas gotas de peróxido de hidrogeno al 30% a las BAL, si se observa un burbujeo indicará la presencia de la enzima catalasa.

2.5.5 Fermentación de carbohidratos

Se prepara 20 ml del carbohidrato a fermentar a una concentración del 1% en caldo rojo base de fenol, se disolvieron con la ayuda de un agitador magnético en una parrilla de agitación. Los azúcares que se esterilizaron por filtración con la ayuda de un filtro bacteriológico y una jeringa de 3 ml fueron Glucosa, Lactosa, Galactosa, Sacarosa, Fructosa, Manitol. A los tubos con se les colocó una campana Durham invertida para detectar producción de gas.

2.5.6 Reducción de nitratos

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

2.5.7 Oxidasa

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromo oxidasa sólo se encuentra en las bacterias aerobias, algunas anaerobias facultativas y, excepcionalmente, en algún microaerófilo (*Vibrio fetus*), pero las bacterias anaerobias estrictas carecen de actividad oxidasa. Asimismo, la presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que esta degrada el peróxido de hidrógeno que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica.

Adicionar sobre el crecimiento de una colonia de un cultivo del microorganismo unas gotas del reactivo para oxidasa (clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%) y observar si la colonia tiende a cambiar de color (rosa-rojo-negro); la presencia de estos colores señala la positividad de la prueba (Macfarland, 1990).

2.5.8 Medio Litmus Milk

Actividad proteolítica-acidificante: La determinación de la actividad proteolítica-acidificante para cada una de las cepas lácticas autóctonas se determina en tubos de ensayo con 10 mL de medio Litmus Milk BD Difco® (Becton Dickinson France S.A., Le Pont de Claix, Francia), el cual se inoculó con 200 µL de una suspensión bacteriana a una concentración 3 MacFarland (9.0×10^8 UFC/mL). La incubación se efectuó durante 7 días a 30°C, realizando la lectura diaria de los tubos (Nikolic *et al.*, 2008). La diferenciación se basa en la producción de ácidos y en la coagulación y/o proteólisis de caseína por acción de las bacterias lácticas. La adición a la leche del "Litmus", un indicador de pH y óxido-reducción, extiende su utilidad como medio diferencial permitiendo observar diferentes reacciones. La reacción es ácida cuando el medio vira de azul-púrpura a rosado-rojo debido a la fermentación de la lactosa y la glucosa. La reacción es alcalina cuando el microorganismo ataca las sustancias nitrogenadas presentes en el medio, formando amoníaco o aminas, el color del medio permanece sin cambios. Mientras que la reducción ocurre cuando el oxígeno es eliminado del "Litmus" por acción de la enzima reductasa, generándose una decoloración del medio. Por otro lado la coagulación indica la precipitación de la caseína por acción ácida y en la digestión se observa una clarificación del medio y la disolución de la cuajada por digestión de la caseína.

2.5.9 Crecimiento en agar LBS

LBS Agar (también conocido como Rogosa Agar) es un medio semidefinido parcialmente selectivo para el aislamiento y recuento de lactobacilos a partir de alimentos y flora intestinal, vaginal y dental. Contiene los siguientes compuestos:

Tabla 4. Componentes del Agar LBS

Compuesto	Cantidad (Gramos/ litros)
Pancreático de Caseína	10.0 g/l
Hidrato de acetato de sodio	25.0 g/l
Extracto de levadura	5.0 g/l
Acido Acético	1.3 ml
Fosfato monopotásico	6.0 g/l
Sulfato magnésico	0.575 g/l
Citrato de amonio	2.0 g/l
Sulfato de manganeso	0.12 g/l
Glucosa	20.0 g/l
Sulfato ferroso	0.034 g/l
Polisorbato 80	1 ml
Agar	15.0 g/l

2.6 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN molecular, nos basamos en un kit de ZymoResearch para bacterias. A continuación se detalla el proceso indicado en el Kit de biología molecular.

Para un rendimiento óptimo, Se agrego beta-mercaptoetanol (suministrado por el usuario) al tampón de lisis genómica hasta una dilución final de 0,5 % (v/v), es decir, 500 µl por 100 ml.

1. Agregamos de 50 a 100 mg (peso húmedo) de células fúngicas o bacterianas¹ que hayan sido resuspendido en hasta 200 µl de agua o tampón isotónico (p. ej., PBS) para un tubo de lisis ZR BashingBead™ (0,1 mm y 0,5 mm). Agregar 750 µl Tampón BashingBead™ al tubo².
2. Asegúrarlo en un batidor de cuentas equipado con un soporte para tubos de 2 ml y procese a máxima velocidad durante ≥ 5 minutos.

Nota: El tiempo de procesamiento requerido variará según el dispositivo y la aplicación y por lo tanto, debe evaluarse caso por caso.

Por ejemplo, los tiempos de procesamiento pueden ser de tan solo 3 minutos cuando se utiliza una celda de alta velocidad. disruptores (p. ej., el procesador de muestras portátil TerraLyzer™, FastPrep® -24 o similar) o hasta 20 minutos cuando se usan velocidades más bajas (por ejemplo, Disruptor Genie™ o vórtices de sobremesa estándar). Consulte la documentación del fabricante para obtener información sobre el funcionamiento.

3. Centrifugamos el tubo de lisis ZR BashingBead™ (0,1 y 0,5 mm) en un microcentrífuga a 10.000 x g durante 1 minuto.
4. Transferimos hasta 400 µl de sobrenadante a un filtro Zymo-Spin™ III-F en un Tubo de recogida y centrifugar a 8.000 x g durante 1 minuto.
5. Agregamos 1200 µl de tampón de lisis genómica al filtrado en el tubo de recolección. del Paso 4.
6. Transferimos 800 µl de la mezcla del paso 5 a una columna Zymo-Spin™ IICR3 en un tubo de recogida y centrifugar a 10.000 x g durante 1 minuto.
7. Desechamos el flujo del tubo de recolección y repita el paso 6.
8. Agregamos 200 µl de tampón de prelavado de ADN a la columna Zymo-Spin™ IICR en un tubo de recolección nuevo y centrifugue a 10 000 x g durante 1 minuto.
9. Agregamos 500 µl de g-DNA Wash Buffer a la columna Zymo-Spin™ IICR y centrifugar a 10.000 x g durante 1 minuto.
10. Transferimos la columna Zymo-Spin™ IICR a una columna limpia de 1,5 ml. tubo de microcentrífuga y agregue 100 µl (35 µl mínimo) de elución de ADN Buffer directamente a la matriz de columna. Centrifuga a 10,000 x g por 30 segundos para eluir el ADN.

El ADN ultrapuro ya está listo para usar en sus experimentos.

2.7 PCR

El programa de termociclaje consiste en un ciclo a 95 °C por dos minutos, 30 ciclos [95 °C, un minuto, 56 °C, un minuto; 72 °C, uno punto cinco minutos] y un ciclo de extensión final de 72 °C por cinco minutos.

Polymerase chain reaction - PCR

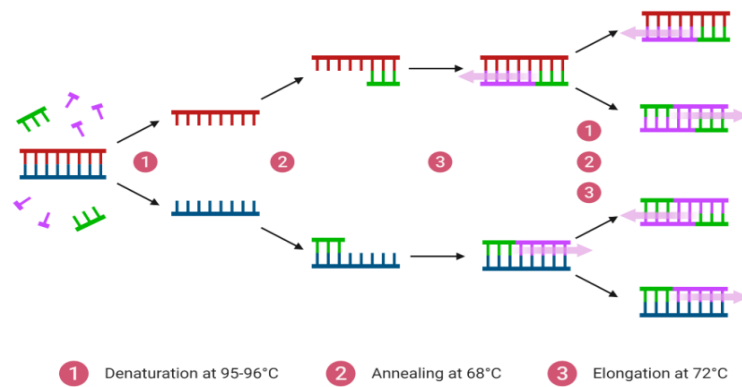


Figura 13. Reacción en cadena de la polimerasa . Fuente Biorender 2023

CAPITULO 3. RESULTADOS

A continuación, se muestra la caracterización macro y microscópica de los 4 palenques trabajados.

3.1 Muestreo

Las muestras de los mostos de fermentación se recogieron de forma aséptica directamente de la fermentación en cada uno de los cuatro palenques. Los sitios en los que se realizó el estudio fueron los siguientes: palenque 1 ubicado en el municipio de San Dionisio Ocotepec, con una altitud de 1620 msnm (16°46'01.100 N, 96°22'01.100 O); palenque 2 en San Pablo Etla con una altitud de 1726 m.s.n.m. (17°09'01.400 N y 96°44'04.900 W); y el palenque 3 en el Río de Las Palmas Coixtlahuaca perteneciente al municipio de Concepción Buenavista con una altitud de 1734 msnm (17°57'04.300 N y 97°27'02.500 W). Finalmente, el palenque 4 correspondió al municipio de San Pedro Teozacoalco con una altitud de 1586 msnm (17°01'00.100 N y 97°17'01.200 W). La temperatura, el pH, y los sólidos solubles totales de cada uno de los recipientes de fermentación se determinaron in situ.

Las muestras se refrigeraron a 4 °C hasta su procesamiento. Las muestras de mosto se llevaron al laboratorio de control ambiental del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica del Tecnológico Nacional de México. Ingeniería Química y Bioquímica del Tecnológico Nacional de México, en el campus Oaxaca.

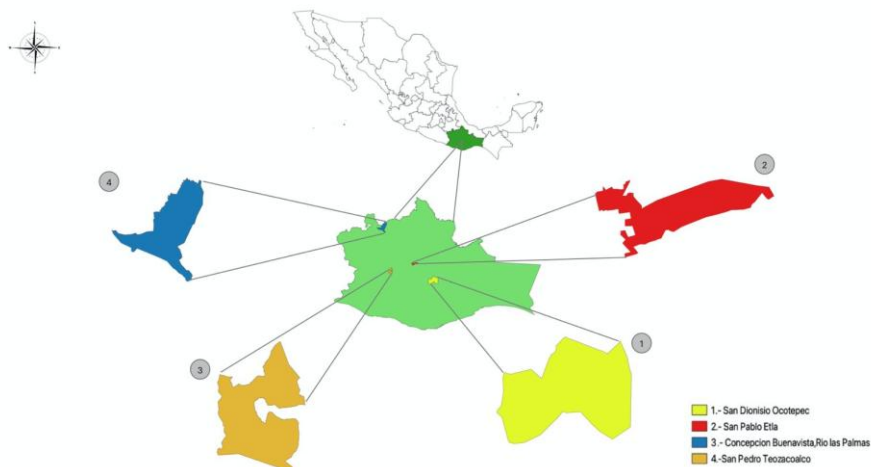


Figura 14. Localización de los palenques en Oaxaca

3.2 Aislamiento

La técnica para el aislamiento es el de diluciones seriadas en agua peptonada estéril al 1% tomando de las diluciones 1×10^{-4} y 1×10^{-5} , 50µl para siembra en cajas Petri en el medio de crecimiento agar MRS (Man Rogose & Sharpe). Las cajas se incubaron a 32 °C por 3 días en una incubadora marca ECOSHEL modelo 9052L y se seleccionaron las cepas que por morfología macroscópica observada en un microscopio estereoscópico SWIFT MA725 presentaran las características siguientes: colonias redondas, bordes regulares y pequeñas.

3.3 Caracterización macroscópica

La morfología microscópica Se realizó en un microscopio óptico marca Brand VELABTM, Modelo VE-B10; mediante tinción Gram; las cuales corresponden a Gram +, siendo bacilos, cocos, cocos en forma de cadena no esporuladas. El tamaño de las colonias bacterianas es generalmente uniforme entre una misma especie.

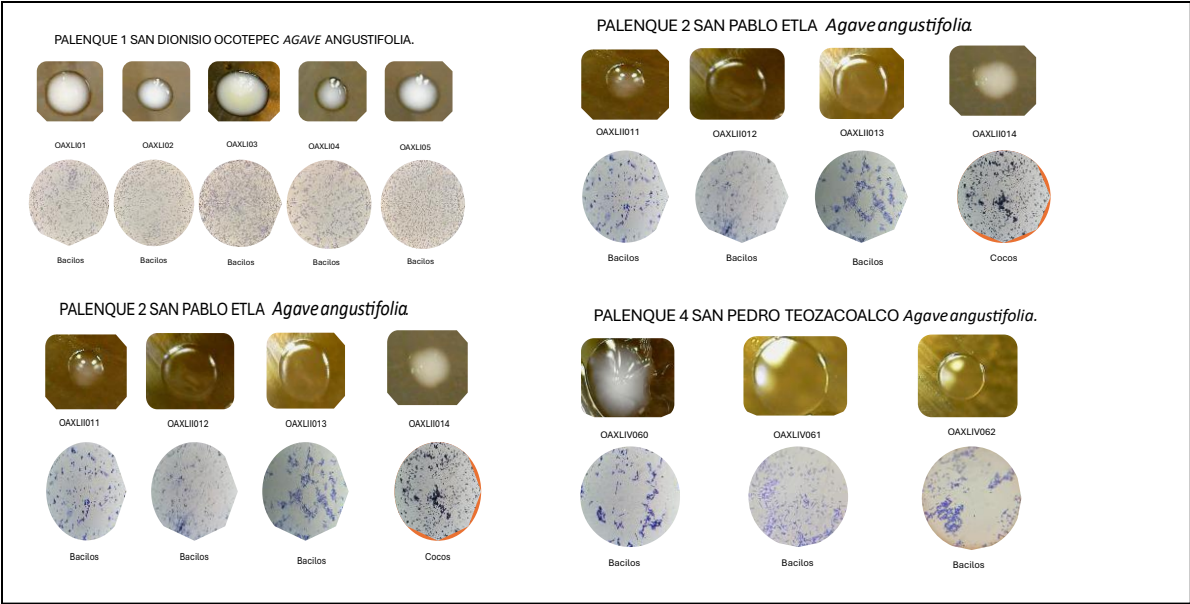


Figura 15. Morfología de las cepas encontradas en los 4 palenques estudiados

3.4 Caracterización Bioquímica

Las pruebas bioquímicas fueron las siguientes: asimilación de carbohidratos en caldo rojo base de fenol (Glucosa, Lactosa, Galactosa, Sacarosa, Fructosa, Manitol, Inulina, arabinosa). Prueba de la catalasa, reducción de nitratos, crecimiento en M5, Litmus Milk y formación de CO_2 en caldo MRS. El aislamiento dirigido se sembró en medios selectivos para diversos géneros como: LBS para lactobacillus, MSE para Leuconostoc, M17 para Lactococcus.

Tabla 5. Pruebas Bioquímicas selectivas para bacterias lácticas del palenque 1

Cepa	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Lactosa	Galactosa	Manitol
OAXLI01	+	++	+	+	+	-
OAXLI02	+	++	+	+	+	+
OAXLI03	++	++	-	+	+	-
OAXLI04	+	++	+	+	+	-
OAXLI05	++	++	++	++	+	+
OAXLI06	++	++	+	++	+	-
OAXLI07	+	++	+	+	+	-
OAXLI08	++	++	+	+	+	-
OAXLI09	++	++	+	+	+	-
OAXLI010	++	++	-	+	+	-

Tabla 6. Pruebas bioquímicas selectivas para bacterias lácticas. Palenque 2.

Cepa	MRS		NO ₃	M5	LM	LBS	M17	ELLIKER	MSE	CATALASA
	CO ₂	Crecimiento								
OAXLI01	-	++	++	Hetero fermentativa	Cuajada acida	++	++	++	-	-
OAXLI02	-	++	++	Hetero fermentativa	Cuajada acida	++	-	++	-	-
OAXLI03	++	++	-	Hetero fermentativa	Reduccion acompañada de acidificacion	+	-	++	-	-
OAXLI04	-	++	++	Hetero fermentativa	Cuajada acida	-	++	++	-	-
OAXLI05	-	++	-	Hetero fermentativa	Reduccion	++	++	++	-	-
OAXLI06	++	++	++	Hetero fermentativa	Reduccion	++	++	++	-	-
OAXLI07	-	++	++	Hetero fermentativa	Reduccion	-	-	++	-	-
OAXLI08	-	+	+	Hetero fermentativa	Cuajada acida	+	-	+	-	-
OAXLI09	-	+	+	Hetero fermentativa	Cuajada acida	+	-	+	-	-
OAXLI010	-	+	+	Hetero fermentativa	Cuajada acida	-	-	+	-	-

Tabla 7. Pruebas Bioquimicas Selectivas enfocadas a bacterias lácticas palenque 2.

Cepa	MRS		NO_3	M5	LM	LBS	M17	ELLIKER	MSE	Catalasa
	CO_2	Crecimiento								
OAXLII011	-	++	++	Hetero fermentativa	Alcalina	-	-	++	-	+
OAXLII012	++	++	++	Hetero fermentativa	Ácido	+	-	++	-	-
OAXLII013	-	++	++	Hetero fermentativa	Ácido	+	-	++	-	-
OAXLII014	++	++	++	Homo fermentativa	Ácido	-	-	++	-	-

Tabla 8. Pruebas bioquímicas selectivas para bacterias lácticas palenque 3

Cepa	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Lactosa	Galactosa	Manitol
OAXLIII015	+	+ CO ₂	+ CO ₂	+	+	+
OAXLIII016	+	+ CO ₂	-	-	+	-
OAXLIII017	D	+ CO ₂	+	-	D	+
OAXLIII018	+	+ CO ₂	+	+	+	-
OAXLIII019	+	+ CO ₂	+	+	+	D
OAXLIII020	+	+ CO ₂	+	+	+	D
OAXLIII021	D	+ CO ₂	+	-	-	-

Tabla 9. Pruebas bioquímicas selectivas para bacterias lácticas palenque 4.

Cepa	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Lactosa	Galactosa	Manitol
OAXLIV061	+	++	+	++	+	-
OAXLIV062	++	++	+	++	+	-
OAXLIV063	+	++	+	++	+	-
OAXLIV064	+	++	+ CO ₂	++	+	-
OAXLIV065	+	+	+	++	++	-
OAXLIV066	++	++	+	++	++	-

Tabla 10. Pruebas bioquímicas selectivas para bacterias lácticas palenque 4.

Cepa	MRS		NO ₃	M5	LM	LBS	M17	ELLIKER	MSE	CATALASA
	CO ₂	Crecimiento								
OAXLIV011	-	++	++	Hetero fermentativa	Cuajada acida	++	++	++	-	-
OAXLIV012	-	++	++	Hetero fermentativa	Cuajada acida	++	-	++	-	-
OAXLIV060	++	++	-	Hetero fermentativa	Reduccion acompañada de acidificación	++	++	++	-	-
OAXLIV061	-	++	++	Hetero fermentativa	Cuajada acida	++	++	++	-	-
OAXLIV062	-	++	-	Hetero fermentativa	Reduccion	++	++	++	-	-
OAXLIV063	++	++	++	Hetero fermentativa	Reduccion	++	++	++	-	-
OAXLIV064	-	++	++	Hetero fermentativa	Reduccion	++	++	++	-	-
OAXLIV065	-	++	++	Hetero fermentativa	Acidificación	++	++	++	-	-
OAXLIV066	-	++	++	Hetero fermentativa	Reduccion	++	++	++	-	-

3.5 Identificación Molecular

Para la extracción de ADN se utilizó el kit Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit, posteriormente se hizo PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), con los siguientes tiempos, desnaturalización a 94 °C por 5:30 minutos, alineación a 57 °C por 1 minuto y elongación a 72 °C por 1 minuto por 30 ciclos, utilizando los primers 1492 (GTTACC TTG TTA CGA CTT) R y 8 F (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG). Posteriormente se mandó a secuenciar el amplicón a la empresa MACROGEN, las secuencias de nucleótidos se editaron en el algoritmo BLAST para cotejar sus porcentajes de identidad con especies previamente reportadas.

Las especies encontradas en cada palenque fueron las siguientes

Se obtuvieron en total 31 cepas. Los géneros encontrados para bacterias lácticas de acuerdo con la bibliografía encontrada como Ramírez y Vélez (2016), Martínez y Ventura 2007 es la siguiente: En el primer palenque, se encontraron dos especies de *Lactobacillus* y una especie de *Bacillus*. En el palenque dos, sólo una especie de *Bacillus*. En el palenque tres, dos especies de *Lactobacillus* y una especie de *Bacillus*. El palenque cuatro, una especie de *Bacillus* y una especie de *Lactobacillus*.

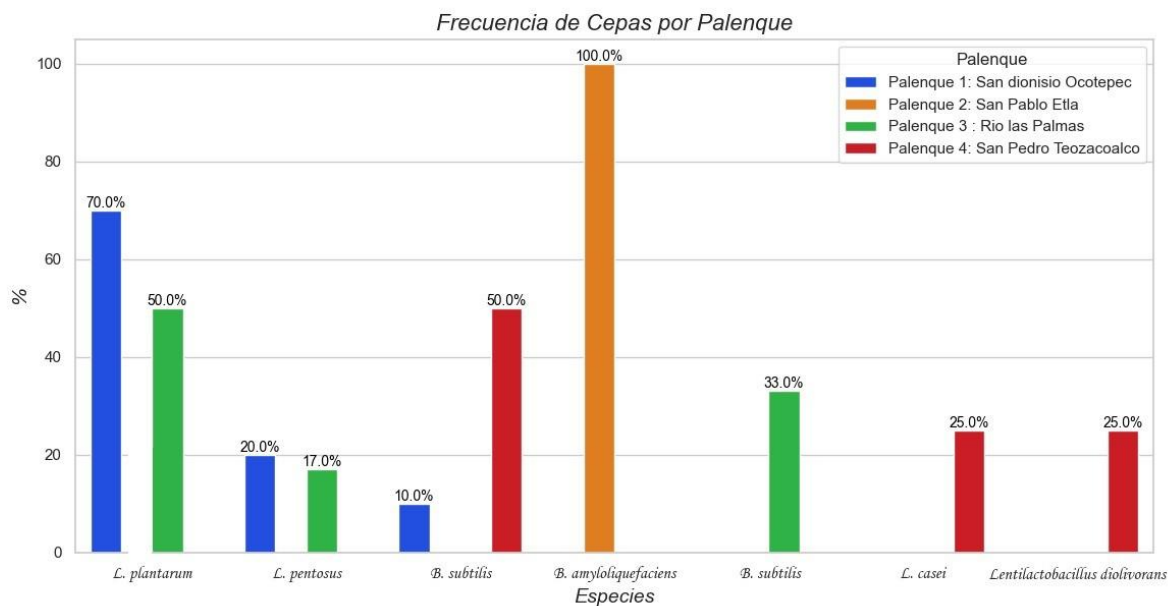


Figura 16. Frecuencia de cepas por palenque.

A continuación, se muestra los porcentajes de identidad, nombre de la especie de cada microorganismo encontrado, clasificado por palenque.

Tabla 11. Especies encontradas en el palenque 1 San Dionisio Ocoatepec, *Agave angustifolia* Haw

cepa	Nombre	Cubierta de consulta	Valor E	Por. identidad
OAXLI01	<i>Lactobacillus pentosus</i>	99%	0.0	97.76%
OAXLI02	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%	0.0	99.57%

OAXLI03	<i>Lactobacillus plantarum</i>	20%	0.0	92.31%
OAXLI04	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%	0.0	99.86%
OAXLI05	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%	0.0	99.78%
OAXLI06	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%	0.0	99.64%
OAXLI07	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%	0.0	99.93%
OAXLI08	<i>Lactobacillus plantarum</i>	79%	0.0	97.49%
OAXLI09	<i>Lactobacillus pentosus</i>	100%	0.0	99.93%
OAXLI010	<i>Bacillus subtilis</i>	71%	0.0	90.55%

Tabla 12. Especies encontradas en el palenque 2 San pablo Etla, *Agave angustifolia* Haw.

cepa	Nombre	Cubierta de consulta	Valor E	Por. identidad
OAXLI01	<i>Lactobacillus pentosus</i>	99%	0.0	97.76%
OAXLI02	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%	0.0	99.57%
OAXLI03	<i>Lactobacillus plantarum</i>	20%	0.0	92.31%
OAXLI04	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%	0.0	99.86%
OAXLI05	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%	0.0	99.78%
OAXLI06	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%	0.0	99.64%

OAXLI07	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%	0.0	99.93%
OAXLI08	<i>Lactobacillus plantarum</i>	79%	0.0	97.49%
OAXLI09	<i>Lactobacillus pentosus</i>	100%	0.0	99.93%
OAXLI010	<i>Bacillus subtilis</i>	71%	0.0	90.55%

Tabla 13. Especies encontradas en el palenque 3 Rio las Palmas, *Agave potatorum* Zucc.

CEPA	NOMRE	CUBIERTA DE CONSULTA	VALOR E.E	P. IDENTIDAD
OAXLIII015	<i>Lactobacillus pentosus</i>	16%	e-11	96.00%
OAXLIII016	<i>Staphylococcus aureus</i>	35%	0.0	93.96%
OAXLIII017	<i>enterococo faecalis</i>	94%	0.0	94.52%
OAXLIII018	<i>Bacilo amyloliquefaciens</i>	33%	1e-12	90.91%
OAXLIII019	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97%	0.0	96.01%
OAXLIII020	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%	0-0	99.93%
OAXLIII021	<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	100%	0.0	89.90%

Tabla 14. Especies encontradas en el palenque 4 San Pedro Teozacoalco, *Agave angustifolia* Haw.

CEPA	NOMBRE	CUBIERTA DE CONSULTA	VALOR E.E	P. IDENTIDAD
OAXLIV011	<i>Bacillus subtilis</i>	93%	0.0	81.18%
OAXLIV012	<i>Enterobacter asburiae</i>	19%	3e-49	78.76%
OAXLIV061	<i>Enterobacter hormaechei</i>	98%	0.0	93.77%
OAXLIV062	<i>Enterobacter hormaechei</i>	98%	0.0	93.77%
OAXLIV063	<i>Bacillus subtilis</i>	91%	0.0	90.31%
OAXLIV064	<i>Lactobacillus casei</i>	49%	0.0	94.0%
OAXLIV065	<i>Lentilactobacillus diolivorans</i>	87%	0.0	95.01%
OAXLIV066	<i>Enterobacter hormachei</i>	100%	0.0	94.0%

3.6 Tolerancia de etanol

Posteriormente se realizó un screening rápido con la finalidad de identificar a las cepas tolerantes a etanol, por lo que se empleó MRS+etanol con los siguientes porcentajes: 0%, 6%, 8% a las 24 h y empleando como fuente de carbono glucosa.

Solamente 4 cepas resistieron hasta 8 % v/v de alcohol, las cuales corresponden a OAXLI02, OAXLI05, OAXLI019, OAXLI020, todas correspondientes a *Lactobacillus plantarum*.

Del palenque uno, fueron encontradas siete cepas de las cuales solamente tres lograron sobrevivir, mientras que del palenque tres se encontraron tres cepas y sobrevivieron dos.

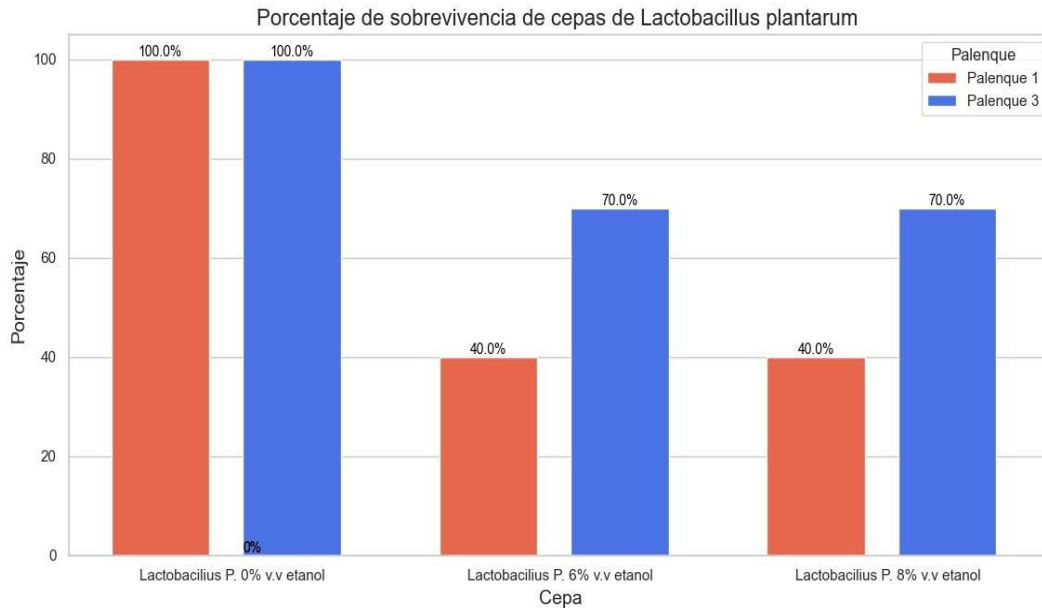


Figura 17. Porcentaje de sobrevivencia de cepas de lactobacillus plantarum

3.7 Caracterizacion cinética

A estas cepas resistentes se les realizo una cinética de 24 h de tipo destructiva en medio MRS, tomando muestra cada 3 h. Los parámetros evaluados fueron, velocidad específica de crecimiento, tiempo de duplicación. La cepa con mejor velocidad de crecimiento y mayor tiempo de duplicación fue la cepa *L. plantarum* OAXLIII019 correspondiente al palenque tres Rio las palmas.

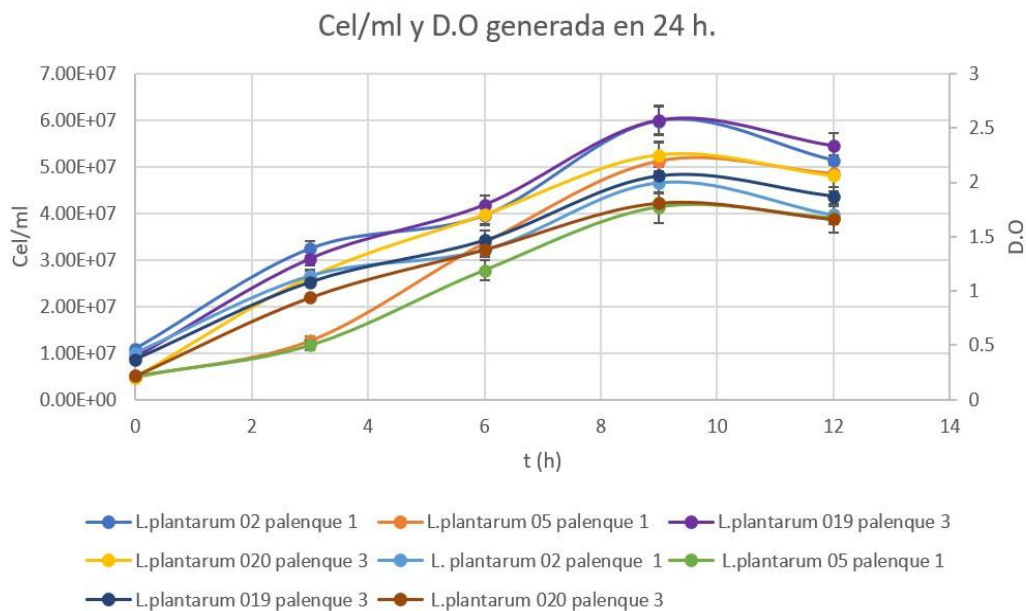


Figura 18. Cel / ml y D.O generada en 24 h.

La cepa *L. plantarum* OAXLIII019 se presenta como la más prometedora en términos de velocidad de crecimiento, exhibiendo una tasa significativamente alta (0.34 h^{-1}) y un tiempo de duplicación sorprendentemente breve (2 h). La cepa *L. plantarum* OAXLI05 muestra una velocidad de crecimiento más moderada (0.17 h^{-1}) y un tiempo de duplicación más prolongado (4 h) indicando una adaptación más lenta.

Tabla 15. Velocidades específicas de crecimiento de 4 cepas de *Lactobacillus*

CEPA	μh^{-1}	Tiempo de duplicación (X) h
OAXLI02	0.25	3.0
OAXLI05	0.17	4.0
OAXLIII019	0.34	2.0
OAXLIII020	0.19	4.0

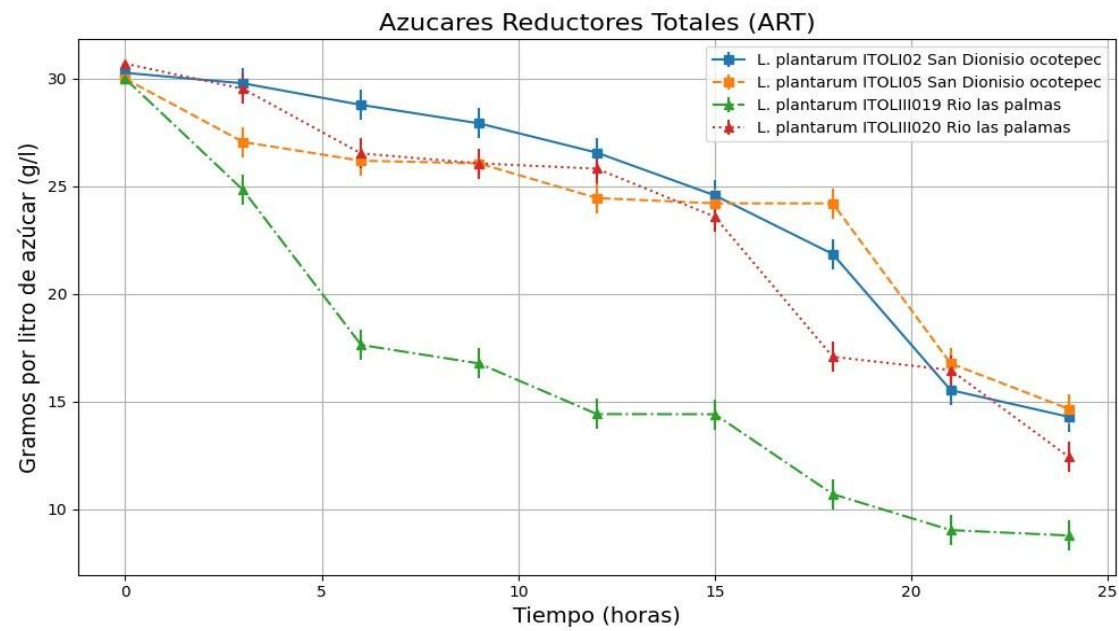


Figura 19. Consumo de glucosa a las 24 h por 4 cepas de *Lactobacillus*

Como podemos observar, la cepa *L. plantarum* OAXLIII019 fue la que presento mejores resultados en el consumo de la fuente de carbono a las 24h, esto quiere decir que la cepa se desarrolla muy bien en un medio con glucosa, teniendo una velocidad especifica y un tiempo de duplicación excelentes.

Posteriormente se realizo una cinetica para diferentes concentraciones de etanol a 6%, 8% y 10% etanol para las 4 cepas de *lactobacillus plantarum*.

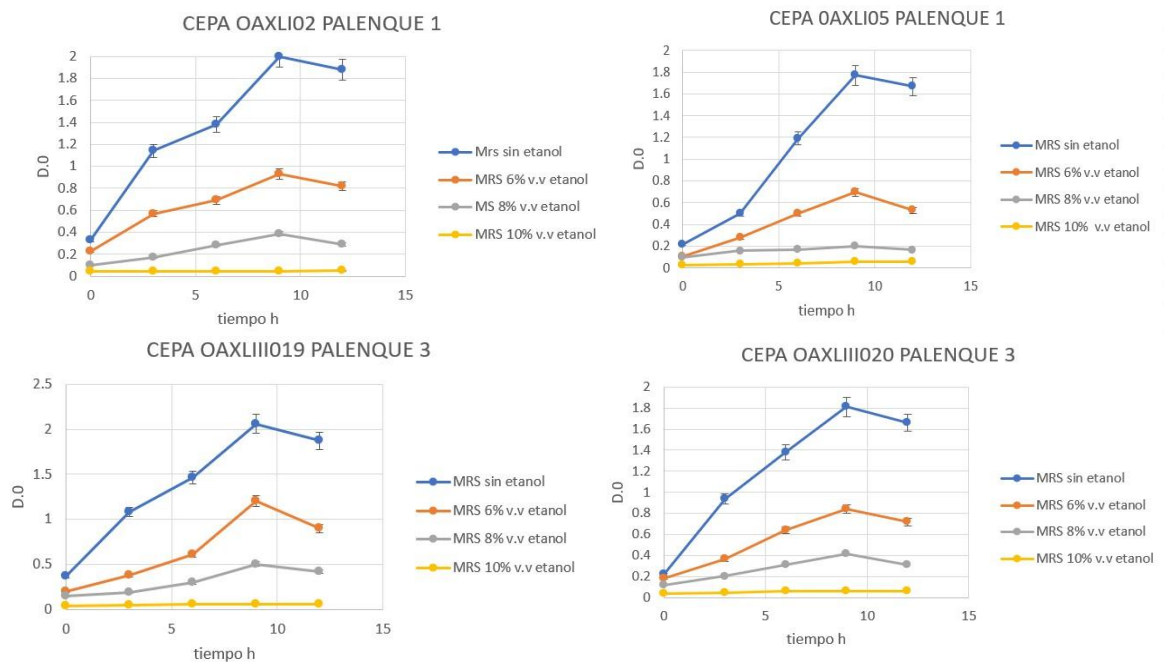


Figura 20. Cinéticas de tolerancia de etanol

CONCLUSIONES

Se llevó a cabo el aislamiento y caracterización de las BAL presentes en la fermentación de cuatro palenques de Oaxaca, utilizando diferentes medios de cultivo y técnicas convencionales y moleculares. Además, se realizó una prueba de tolerancia al etanol para seleccionar las cepas resistentes a este alcohol, que es un componente clave en la producción de mezcal. Las cepas seleccionadas fueron sometidas a una cinética de crecimiento durante 24 horas.

Se identificaron un total de 23 cepas correspondientes a BAL. En el primer palenque, se encontraron dos especies de *Lactobacillus* y una especie de *Bacillus*. En el palenque dos, sólo una especie de *Bacillus*. En el palenque tres, dos especies de *Lactobacillus* y una especie de *Bacillus*. El palenque cuatro, una especie de *Bacillus* y una especie de *Lactobacillus*. De estas cepas, sólo cuatro cepas de *Lactobacillus plantarum* mostraron una notable resistencia al etanol en concentraciones de hasta el 8% v/v. Estas cepas provinieron de dos palenques diferentes, lo que sugiere una diversidad en la microflora presente en diferentes lugares de Oaxaca.

Al analizar las velocidades específicas de crecimiento de las diferentes cepas, podemos observar que existe una variabilidad significativa entre ellas. La cepa OAXLIII019 ha demostrado tener la velocidad específica de crecimiento más alta, con un valor de 0.34. Esto sugiere que esta cepa es altamente eficiente en su capacidad para multiplicarse y generar nuevas células en un período de tiempo determinado.

Por otro lado, las cepas OAXLI02 y OAXLIII020 también han mostrado velocidades específicas de crecimiento relativamente altas, con valores de 0.25 y 0.19, respectivamente. Estos resultados indican que estas cepas también poseen una buena capacidad de reproducción y crecimiento, aunque no alcanzan el nivel de la cepa OAXLIII019. En contraste, la cepa OAXLI05 presenta la velocidad específica de crecimiento más baja, con un valor de 0.17. Esto sugiere que esta cepa tiene una tasa de crecimiento más lenta en comparación con las demás. Es importante tener en cuenta que una baja velocidad específica de crecimiento puede tener implicaciones en la productividad y eficiencia de la cepa en aplicaciones biotecnológicas o industriales. En general, la variabilidad en las velocidades específicas de crecimiento entre las cepas

puede deberse a diversas razones, como diferencias genéticas, condiciones ambientales, disponibilidad de nutrientes y otros factores que influyen en la capacidad de las células para crecer y reproducirse. Estos resultados son de relevancia en investigaciones microbiológicas y aplicaciones biotecnológicas, ya que nos permiten comprender mejor el comportamiento de las cepas y seleccionar aquellas con las características más adecuadas para diferentes propósitos.