



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

“IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS POR
MEDIO DE PCR-RFLP DE LA REGIÓN RNAr
5.8S-ITS AISLADAS DURANTE LA
FERMENTACIÓN DE MEZCAL DE LA
REGIÓN DE SOLA DE VEGA OAXACA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOQUÍMICAS)**

P R E S E N T A:

**OCIEL ESAÚ ANDRADE
MENESES**



Tutor: DR. FRANCISCO RUIZ TERÁN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

MÉXICO, D. F. a 10 de Noviembre de 2006.

“IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS POR MEDIO DE PCR-RFLP DE LA REGIÓN RNA_r 5.8S-ITS AISLADAS DURANTE LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL DE LA REGIÓN DE SOLA DE VEGA OAXACA”

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Francisco Ruiz Terán en el laboratorio L-321 del departamento de Alimentos y Biotecnología en el conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Amelia Farrés González-Saravia
Dr. Enrique Merino Pérez
Dr. Francisco Ruiz Terán

Facultad de Química, UNAM
Instituto de Biotecnología, UNAM
Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica de la M.C. Sandra Bolaños en los experimentos de Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Se reconoce la asesoría de la Dra. Maria del Carmen Wachter Rodarte, la Dra. Amelia Farrés y el Dr. Enrique Merino.

Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día _____.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

PRESIDENTE Dra. Amelia Farrés González-Saravia.
VOCAL Dr. Guillermo Gosset Lagarda.
SECRETARIO Dr. José Mariano García Garibay.
SUPLENTE Dra. Maricarmen Quirasco Baruch.
SUPLENTE Dr. Enrique Merino Pérez.

AGRADECIMIENTOS.

Es difícil escribir al respecto cuando hay tanto que agradecer a tantos.

A DIOS.

A MIS PAPÁS

Por que todo lo bueno que soy es debido a ustedes, por su manera de ver la vida, su amor, paciencia y guía. Gracias.

A MI HERMANO CARLOS

Por que además de un excelente hermano eres un gran amigo.

A MI HERMANO JESÚS GIBRÁN

Por enseñarme a ser mejor persona.

A MI HERMANO JUAN GERARDO Y A MIS TÍAS MARIA DEL CARMEN Y CONSUELO

Por que sin su apoyo y cariño no hubiera sido posible.

A MARICARMEN HERNÁNDEZ

Gracias cada momento, por todo Carmen.

A MIS AMIGOS MARCO POLO, OLIVER, CARLOS Y SERGIO.

Ab imo pectore

A MIS AMIGAS ANJA, RUTH, JULIETA, SANDRA, GLORIA, IVON, GABY, ALICE, BETY Y KARLA.

Por el regalo de su amistad.

A TODA MI FAMILIA Y AMIGOS QUE NO ES POSIBLE MENCIONAR AQUÍ PERO QUE ESTÁN CONMIGO.

A MI TÍO MANUEL ANDRADE RODRÍGUEZ

A LA MEMORIA DE MIS ABUELOS, DE MARIANA PLASENCIA Y HERMILA ANDRADE

Los extraño aun cuando siempre los llevo conmigo.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS.

A LA UNAM
Y A TODOS LOS PROFESORES DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS.
Estaré siempre en deuda con Ustedes.

A LA DRA. GILDA FLORES ROSALES
Por transmitirme con tanto éxito parte de su amor por la ciencia y ser un ejemplo para mí.

AL DR. FRANCISCO RUIZ
Por ser un amigo además de mi tutor y por todo tu esfuerzo, paciencia y consejos sin los cuales no hubiera podido llevar el trabajo a buen termino.

A LA DRA. CARMEN WACHER Y AL DR. ARTURO NAVARRO
Por sus consejos y observaciones invaluables.

A LA DRA. HERMINIA LOZA.
Por ayudarme a confiar.

A MIS COMPAÑERAS Y COMPAÑEROS DEL L-321 Y L-324

ÍNDICE.

ÍNDICE DE IMÁGENES.	¡Error! Marcador no definido.
ÍNDICE DE GRÁFICAS	¡Error! Marcador no definido.
ÍNDICE DE TABLAS.	¡Error! Marcador no definido.
RESUMEN.	¡Error! Marcador no definido.
INTRODUCCIÓN.	¡Error! Marcador no definido.
ANTECEDENTES.	¡Error! Marcador no definido.
Bebidas y Alimentos Fermentados Tradicionales.	¡Error! Marcador no definido.
Generalidades sobre el mezcal y su producción en el Estado de Oaxaca.	¡Error! Marcador no definido.
definido.	
El maguey o Agave mezcalero	¡Error! Marcador no definido.
Elaboración del Mezcal en la localidad de Sola de Vega Oaxaca	¡Error! Marcador no definido.
Factores que afectan al aroma y sabor del mezcal.	¡Error! Marcador no definido.
Importancia del estudio de la diversidad microbiana.	¡Error! Marcador no definido.
Las levaduras y su importancia.	¡Error! Marcador no definido.
Identificación y clasificación de levaduras.	¡Error! Marcador no definido.
HIPÓTESIS.	¡Error! Marcador no definido.
OBJETIVOS.	¡Error! Marcador no definido.
MATERIAL Y MÉTODOS	¡Error! Marcador no definido.
Muestreo de los mostos de <i>A. angustifolia haw.</i>	¡Error! Marcador no definido.
Aislamiento e identificación de levaduras encontradas en los mostos de <i>A. angustifolia haw</i>	¡Error! Marcador no definido.
Conteo total de mesófilos aerobios y levaduras en las muestras de <i>A. angustifolia haw.</i>	¡Error! Marcador no definido.
Marcador no definido.	
Aislamiento y obtención de cepas puras de levadura de las muestras de mostos de <i>A. angustifolia haw.</i>	¡Error! Marcador no definido.
Identificación con la prueba API 20CAUX de los aislados obtenidos en las muestras de mostos de <i>Agave angustifolia haw.</i>	¡Error! Marcador no definido.
Extracción de DNA de las levaduras aisladas de la muestra sólida T ₀ .	¡Error! Marcador no definido.
definido.	
Extracción de DNA de las levaduras aisladas de las muestras líquidas T ₁ , T ₃ y T ₅	¡Error! Marcador no definido.
Marcador no definido.	
Análisis Químico de las muestras.	¡Error! Marcador no definido.
Ensayos de Fermentación controlada.	¡Error! Marcador no definido.
Determinación de congénicos en los destilados comercial y de laboratorio	¡Error! Marcador no definido.
definido.	
RESULTADOS.	¡Error! Marcador no definido.

Conteo de mesófilos aerobios y levaduras durante la fermentación de mostos de *A. angustifolia haw* durante la elaboración del mezcal.. **¡Error! Marcador no definido.**
 Aislamiento e Identificación de Levaduras de mostos de *A. angustifolia haw*. **¡Error! Marcador no definido.**
 Análisis de las poblaciones de levaduras durante la fermentación de mostos de *A. angustifolia haw*. **¡Error! Marcador no definido.**
 Análisis químico de la fermentación espontánea de mostos de *A. angustifolia haw* durante la elaboración de mezcal. **¡Error! Marcador no definido.**
 Ensayos de Fermentaciones Inoculadas para determinar el aporte de las levaduras aisladas al destilado. **¡Error! Marcador no definido.**
 Perfil de congénéricos de los destilados. **¡Error! Marcador no definido.**

ANÁLISIS DE RESULTADOS

¡Error! Marcador no definido.

Conteo, aislamiento y caracterización. **¡Error! Marcador no definido.**
 Aislamiento e Identificación por API 20 C AUX **¡Error! Marcador no definido.**
 Identificación por RFLP-ITS y secuenciación del gen rDNA 26S **¡Error! Marcador no definido.**
 Análisis de las poblaciones de levaduras durante la fermentación. **¡Error! Marcador no definido.**
 Análisis Químico de la Fermentación Espontánea. **¡Error! Marcador no definido.**
 Ensayos de Fermentaciones inoculadas. **¡Error! Marcador no definido.**
 Análisis de los destilados obtenidos en los ensayos de fermentación controlada. **¡Error! Marcador no definido.**

CONCLUSIONES.

¡Error! Marcador no definido.

PERSPECTIVAS.

¡Error! Marcador no definido.

ANEXO.

¡Error! Marcador no definido.

BIBLIOGRAFÍA.

¡Error! Marcador no definido.

RESUMEN.

En el presente estudio se aislaron e identificaron a las levaduras presentes durante la fermentación espontánea de mostos de *Agave angustifolia haw* en la elaboración de mezcal utilizando el análisis de los patrones de restricción de la región 5.8S-ITS del gen RNAr, la prueba de identificación API 20C AUX y en los casos en los que fue necesario, la amplificación y secuenciación parcial del gen 26S del RNAr. Se aislaron sobre la base de la morfología colonial tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, dos de *Zygosaccharomyces bailii*, y una de las variedades; *Candida apicola*, *Candida intermedia* y *Rhodotorula mucilaginosa* respectivamente. La mayor diversidad de especies se encontró en el inicio de la fermentación y se identificó a *S. cerevisiae* como la especie dominante en numero en la misma.

Se realizaron ensayos, en el laboratorio, de fermentaciones controladas para determinar el aporte de las levaduras aisladas en términos de producción de alcohol etílico, alcohol amílico e isoamílico, alcohol metílico, acetato de etilo y acetaldehído. Se identificó a *Saccharomyces cerevisiae* como el principal productor de los compuestos de sabor y aroma (congenéricos) antes mencionados y se observó un efecto sinérgico en la producción de acetato de etilo y acetaldehído al utilizar un inóculo mixto de *Z. bailii* y *Saccharomyces cerevisiae*.

INTRODUCCIÓN.

El maguey (*Agave* spp.) es una planta que tiene su origen en México (Granados Sánchez 1993) y que se ha utilizado desde los primeros pobladores para obtener una variedad de productos, entre los que destacan algunas bebidas de bajo contenido alcohólico que posteriormente, dieron origen a destilados como el tequila y el mezcal.

Según la Norma Oficial Mexicana (NOM-070-SCFI-1994) el mezcal es un licor que se obtiene de la destilación de jugos fermentados de diferentes clases de *Agave*, su origen es mixto pues la bebida fermentada obtenida a partir de agraves cocidos se preparaba desde tiempo atrás de la llegada de los españoles, quienes introdujeron la destilación para dar origen al producto actual.

Aunque el mezcal se produce en diferentes estados del país, el estado de Oaxaca es el lugar en donde se concentra la mayor cantidad de productores y de personas que dependen de esta actividad económica (INEGI-Regiones económicas-Oaxaca). A pesar de la importancia que tiene la industria mezcalera en el país, el método de elaboración sigue siendo rudimentario, por ejemplo, el proceso de fermentación no se controla y los microorganismos que participan en la fermentación no han sido identificados. Hasta el momento, no se han encontrado reportes en la bibliografía acerca de la cuantificación de compuestos de sabor y aroma (también llamados congenéricos) en el mosto, ni de la influencia de los mismos en la calidad de la bebida, tampoco existen referencias con relación a la caracterización de las levaduras presentes en las plantas de agave, en las melazas o en los mostos de los que se obtiene el mezcal. Las únicas referencias cercanas con que se cuenta son trabajos publicados sobre fermentaciones de Tequila (Arrizon et al 2002, Lachance 1995 (a), Pinal et al 1997 y Cedeño 1993).

La identificación de levaduras se hace tradicionalmente con base en sus características morfológicas y fisiológicas, este procedimiento que requiere de por lo menos 60 ensayos (Barnett et al 2000), además de implicar tiempo, recursos y experiencia no asegura una buena identificación. Se han desarrollado algunas pruebas comerciales de identificación rápida (Barnett et al *idem.*, Espinel-Ingroff 1998) como el API 20C AUX basados en la capacidad que tienen las levaduras de crecer en un sustrato determinado como única fuente de carbono. Este método es fácil y rápido para la identificación de estos

microorganismos sin embargo, los porcentajes de identificación suelen ser bajos especialmente cuando se analizan muestras de alimentos (Barnett et 2000, Covadonga et al 2002).

La identificación de microorganismos requiere del empleo de varias metodologías para realizar una caracterización adecuada de los mismos. Los métodos moleculares que se emplean para la identificación ofrecen una buena alternativa para caracterizar a los organismos a nivel de especie y subespecie con menos tiempo y trabajo. Uno de los métodos más comunes para la identificación de especies es a través de la comparación de secuencias parciales de los genes que codifican al ARN ribosomal (rRNA), y dentro de este tipo de identificación, el análisis de secuencias de la subunidad mayor (26S) del ADN ribosomal rDNA es el método más utilizado por las características taxonómicas del gen, por la cantidad de información disponible y por la amplia base de datos con que cuenta (Fell 2000, Kurtzman *et al* 1998 (d), Hopple 1999, Inácio *et al* 2003, Nadal *et al* 1996). Por otra parte existen métodos que no requieren de la secuenciación para la identificación como el análisis de restricción de DNA ribosomal amplificado (ARDRA), el análisis de DNA aleatoriamente amplificado (RAPD) y el análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) entre otros este último, tiene algunas ventajas en cuanto a rapidez, facilidad y reproducibilidad sobre los anteriores (Giraffa 2001, Scott 2000). El RFLP de un producto de PCR de la región comprendida por los espaciadores internos transcritos (ITS1, ITS2) es utilizado para la identificación de levaduras. Ésta metodología ha demostrado una mayor resolución a nivel de identificación de especies que la utilizada a partir de la secuencia de los genes rDNA 18S o 26S (Esteve-Zarzoso *et al* 1999 (c), Kurtzman *et al* 1992 (b) y ésta se ha utilizado ampliamente en la identificación de levaduras presentes durante la elaboración de vinos y jugos de fruta (Beltrán et al 2002, Covadonga et al 2002, Sabate *et al* 2002, Fernández-Espinar *et al* 2000).

En el presente trabajo se aislaron e identificaron algunas de las levaduras que participan en la fermentación de mostos de *Agave angustifolia* haw durante la elaboración de mezcal. Estos microorganismos fueron identificados mediante pruebas de asimilación de carbohidratos (API 20C AUX) y por medio de un método de análisis de los patrones de restricción (RFLP) del producto de amplificación por PCR del complejo del gen rRNA 5.8S-ITS. En los casos en los que los perfiles de restricción no fueron suficientes para

establecer la identidad del microorganismo se amplificó y secuenció la región comprendida por los dominios D1/D2 del gen rRNA 26S para utilizarla como un patrón de identificación. Se establecieron las poblaciones dominantes en el transcurso de la fermentación y con esta información se realizaron ensayos de fermentaciones controladas para determinar el aporte real de las mismas al producto terminado, en términos de la producción de compuestos como el alcohol isoamílico, amílico, acetato de etilo y otros.

ANTECEDENTES.

Bebidas y Alimentos Fermentados Tradicionales.

La fermentación es la alternativa bioquímica de los microorganismos (y de algunas células superiores) para la obtención de energía en condiciones de hipoxia o de ausencia total de oxígeno; como la respiración es un proceso de obtención de energía a través de la oxidación-reducción de diferentes compuestos con la diferencia de que en la fermentación el aceptor de electrones no es el oxígeno sino un intermediario orgánico oxidado. Aunque los combustibles más comunes para la fermentación son los azúcares, especialmente glucosa y fructuosa, la fermentación como tal puede llevarse a cabo con moléculas de ácidos grasos, aminoácidos o bases nitrogenadas.

Un alimento o bebida fermentada es entonces uno en el que la matriz original ha sido modificada de alguna manera por la acción de uno o varios microorganismos en condiciones de baja concentración de oxígeno y que tiene al final del proceso de elaboración características distintas al alimento original, pero satisfactorias en cuanto a sabor y aroma, debidas en parte a la acción de los microorganismos.

A través de las fermentaciones alimentarias ha sido posible preservar y enriquecer los alimentos así como acceder a una variedad de nuevas texturas y sabores (Wacher et al 1993). Dentro de las diferentes vías fermentativas de los azúcares destacan la fermentación ácido láctica y la fermentación alcohólica (Fig. 1) por su aporte a la supervivencia de la humanidad, pues los productos de ambas el etanol y el ácido láctico, son buenos conservadores y agentes tóxicos para la mayoría de las bacterias patógenas del hombre (Steinkraus 1993).

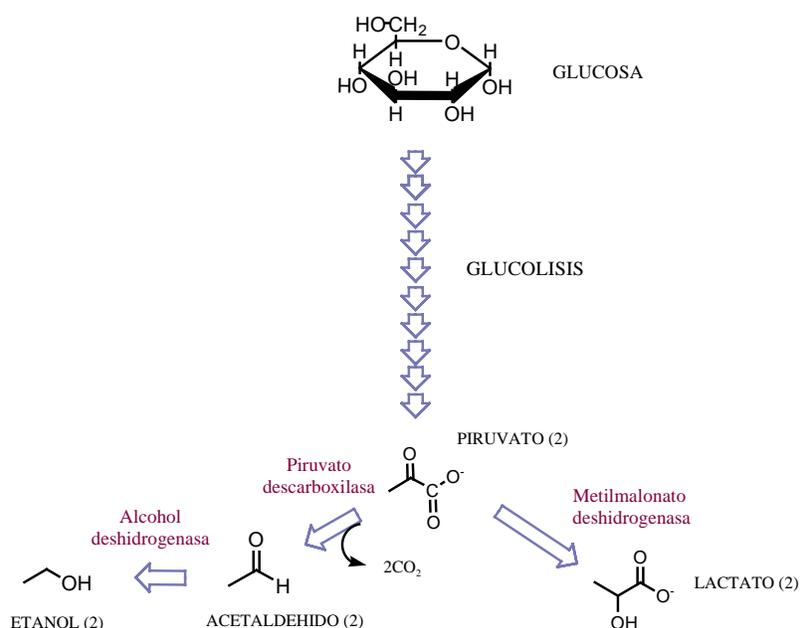


Fig. 1. Representación esquemática de la fermentación alcohólica y ácido láctica.

En casi todo el mundo con excepción de los polos se producen y consumen alimentos fermentados, como un ejemplo se puede mencionar a los vinos, cervezas, quesos, panes con levaduras, vinos de arroz, lácteos fermentados como el yogurt, kéfir o jocoque, fermentados del maíz como la bouza o la chicha, fermentados de soya como el miso, vegetales en conserva, carnes y pescados en conserva, sidras, hidromiel, vinagre, café, y chocolate entre otros.

En México se cuenta con una extensa variedad de bebidas fermentadas producidas a partir de diferentes sustratos como plantas, frutas y granos entre los que encontramos maíz con el que se prepara el pozol, tesguino entre otras bebidas, la tuna que sirve para preparar colonche y vino de tuna, la piña y otras frutas de las que se obtiene el tepache, algunos árboles y palmeras con las que se prepara por ejemplo la tuba y el balché, el cacao con el que se elabora el tejate, algunos cactus como por ejemplo el sahuaro del que se obtiene la bebida del mismo nombre y las diferentes clases de Agave con de los que se obtienen bebidas como el pulque, bacanora, sotol, tequila y mezcal. La producción y consumo de alimentos fermentados es importante no solo desde el punto de vista alimentario, social y cultural sino también desde el punto de vista económico ya que muchos de estos productos incluyendo al tequila y mezcal son una fuente importante de ingresos para las regiones en donde se producen.

Generalidades sobre el mezcal y su producción en el Estado de Oaxaca.

Se llama mezcal a las bebidas espirituosas elaboradas por la destilación y rectificación de los mostos fermentados, obtenidos de las cabezas maduras de las diferentes variedades de *Agave* que no se utilicen como materia prima en la elaboración de otras bebidas con denominación de origen dentro del mismo estado (NOM-070-SCFI-1994). La palabra mezcal viene del náhuatl *metl* e *ixcalli* que significan "agave cocido al horno", se tiene conocimiento (Luna 1991; Blomberg 2000) de que el corazón del Agave cocido era utilizado en tiempos prehispánicos para preparar una bebida de bajo contenido alcohólico y también como golosina, sin embargo no es hasta que los españoles introducen la destilación que el mezcal se produce como tal por ello se dice que el origen del mezcal es mixto aunque también podría decirse que es mestizo.

Según la norma oficial mexicana se establece como región productora de mezcal a la comprendida por los estados de Zacatecas, San Luis Potosí, Guerrero, Durango y especialmente el estado de Oaxaca en donde se encuentra la denominada "Región del mezcal" que abarca los municipios de Miahuatlán, Tlacolula, Yautepec, Ocotlán, Ejutla, Zimatlán y Sola de Vega. La producción de mezcal es particularmente importante en esta región y en general en el estado de Oaxaca no solo por que en él se concentra cerca del 90% de los productores del país (Granados 1993, Blomberg 2000), sino por que esta actividad es económicamente, una de las más importantes solo después del Turismo y de la Industria de servicios, en el año 2000 se obtuvieron a través de las importaciones de mezcal 79 900 000 dólares (datos INEGI) cantidad que representa cerca del 15% del PIB del estado en el mismo año, lo cual es bastante para uno de los estados más pobres del país.

El mezcal se diferencia del Tequila en el proceso de elaboración que en el caso del ultimo se encuentra bastante modernizado y adaptado a normas de calidad internacionales, la principal diferencia es la materia prima con la cual se elabora, pues el tequila solo puede obtenerse del *A. tequilana weber variedad azul* (Agave azul), mientras que el mezcal puede prepararse con diferentes especies de Agave entre las que se encuentran el *A. salmiana otto* (Maguey verde), *A. weberi cela*

(maguey de mezcal), *A. espérriima jácobi* (Maguey de cerro), *A. potatorum zucc* (Tobalá) y el *A. angustifolia haw* o maguey espadín.

El maguey o Agave mezcalero

La palabra maguey es de origen taíno (tribus indígenas que habitaron las antillas mayores hasta la llegada de los españoles -Granados 1993-) y es utilizada comúnmente en México para describir a las diferentes variedades de plantas que pertenecen al género *Agave* (palabra que significa noble y que fue utilizada por Linneaus para denominar el género). La palabra náhuatl para nombrar a estas plantas es *metl*, aunque los vocablos agave y maguey suelen utilizarse como sinónimos en incluso, a veces de manera errónea para referirse a plantas pertenecientes al género *Aloe*.

El género *Agave* cuenta con 310 especies reportadas de las cuales es posible encontrar 272 en México por lo que se considera al país como centro de origen de la planta (Granados 1993). Las plantas pertenecientes al Género *Agave* son de hojas perennes, suculentas y fibrosas, dispuestas en forma de roseta y que terminan en una espina, son plantas de tallos cortos y rizomatosos, de lento crecimiento y presentan un ciclo de inflorescencia en el cual brota una especie de espiga coronada por flores verdes o amarillas (Granados Ídem), la planta muere después de la floración debido al consumo de energía que la producción del brote implica para la planta.

En México se ha utilizado el *Agave* desde tiempos prehispánicos con fines diversos. Hoy en día se explotan algunas variedades para obtener un beneficio económico como por ejemplo el *A. foudroydes* o henequén del cual se obtienen fibras para cuerdas y mantas, el *A. salmiana* y *A. atrovirens* del los que se obtiene el aguamiel y el pulque que recientemente han comenzado a exportarse a oriente (Blomberg op. cit), el *A. tequilana* del que se obtiene el Tequila y los Agaves mezcaleros entre los que destacan el *A. potatorum zucc* y principalmente el *A. angustifolia haw*.

El *Agave angustifolia* es la especie de *Agave* mas utilizada en la producción de mezcal (Granados op cit, Blomberg, op cit), pues posee algunas características que le hacen especialmente adecuado, como son un alto contenido de inulina que es el principal polisacárido de reserva en el agave y esta constituido por residuos de fructosa de longitud variable, un tamaño adecuado (alcanza de 1 a 2m y los corazones de las plantas pueden llegar a pesar hasta 70kg), y una combinación decompuestos químicos que dan al mezcal obtenido de este *Agave* características agradables al gusto.

Una razón más para la preferencia del maguey espadín sobre otras especies es que es relativamente fácil cultivarlo. El *A. angustifolia* se cultiva en todo el estado de Oaxaca principalmente en la ya referida región del mezcal, en suelos semiprofundos con buen drenaje y pendientes medias o elevadas, la temperatura media a la que se desarrollan estas plantas de 22°C y requieren de una precipitación anual de entre 500-600mm (CONABIO-SIRE) . Las plantas tienen un tiempo de vida de entre 8 y 12 años, se reproducen de manera sexual y asexual siendo el ultimo método el mas utilizado por los productores de mezcal (Granados 1993) debido a que la reproducción por semillas requiere condiciones de mayor cuidado para su germinación. En algunos lugares de Oaxaca se practica la siembra del Agave en cultivo mixto (con maíz, frijol o cacahuate) aunque la forma más común es el monocultivo.

Elaboración del Mezcal en la localidad de Sola de Vega Oaxaca

En casi todo el estado de Oaxaca el mezcal se elabora de manera artesanal en instalaciones caseras llamadas “palenques” en las que los productores o “palenqueros” llevan a cabo todo el proceso desde la siembra del Agave hasta la venta del mezcal en pequeña escala a compradores locales o a los embotelladores. A continuación se describe proceso de elaboración en Sola de Vega que es muy parecido al de otras regiones del estado con algunas pequeñas variaciones entre productores sobre todo en los tiempos de fermentación y en los utensilios utilizados en la elaboración.

Cosecha de las plantas de Agave.

Las plantas de Agave se cortan cuando éstas alcanzan la madurez entre los 8 y 10 años de edad. La selección de las mismas se lleva a cabo por el palenquero cuando las plantas comienzan a dar señales de iniciar la floración o lo que comúnmente se le llama como brote de qurote (Fig. 2).



Figura 2. Planta de Agave *angustifolia* *haw* de ocho años de edad y hojas después del rasurado.

Entonces inicia el proceso que al que se le llama rasurado y que consiste en cortar con un machete todas las hojas de las plantas para después extraer los corazones de las mismas también llamados piñas con ayuda de una barreta o una herramienta metálica llamada coa. Las piñas tienen un peso promedio de 40Kg y son transportadas hacia el palenque (lugar donde se produce el mezcal) que suele estar en las cercanías para ser procesadas a la brevedad posible y evitar así pérdidas por deshidratación.

Cocción de los corazones de Agave o piñas

Una vez en el palenque las piñas se introducen enteras en hornos excavados bajo la tierra (Fig. 3) cuyas dimensiones varían con el productor y la cantidad de materia prima disponible. En estos hornos se han colocado piedras previamente calentadas al rojo para mantener el calor y cocer las piñas. Estas últimas se cubren con bagazo de Agave de alguna fermentación anterior y con tierra, posteriormente se enciende fuego sobre el horno. La cocción de este modo dura entre tres y cuatro días al cabo de los cuales se retira el fuego y se dejan enfriar las piñas un día más, el tiempo de cocción al igual que todos los tiempos en el proceso de elaboración están determinados por el clima y la experiencia del productor. El proceso de cocción tiene una doble finalidad, suavizar las piñas para poder molerlas y la más importante hidrolizar los carbohidratos presentes en la piña, principalmente la inulina.



Figura 3. Horno de tierra con restos de bagazo las dimensiones de este pueden variar entre tres y ocho metros de diámetro.

Molienda de los corazones o piñas después de la cocción.

A la etapa de molienda se le conoce como machucado de la piña, esta se lleva a cabo en tinajas de madera denominadas canoas con mazos del mismo material, todos elaborados expresamente para este fin. Una vez cocidas las piñas se sacan del horno y se colocan sobre pliegos de plástico en donde se cortan con un hacha en trozos pequeños que son colocados en la canoa y golpeados hasta reducir las piñas a fibras pequeñas (Fig. 4) llamadas dulce.



Figura 4. Corte y molienda de las piñas de Agave A. haw.

Las fibras se colocan en tinas que son elaboradas con madera de un árbol conocido como sabino y selladas con cera. Aquí se dejan reposar hasta tres días dependiendo del clima. El productor sabe cuando terminar el reposo tocando repetidamente el sustrato para evaluar la temperatura del mismo y cuando esta se eleva se dice que el sustrato ha comenzado a “trabajar” y entonces se añade agua en proporción aproximada de 5:1 o hasta cubrir por completo las fibras (Fig. 5).



Fig. 5. Tinas de madera en donde se colocan las fibras para añadirles agua.

Posteriormente las tinas se cubren con hojas de plátano y sobre estas se colocan bolsas de plástico y a partir de este momento se dejan reposar la fibra con agua de tres a cuatro días removiendo en intervalos irregulares a discreción del productor. Es importante mencionar que el proceso de fermentación es abierto y espontáneo, a diferencia de la elaboración de tequila en donde se utilizan inóculos (Lachance (a) 1995). El palenquero prueba en varias ocasiones el mosto y las fibras para determinar el avance de la fermentación, esta se detiene cuando se detecta en los primeros un sabor y olor penetrante a etanol. Entonces se retiran las cubiertas de las tinas y se prepara para la destilación exprimiendo las fibras de agave con las manos. (Fig. 6). Otro criterio utilizado por el productor para saber si la fermentación terminó es observar el tamaño de la perla,

este método consiste en observar las burbujas que se forman en las paredes de un recipiente al servir un líquido, a menor tamaño de burbuja o perla mayor concentración de etanol.



Fig. 6. Productor de mezcal “probando” el jugo y la fibra para conocer el estado de la fermentación.

Una vez concluida la fermentación se lleva el jugo a un aparato de destilación rudimentario construido con ollas de barro de 50 a 60cm de altura, las mismas están adaptadas de manera que al bullir el líquido este se condense en una tapa metálica (enfriada con agua corriente) que funciona como refrigerante y que deposita el destilado en un carrizo que generalmente desemboca en el recipiente de recolección (Fig. 7).

Con este proceso se obtienen dos fracciones, la primera comienza a recolectarse (después de tomar y desechar de 15 a 20ml del líquido que sale al inicio de la destilación) y se denomina punta o cabeza, este mezcal se tiene como el de mejor calidad y tiene entre 40 a 45° de alcohol. Este mezcal se obtiene cuando aproximadamente la mitad del volumen de la olla se ha evaporado.



Figura 7. Destilación del mezcal en alambiques de barro.

Después se obtiene el Xixe o corazón del tercer cuarto del volumen de la olla. Este mezcal es de menor calidad y tiene un gusto menos agradable y menor cantidad de alcohol 30-32°. Por último del cuarto de volumen restante se obtiene un licor de muy baja calidad que solo algunos productores destilan pues el precio al que se paga es demasiado bajo. Una vez obtenidos el mezcal punta y el xixe se destilan de nuevo para ponerlos "a punto" es decir para incrementar en la medida de lo posible la cantidad de alcohol y se almacenan en tanques de plástico para su venta.

En la mayor parte de los palenques de Sola de Vega el mezcal no se añeja y se comercializa tal como se obtiene después de la segunda destilación a un precio de entre 70 y 90 pesos el litro,

Es importante mencionar que se obtienen aproximadamente cinco litros de mezcal de una carga de agave de 100Kg (planta en crudo). Por otra parte la tonelada de agave en piña se vende aproximadamente en 1500 pesos, el precio puede variar dependiendo de la época del año, oferta y demanda.

Como ya se mencionó en otras localidades el proceso de elaboración es muy similar al descrito con anterioridad, algunas asociaciones de productores se cuenta con hornos de piedra y molinos egipcios (de tracción animal), sin embargo la mayor parte del mezcal se produce de manera tradicional. Incluso los grandes productores compran la bebida elaborada por campesinos e indígenas para después envasarla bajo una sola marca (Blomberg op cit.), en estos casos el mezcal puede modificarse mediante la adición de algún saborizante o añejarse para obtener diferentes clases de mezcal entre las que encontramos el mezcal joven que se envasa directamente después de la segunda destilación, el reposado que ha permanecido por lo menos dos meses en barricas de encino y el añejo que se somete aun proceso de maduración al menos por un año en barricas de encino o roble blanco americano, este producto es susceptible de ser abocado.

Factores que afectan al aroma y sabor del mezcal.

El sabor y olor de una bebida como el mezcal depende de una variedad de factores que incluyen la variedad de Agave utilizado, las practicas de cultivo de la planta, las de cosecha, la estación en la que se elabora el producto, la preparación particular de cada productor, la microbiota presente en la fermentación, el proceso de destilación y el de añejamiento. Algunos de estos factores son más fáciles de controlar y tienen mas importancia que otros, entre los más significativos para lograr un producto homogéneo y de buena calidad están: la materia prima y su preparación, y una fermentación adecuada que incluye una microbiota conocida y controlada. Estos factores se traducen en la producción compuestos químicos diversos como compuestos fenólicos, esterés, aldehídos, alcoholes alifáticos superiores, glicoles, que otorgan al destilado final el sabor y aroma que lo caracteriza.

En el mezcal y tequila se han caracterizado más de 18 compuestos distintos y se estima que puede haber más de 200 (Manjarrez & Llama 1969) sin embargo la mayor parte de ellos se encuentra en concentraciones muy bajas y contribuye a la complejidad del aroma de las bebidas pues su concentración esta por debajo del umbral necesario para ser apreciada por el gusto. Dentro de los compuestos que se encuentran en mayor proporción el tequila y mezcal (Cedeño 1995, Manjarrez & Llama 1969) se encuentran: el acetaldehído, los alcoholes superiores (aceite de fusel), el acetato de etilo, el etanol que si bien no siempre se considera como un compuesto de sabor y aroma si afecta al producto dependiendo de su concentración en el mismo. Por último se incluye el metanol por que la presencia de este compuesto en el producto final afecta severamente al mismo

cuando se encuentra en concentraciones superiores a la norma (200mg/L) volviéndolo no apto para el consumo.

Estos compuestos son producto del metabolismo de levaduras y cada especie e incluso cepa afecta de manera distinta al producto final (Patel et al 2003) ya sea a través de la producción de estos compuestos o de manera indirecta ejerciendo presión sobre las poblaciones de levaduras que los producen. En fermentaciones de vinos es aceptado en general que las levaduras no *Saccharomyces* contribuyen a mejorar el perfil aromático secundario de los vinos así como al sabor, mientras que las poblaciones de *S. cerevisiae* y la materia prima otorgan los sabores y aromas principales (Clemente Jiménez et al 2005, Patel et al 2003, Romano (c) et al 2003, Esteve-Zarzoso et al (a) y (b) 1998).

Importancia del estudio de la diversidad microbiana.

Puede definirse a la diversidad microbiana como la variedad en las especies de microorganismos que viven en un ecosistema, la variación genética que existe entre los miembros de estas especies y la variedad de ecosistemas en los que habitan (Halftter & Ezcurra 1992). El interés en el estudio de la biodiversidad obedece a fines taxonómicos y comerciales. En el primer caso es importante mencionar que aproximadamente un 5% del total de las especies existentes de microorganismos han sido aisladas, hay que recordar que la biotecnología está basada en la búsqueda y descubrimiento de organismos que al adaptarse a ciertas condiciones se vuelven explotables con fines comerciales. Como ejemplo en el año de 1993 en los Estados Unidos las ganancias que produjo esta industria fueron superiores a los 11 billones de dólares (Hunter-Cevera et al 1998).

Este enfoque es particularmente importante en el caso de los alimentos fermentados, donde se requiere un conocimiento sólido de los ecosistemas y de las poblaciones de microorganismos que viven en ellos en cada etapa de la producción y una explicación bioquímica y fisiológica de la forma en la que se desarrolla la colonización del alimento por los microorganismos (Fleet (c) 1999); todo esto con el fin de asegurar la calidad de los productos, hacer predicciones con respecto a las características finales de los mismos y para prevenir la putrefacción o la contaminación con patógenos.

Las levaduras y su importancia.

Las levaduras son hongos unicelulares situados en la escala evolutiva entre las bacterias y las células superiores (Collado 2001), que existen en ocasiones como pequeños arreglos de células y viven por lo general en ambientes fluidos, aunque hay excepciones. Poseen algunas de las características de los hongos superiores como un gran tamaño celular entre 10-100 μ , la misma organización celular, una composición química de la pared a base de quitina, hemicelulosa o celulosa y un metabolismo quimioorganotrófico, sin embargo su reproducción es casi siempre asexual (Fraizer 1978, Beuchat 1987). Las levaduras son organismos que pueden cambiar su metabolismo de oxidativo a fermentativo por lo que se les incluye en el grupo de los aerobios facultativos.

Las levaduras han estado asociadas a la humanidad de diversas maneras, en ocasiones causan graves daños a través de la contaminación y destrucción de alimentos y pueden también atacar al hombre como es el caso de *Candida albicans*, algunas especies de *Cryptococcus* y algunas otras levaduras que pueden convertirse en patógenos cuando se multiplican en humanos con sistemas inmunes comprometidos (Wheeler 2003), a pesar de todo el aporte de las levaduras a la humanidad en términos de enriquecimiento y preservación de los alimentos ha sido tan importante que el balance final da un saldo positivo.

Actualmente las levaduras se utilizan con otros fines además de la producción, enriquecimiento y preservación de alimentos. Se utilizan en la producción a gran escala de etanol, de vitaminas del complejo B, y tiamina, en la producción de diferentes proteínas y hormonas (principalmente esteroideas) utilizadas en medicina, en algunas fases de producción de antibióticos, en la producción de algunos colorantes como la astaxantina que se utiliza para dar el color rosa a la carne de salmónes criados en cautiverio, la producción de algunas enzimas para panificación, así como en la producción de biomasa para alimentar animales. Además de estos usos las levaduras tiene aplicación agroindustrial (Astromoff 2000) y en la industria de las biotransformaciones (King et al 2000).

Desde el punto de vista científico y académico, las levaduras y particularmente la levadura *Saccharomyces cerevisiae* constituyen el modelo de estudio de eucariontes más utilizado desde hace más de un siglo (Madigan et al 2001) fue con esta levadura con la que se estableció el primer modelo de fermentación en 1897, y con base en este trabajo de los hermanos Bunsen muchos bioquímicos famosos como Meyerhof y Embden establecieron los fundamentos del metabolismo de carbono, también fue el primer organismo eucariota del que se obtuvo la secuencia total de su genoma en 1996 (Goffeau et al (a) 1996 y (b) 1997).

Saccharomyces cerevisiae posee algunas características que la hacen atractiva como modelo de estudio; en principio es un organismo eucariota pero microscópico, de fácil manejo y no es patógeno salvo en casos muy raros como ocurre con personas que tienen un sistema inmune comprometido o deprimido (p.ej. enfermos de SIDA), es poco costoso y rápido obtener grandes poblaciones de esta levadura, es un microorganismo de fácil preservación; posee un ciclo de reproducción sexual y asexual fácilmente diferenciables y es relativamente fácil inducir la formación de esporas.

En términos de estudios de biología molecular *S. cerevisiae* posee un genoma con un tamaño que facilita la investigación 12 000Kb aproximadamente, arreglado en 16 cromosomas por célula haploide con un tamaño de entre 200 y 2200pb que en su mayor parte (70%) contiene información codificante (Astromoff 2000), y hasta el día de hoy se conocen 6300 marcos de lectura abiertos con un tamaño promedio de 1.5Kb, lo que las vuelve un microorganismo ideal para analizar la expresión y función de productos génicos de otros eucariotas, para producir proteínas recombinantes y para clonar fragmentos de DNA de gran tamaño (más de 200kb) que no pueden introducirse en vectores convencionales (Sherman 1997).

Identificación y clasificación de levaduras.

Antes de tratar con los métodos de identificación es necesario distinguir entre clasificación e identificación, pues aunque estas dos actividades de la sistemática biológica pueden estar relacionadas o entrecruzarse no son necesariamente lo mismo. Según Barnett et al (2000) la identificación es un proceso en el cual por comparación de las características de un organismo desconocido con las de otros ya caracterizados podemos saber que tipo de microorganismos es, y en la clasificación se trata de agrupar a los organismos en diferentes niveles u ordenes taxonómicos de acuerdo con similitudes actuales y relaciones evolutivas.

Del mismo modo en que ocurre con las bacterias, en las levaduras es difícil definir el término especie y ocurre muy a menudo que las levaduras previamente nombradas cambian de especie e incluso de género. Hoy en día es preferible hablar de cepas a las que se asigna un número para especificarlas, así aunque la clasificación taxonómica cambie la cepa será identificada con el mismo número. Con lo anterior en mente es posible definir una especie como un grupo de cepas con características similares entre sí, y a un género como un grupo de especies que comparten ciertas características. Desde un punto de vista molecular se define a las levaduras pertenecientes a una misma especie como aquellas con un porcentaje de homología mayor al 97% en los dominios D1/D2 del gen rRNA 26S (Kurtzman et al (d) 1998).

La identificación de levaduras se hace en base a las características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas de las mismas sin embargo este tipo de marcadores en ocasiones pueden ser ambiguos y muchas veces susceptibles a los cambios en el medio ambiente, a pesar de estos inconvenientes la identificación tradicional es muy utilizada.

Con el inicio de la era molecular se encontraron nuevos marcadores como las isoenzimas, y fragmentos de secuencia de DNA en los que el análisis de los rasgos fenotípicos quedaba en segundo plano pues esta nueva familia de marcadores se puede analizar directamente el genotipo.

- Recuperación y cultivo de levaduras.

Sin importar el tipo de metodología que se utilice para la identificación la necesidad de aislar las levaduras que se estudian sigue vigente pues el estudio de las mismas no obedece solamente al avance de la taxonomía, sino que es impulsado por las aplicaciones tecnológicas que pueden tener los organismos estudiados y solo aislándolos puede aprovecharse al máximo su potencial. Por esta razón la recuperación de las levaduras desde el ecosistema original en el que se encuentran hacia medios de cultivo más adecuados para el trabajo en el laboratorio consiste en el primer paso de la identificación.

Existen diferentes medios para recuperar y contabilizar levaduras, pero los más utilizados para este fin son el agar extracto de levadura extracto de malta, el agar levadura-dextrosa-peptona y el agar extracto de malta (Fields *et al* 1979, Barnett *et al* 2000). Estos mismos medios junto con el agar papa dextrosa (que también se utiliza como medio de mantenimiento) sirven para observar las características morfológicas de las levaduras estudiadas.

La temperatura promedio de incubación para las levaduras es de 25°C aunque la temperatura óptima de crecimiento suele variar por encima o por debajo de este valor dependiendo de la especie. Por otro lado el pH de los medios suele ajustarse con ácido tartárico o clorhídrico hasta valores de 3.5-3.8 para seleccionar solo levaduras.

Por último es importante recordar que para los trabajos de identificación es mejor trabajar con cultivos jóvenes (aprox. 24h) para obtener resultados más confiables, ya que a medida que un

cultivo envejece los cambios en las células de levaduras pueden dar lugar a falsos positivos o a malas interpretaciones.

- Observación Morfológica.

La observación morfológica es el siguiente paso en la identificación, con ella es posible tener un atisbo del tipo de levaduras con las que se trabaja. La observación morfológica se divide en dos partes, una que analiza a las colonias y la otra a las células con ayuda del microscopio.

En el primer caso se registran las características de la colonia como el color, tamaño, margen, elevación, consistencia y opacidad. Aunque las levaduras en general tienen pocas diferencias en cuanto a consistencia, opacidad y color, las demás características permiten una primera selección cuando en la identificación. En el segundo caso la observación se lleva a cabo bajo el microscopio y se buscan diferentes rasgos en principio la forma de las células que puede ser ovoide, esférica, alargada, cilíndrica o apiculada, también se observa el modo de reproducción vegetativa que puede ser por gemación bipolar, unipolar o multilateral; o por partición binaria. Además de la reproducción vegetativa se examina a las levaduras para ver si estas pueden ser capaces de crecer en filamentos (pseudohifas) y si producen o no esporas, si el examen es positivo en el último caso se analizan las esporas para ver que tipo son, este es un buen criterio de clasificación taxonómica pues permite incluir a las levaduras estudiadas en el género de Ascomycetos o Basidiomicetos, aunque no siempre es un buen método para la identificación.

- Pruebas fisiológicas.

Este tipo de pruebas se basa en la capacidad de las levaduras de crecer en diferentes condiciones físicas o en presencia de antibióticos y de utilizar diferentes compuestos como única fuente de carbono o nitrógeno (Middelhoven *et al* 2001, Barnett *et al* 2000, Fields *et al* 1979) y la capacidad que tienen de fermentar azúcares.

- Crecimiento con una sola fuente de carbono.

Estas pruebas están basadas en la capacidad variable de las diferentes especies para crecer en medios de cultivo que contienen compuestos diversos que sirven como única fuente de carbono, los compuestos que se usan son casi siempre azúcares, ácidos orgánicos y algunos alditoles. Para identificar una levadura se requiere ensayar más 50 de estos compuestos y se sugiere que los ensayos se hagan en 7 intervalos diferentes de temperatura de incubación (Barnett *et al* 2000) lo que vuelve a la identificación un proceso muy tardado y económicamente inasequible para muchos laboratorios, sin embargo el uso de sólo 15 a 25-30°C ofrece en la mayoría de los casos buenos resultados (Díaz *et al* 2000), los compuestos utilizados en estas pruebas son glucosa, galactosa, maltosa, lactosa, rafinosa, trehalosa, ribosa, glucosamina, xylosa, arabinosa, sacarosa, glicerol manitol, arabinosa y ácido acético.

Las pruebas pueden hacerse en medio líquido en tubos separados o en medio sólido, este último caso se conoce como auxanograma y es el más empleado pues permite hacer varios ensayos en una sola caja, en lugar de utilizar un tubo por cada uno.

- Crecimiento con una sola fuente de nitrógeno.

El fundamento teórico de las pruebas de asimilación de compuestos nitrogenados es el mismo que en el caso anterior, en estas pruebas se utiliza generalmente nitrato, nitrito y lisina como fuente de nitrógeno. Esta prueba es muy útil cuando se quiere diferenciar a las levaduras que son del género *Saccharomyces* de las que no lo son (Mills *et al* 2002, Romano *et al* (b) 1998), pues las primeras no pueden aprovechar la lisina.

- Fermentación de azúcares, esta prueba se basa en la capacidad que tienen algunas levaduras de fermentar uno o más azúcares, también se conoce como examen de degradación anaeróbica de azúcares y se basa en los postulados de Kluyver-Dekker (Díaz *et al* 2000) los cuales señalan que, toda levadura que no fermenta glucosa no fermenta a su vez ningún otro azúcar, toda levadura que fermenta la glucosa también fermenta fructosa y lactosa y, por último, que ninguna levadura puede fermentar maltosa y lactosa.

Además de las pruebas de asimilación de fuentes de carbono y nitrógeno así como de fermentación de azúcares, existen otros exámenes fisiológicos que también son útiles:

- Resistencia a antibióticos, generalmente se utiliza cicloheximida y la prueba se basa en la resistencia al antibiótico que muestran algunas levaduras que poseen ribosomas modificados (Jiménez 1975).

- Requerimientos vitamínicos, esta prueba se basa en las diferencias nutricionales de cada levadura, en general se ensayan; biotina, ácido fólico, ácido nicotínico, tiamina, riboflavina, ácido pantoténico y piridoxina.

- Producción de compuestos extracelulares, se examina la producción de compuestos similares al almidón a través de una reacción con yodo, es especialmente útil en la detección de géneros como *Cryptococcus*.

- Crecimiento en condiciones de estrés osmótico, el propósito de este examen es diferenciar a las levaduras capaces de crecer en concentraciones elevadas de azúcar o sal.

- Crecimiento en medios diferenciales, principalmente en medio Wallerstein que contiene verde de bromocresol el cual permite distinguir entre distintas clases de levaduras mediante su aprovechamiento diferencial (Pallman *et al* 2001) y medio selectivo cristal violeta que sirven para aislar levaduras del género *Saccharomyces* (Fal 1994).

Debido a la cantidad de pruebas que requiere la identificación fisiológica y al tiempo que lleva hacer un análisis de esta manera se han diseñado diferentes kits comerciales de identificación rápida que tienen el mismo fundamento que las pruebas anteriores pero permiten ser desarrolladas en menos tiempo, entre los más comunes están el Rapid ID Yeast plus, Fungicrom, API ID32 system, Auxacolor y el que probablemente es el más utilizado (Deak *et al* (c) 1993, Barnett *op cit*, Freydiere *et al* 200) tanto por su precio como por el porcentaje de identificación correcta que ofrece (97%) el API 20CAUX. La desventaja principal de estos kits de identificación es que fueron

diseñados en principio para su uso en la clínica por lo que su aplicación en alimentos es mas bien restringida (Deak et al (a) 1998 , Covadonga et al 2002, Wadlin 1999).

- Pruebas Bioquímicas.

Las pruebas bioquímicas son menos usuales en levaduras que en bacterias. La mayoría se basa en la composición química de la membrana como el análisis de ácidos grasos, en la presencia o ausencia de ureasa, o en el tipo de coenzima Q de las levaduras estudiadas (Deak et al (b) 1996). Son pruebas un tanto más elaboradas y por lo tanto menos factibles cuando se busca un método de identificación rápido, por lo que no se discutirán más a fondo.

- Métodos moleculares

PCR

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR puede utilizarse como un método de identificación por sí mismo cuando se utilizan cebadores especie o genero específicos o a través del RAPD (que será discutido más adelante). Sin embargo su principal aporte a la identificación de levaduras es constituirse como un punto de partida para diferentes métodos moleculares, pues permite la obtención de un número de copias elevado de una secuencia o gen en particular (eliminando la necesidad de trabajar con todo el genoma) siempre que se conozcan los extremos de la misma, esta secuencia puede ser amplificada en poco tiempo, de manera selectiva incluso en una matriz compleja, con cantidades mínimas de DNA diana.

Esta reacción se basa en la capacidad que tienen algunas DNA polimerasas termoestables de replicar *in vitro* una cadena molde o templado partiendo de una mezcla que contiene un exceso de desoxirribonucleótidos (dNTPs) y de fragmentos de secuencia llamados cebadores o primers que corresponde a los extremos 3' de la secuencia diana y que sirven como iniciadores de la reacción; esta consiste en múltiples ciclos de tres reacciones primarias que permiten la multiplicación de la secuencia diana (Fig. 8)

Desnaturalización: en esta etapa se utiliza temperatura (usualmente 95°C) para desnaturalizar (separar) las cadenas que conforman al DNA. Este proceso se conoce también como fusión, la separación de las cadenas establece las condiciones para la replicación del templado.

Alineación: en la etapa de alineación una disminución de la temperatura hasta valores de entre 60 y 70°C permite la hibridización de los cebadores o primers con la hebra molde. Las cadenas del templado no se reasocian entre sí debido a la baja concentración de las mismas en relación con los cebadores y las condiciones de astringencia.

Extensión: en la tercera reacción de cada ciclo, la temperatura se mantiene para permitir a la DNA polimerasa extender la cadena que inician los cebadores complementando la hebra molde a la

cual se han asociado. Generando nuevas hebras de DNA a través de la polimerización de los dNTPs.

Cuando ha terminado la extensión concluye también el primer ciclo de una reacción de PCR. Después se eleva la temperatura para llevar a cabo una nueva reacción de desnaturalización, que marca el inicio de otro ciclo en el cual no solo se amplifican las moléculas originales del templado sino también aquellas que se acaban de formar. A partir del segundo ciclo comienzan a sintetizarse hebras de la longitud deseada que superan rápidamente al templado original.

Es posible pensar que la reacción de PCR es más simple de lo que en realidad es y aunque en comparación con otras técnicas. Como la clonación es más sencilla y rápida la reacción de PCR requiere de un diseño cuidadoso y una idea clara de lo que se busca antes de llevarla a cabo. De este modo pueden variarse todos los factores como temperaturas y tiempo de alineamiento, pueden elegirse los primers adecuados o diseñarse si no existen, también puede escogerse una variedad de polimerasas que varían en los intervalos de temperatura en los que son activas y en la fidelidad con la que polimerizan las nuevas cadenas de DNA, todo esto para cubrir las necesidades de la reacción que se necesita. Las reacciones de PCR son particularmente susceptibles a la contaminación por DNA externo y es una práctica común en el laboratorio el tener lugares y materiales de trabajo especialmente designados para esta actividad, existen trabajos (Dieffernbach et al 1995) en donde se ofrece una guía para preparar un laboratorio en donde se creará una zona de trabajo para PCR, además de la contaminación la reacción puede inhibirse por múltiples factores que van desde las condiciones de reacción, y las concentraciones de reactivos hasta inhibidores externos que pueden estar presentes en la muestra de donde se extrajo el DNA o en el material de laboratorio como por ejemplo en los guantes o en las micropipetas (Rossen et al 1992)

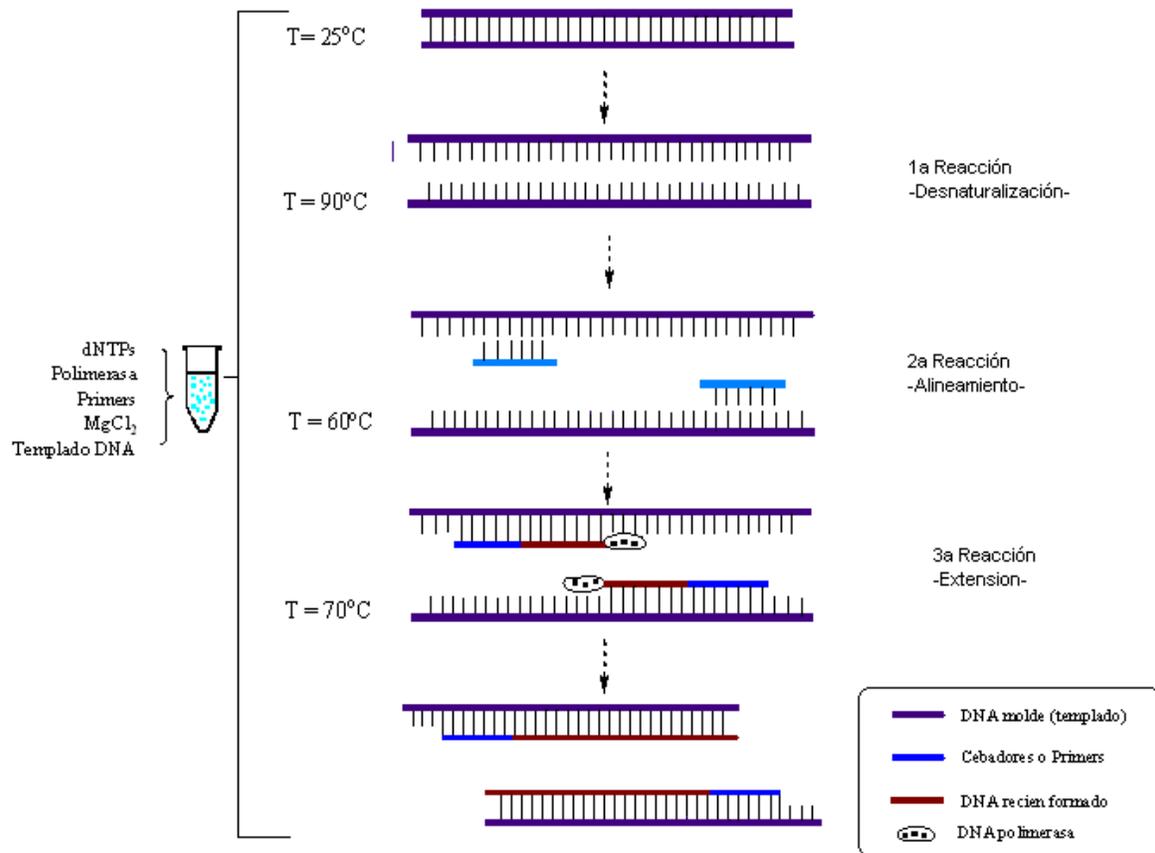


Fig. 8 Representación de un ciclo de la reacción de PCR

Con el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa a principios de la década de 1980 se inició un cambio en las estrategias de búsqueda, identificación y clasificación de los microorganismos, pues esta técnica impulsó a los métodos ya existentes en biología molecular y propició el desarrollo de nuevos. Estos ganaron terreno rápidamente por ser más confiables, rápidos y relativamente más fáciles de manejar (Bull *et al* 2000, Esteve-Zaroso *et al* (c) 1999). Además estos métodos novedosos permiten el análisis directo de la muestra sin necesidad del cultivo, lo cual resultó particularmente útil en los casos de detección de patógenos (Fleet (c) 1999) y en la estimación real de la diversidad microbiana en los alimentos (Giraffa *et al* 2001).

Con las necesidades de identificación expuestas en apartados anteriores y con solo 72000 especies de hongos (incluyendo levaduras) caracterizadas del millón y medio que se estima que existen, el trabajo de identificación de levaduras también se vio revolucionado por el adelanto tecnológico y se dio un nuevo impulso a la identificación molecular.

Los métodos moleculares de identificación están basados en su mayoría en similitudes o diferencias del DNA o RNA después de tratarlo de diversas formas. Para poder hacer comparaciones e identificar a las levaduras a través de su DNA es importante elegir un gen adecuado, el gen que se elija debe estar presente en todos los organismos que se deseen estudiar, debe tener también la misma función en todos ellos, debe ser un gen en el que la mayoría de las

mutaciones sean deletéreas, debe funcionar como un cronómetro evolutivo es decir la secuencia del gen debe cambiar con la frecuencia adecuada para que se guarde relación con la distancia evolutiva medida, además la secuencia debe tener regiones que sean conservadas para poder alinear y comparar con otras secuencias y también regiones que evolucionen mas rápidamente para poder hacer la identificación, por ultimo si es posible deber ser un gen al que se pueda acceder fácilmente (Madigan et al 1998 Dahllöf et al 2000, Prescott 2000). Los genes como el *recA* que codifica a la proteína involucrada en la respuesta SOS, el DNA mitocondrial (mtDNA), algunas proteínas de resistencia a choque térmico (heat shock) y en especial los genes que codifican al RNA ribosomal (rRNA) se han usado con fines de identificación y filogenia por cumplir con las características anteriores, de todos estos los genes ribosomales han sido los más estudiados y son también los que poseen las más amplias bases de datos en el caso de la identificación.

En la identificación de levaduras se han utilizado los rDNA (26S, 18S, 5.8S, 5S), y el mtDNA (Querol 1992), pues se sabe que ellos constituyen un mosaico de regiones conservadas y de regiones variables estas ultimas también llamadas dominios de expansión (Hopple et al 1997), los mejores resultados se han obtenido primero con el gen de la subunidad mayor 26S y posteriormente con la región abarcada por los espaciadores internos transcritos (ITS) que incluye al gen rRNA 5.8S.

En el caso del gen rDNA 26S (Fig. 9) se ha utilizado con éxito en trabajos extensos de identificación de levaduras y hongos como los de Kurtzman et al [(a) 1991, (c) 1997 y (d) 1998] y Moncalvo et al [(a) 2000], que han servido como paradigma para trabajos realizados en levaduras provenientes de vinos y productos lácteos (Fell et al 2000, Lopandic 2001) entre otros.

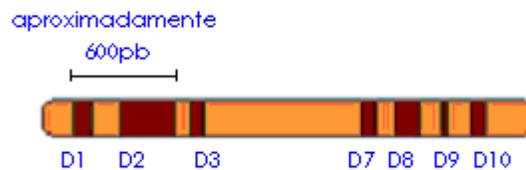


Figura 9. Representación del gen rDNA 26S (Moncalvo et al 2000)

Este gen destaca sobre los demás por ser relativamente pequeño, lo que permite obtener información del mismo sin dificultar su secuenciación, además posee zonas variables denominadas dominios de expansión arreglados de tal manera que el dominio D2 que es el segundo más variable de todo el gen, es adyacente al D1 que por el contrario es medianamente conservado. Así amplificando solo esta región de aprox. 600pb es posible hacer identificaciones hasta el nivel de especies (Kurtzman et al 1998, Cocolin et al 2002, Inácio et al 2003, Moncalvo et al 2000).

A pesar del uso tan generalizado del gen rRNA 26S, de la base de datos tan extensa con que se cuenta y de los buenos resultados obtenidos con él, la identificación por esta vía es un tanto costosa en cuanto a tiempo y dinero dada la necesidad de secuenciar, además de que en algunos casos como en la diferenciación de las levaduras del complejo *Saccharomyces sensu stricto* es necesaria mayor resolución para identificar a las diferentes especies.

Una alternativa surgió con el uso de la región comprendida por los espaciadores internos transcritos que separan al gen rRNA 5.8S del 18S y del 26S (Fig. 10), esta región es de menor

tamaño (400-900pb dependiendo de la especie) que los dominios D1/D2 del rRNA 26S, lo que simplifica el trabajo pero además los espaciadores son regiones más divergentes debido a que no tienen restricciones evolutivas (Egli et al 2001, Margarida et al 1996, Soji et al 2005) y se ha demostrado que esta región tiene en algunos casos mayor variación interespecies que los rRNA 18S y 26S (Esteve-Zarzoso et al (c) 1999, Fernández Espinar et al 2000) lo que la hace mas adecuada para la identificación, incluso existen reportes de polimorfismo inusualmente elevado en esta región en algunas especies de levaduras (Lachance (b) 2003).

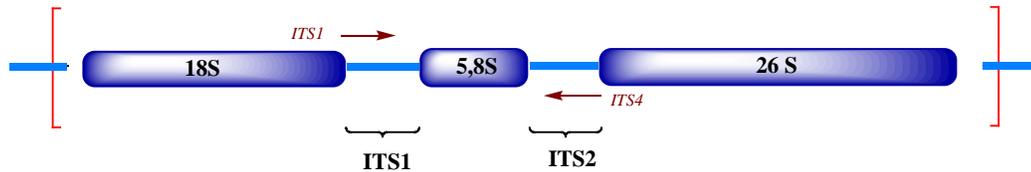


Figura 10. Localización de la región comprendida por los dos espaciadores internos transcritos del gen rRNA ITS, las flechas muestran la región amplificada por los primers ITS1 e ITS4.

Existen diferentes métodos de identificación molecular. A continuación se presenta una breve descripción de los mismos.

Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante DGGE

Esta es una técnica que se basa en las diferencias que existen en el comportamiento de fusión de dos fragmentos de DNA que difieren hasta en una sola base (Helms 1990) Así un fragmento de DNA se desnaturaliza (o pierde su estructura de doble hélice) a una determinada temperatura o concentración de un agente desnaturizante dependiendo de su secuencia, lo que lo hace migrar de manera diferente a los demás fragmentos con secuencias diferentes hasta que se detiene, de este modo es como se puede distinguir entre fragmentos con la mínima diferencia.

La técnica consiste en amplificar la región que se quiere analizar y hacer una electroforesis a los amplicones sobre una matriz de poliacrilamida que contiene una concentración creciente de un agente desnaturizante como urea o formamida. Los análisis por DGGE son reproducibles, confiables, y relativamente rápidos. Además permiten obtener una visión semicuantitativa de la dominancia de microorganismos dentro de un ecosistema dentro de sus desventajas y es muy útil en la detección de organismos viables no cultivables (Giraffa et al 2001). Entre las desventajas están el uso de agentes como la formamida o acrilamida, la necesidad de comprar el equipo que eleva los costos del análisis y la necesidad de secuenciar para asegurar que se tiene la información correcta.

DNA polimórfico aleatoriamente amplificado (RAPD).

Está técnica es una de las más utilizadas para identificación (Scott 2000), consiste en amplificar de manera aleatoria el DNA del organismo que se estudia. La amplificación aleatoria se consigue utilizando oligonucleótidos cortos (10pb) diseñados al azar y temperaturas de alineamiento bajas lo que promueve una baja especificidad. De este modo se obtienen productos de amplificación

diferentes para un solo individuo, estos fragmentos se separan en un gel de agarosa y se visualizan con bromuro de etidio, el DNA de cada organismo tratado de este modo ofrece un patrón característico con el que se puede identificar al mismo en una base de datos o mediante el uso de cepas de colección. Esta técnica es una alternativa rápida de identificación y se ha usado con éxito en diferentes trabajos, por citar algunos (Lopandic et al 1999 , Xufre et al 2000, Andrighetto et al 2000, Stewart 1996), sin embargo su principal inconveniente es que los resultados obtenidos no son fácilmente reproducibles de un laboratorio a otro (Scott 2000, Giraffa et al 2001) además de que las bajas condiciones de especificidad promueven la formación de artefactos de PCR que pueden dar lugar a malas interpretaciones.

Fluorescencia de Hibridación *in situ* (FISH)

La teoría de las hibridaciones *in situ* es la misma que en el Southern Blot con la diferencia de que en este caso la sonda se hibrida directamente sobre el cromosoma del organismo estudiado. Esta técnica es útil para precisar la distribución de microorganismos en un ecosistema, pues permite estudiar las muestras con pocos disturbios en el ambiente (Giraffa et al 2001), además las sondas que se utilizan se diseñan de manera que sean específicas para cada individuo o grupo de individuos (Inácio et al 2003), en resumen la técnica consiste en fijar las células con formaldehído, tratar la membrana celular para hacerla permeable si es el caso, después inmovilizar las células en portaobjetos, y por último se debe incubar las células en la preparación de oligonucleótidos fluorescentes y observar al microscopio de fluorescencia. En cuanto a las desventajas de la técnica es preciso contar con el equipo lo que la vuelve costosa, además en algunos casos la accesibilidad de las sondas hacia la región con la que debe hibridar no es la mejor y pueden no darse hibridación alguna. Fuera de esto la técnica es una excelente opción para la identificación y el estudio de la distribución microbiana.

Análisis del polimorfismo de conformación de una sola hebra (SSCP)

Esta técnica está basada en la migración diferencial que tienen fragmentos de DNA de una sola hebra en un gel de poliacrilamida debido a la estructura secundaria que pueden formar al autoalinearse, al igual que con el DGGE los cambios de una sola base pueden alterar la formación de la estructura secundaria y con ello la migración electroforética. Así los fragmentos de PCR se marcan de manera radioactiva y se desnaturalizan químicamente para ingresarlos en el gel de poliacrilamida y llevar a cabo la electroforesis, los geles se visualizan por autoradiografía y el patrón obtenido para cada individuo es específico del mismo.

Análisis de los polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).

Se llama polimorfismo genético a la existencia de formas alternativas de un gen (alelos) en un locus determinado. Así dentro de una población pueden existir individuos con versiones distintas del mismo gen (alelos) para un locus determinado, cada alelo difiere de los demás en la secuencia de DNA, de modo que estos cambios pueden o no alterar la función del producto génico y pueden o no mostrar un cambio en el fenotipo. Un ejemplo de polimorfismo genético lo ofrecen los genes que dan el tipo sanguíneo en los humanos (Lewin 2000)

Si se somete a un tratamiento con enzimas de restricción el DNA de un individuo dado se obtiene (dependiendo de la enzima) una mezcla de fragmentos de DNA que al ser visualizados en un gel ofrecen un mapa de restricción del genoma del individuo.

Cuando se analiza el genoma de dos individuos pertenecientes a un mismo género, algunas regiones de DNA pueden existir en los individuos como formas alternas con pequeñas variaciones en la secuencia, estas variaciones (resultado de mutaciones en los genomas de los individuos) crean o destruyen sitios de restricción de manera que al analizar el mapa de restricción las variaciones en la secuencia se traducen en variaciones en la longitud de los fragmentos de DNA resultantes, dejando a cada individuo con un mapa único que los caracteriza. Los mapas de restricción de estos individuos mostrarán fragmentos en común que los identificarán como miembros del mismo género, pero también otros en los que podrían diferir y que los colocarían dentro de especies diferentes.

El análisis de los mapas de restricción del genoma completo de un organismo como las levaduras puede ser complicado por la cantidad de fragmentos a analizar, el inconveniente queda resuelto con el uso de la reacción de PCR, de modo que es posible analizar solamente una parte del genoma siempre que esa parte contenga la información que se busca.

En el caso de la identificación de levaduras por PCR-RFLP se requiere contar con los aislados de las levaduras a identificar para poder extraer el DNA de las mismas, después se amplifica por PCR la región del gen a estudiar en este caso la región comprendida por los ITS; una vez que se tiene el producto de PCR este se digiere con una o más enzimas de restricción tipo II (existen tres tipos de endonucleasas de restricción, las de tipo I y tipo III poseen actividad de metilasa mientras que las de tipo dos no exhiben esta actividad Smith et al 1997), y la mezcla de restricción se resuelve en un gel de agarosa que contiene un marcador molecular adecuado, se tiñe y se registran los perfiles de restricción para cada organismo. La identificación puede hacerse ingresando los perfiles de restricción en una base de datos o comparándolos con cepas de referencia con ayuda de un programa como el Lane Manager. Las ventajas de la técnica son su alta reproducibilidad, la rapidez con la que se identifica una muestra y la resolución que tiene pues dependiendo de la enzima de restricción pueden hacer identificaciones hasta el nivel subespecie (Arias et al 2002, Fernández Espinar et al 2000, Guillamon et al 1998 Esteve-Zarzoso et al (e) 2001, etc.). Entre las desventajas del método se encontraba principalmente la baja cantidad de información al respecto y la falta de una base de datos confiable, desventaja que ha venido a menos con los trabajos de Esteve-Zarzoso y su grupo de trabajo (1999-2001) que dieron inicio a la primera base de datos reportada para identificación de levaduras por perfiles de restricción de la región comprendida por los ITS.

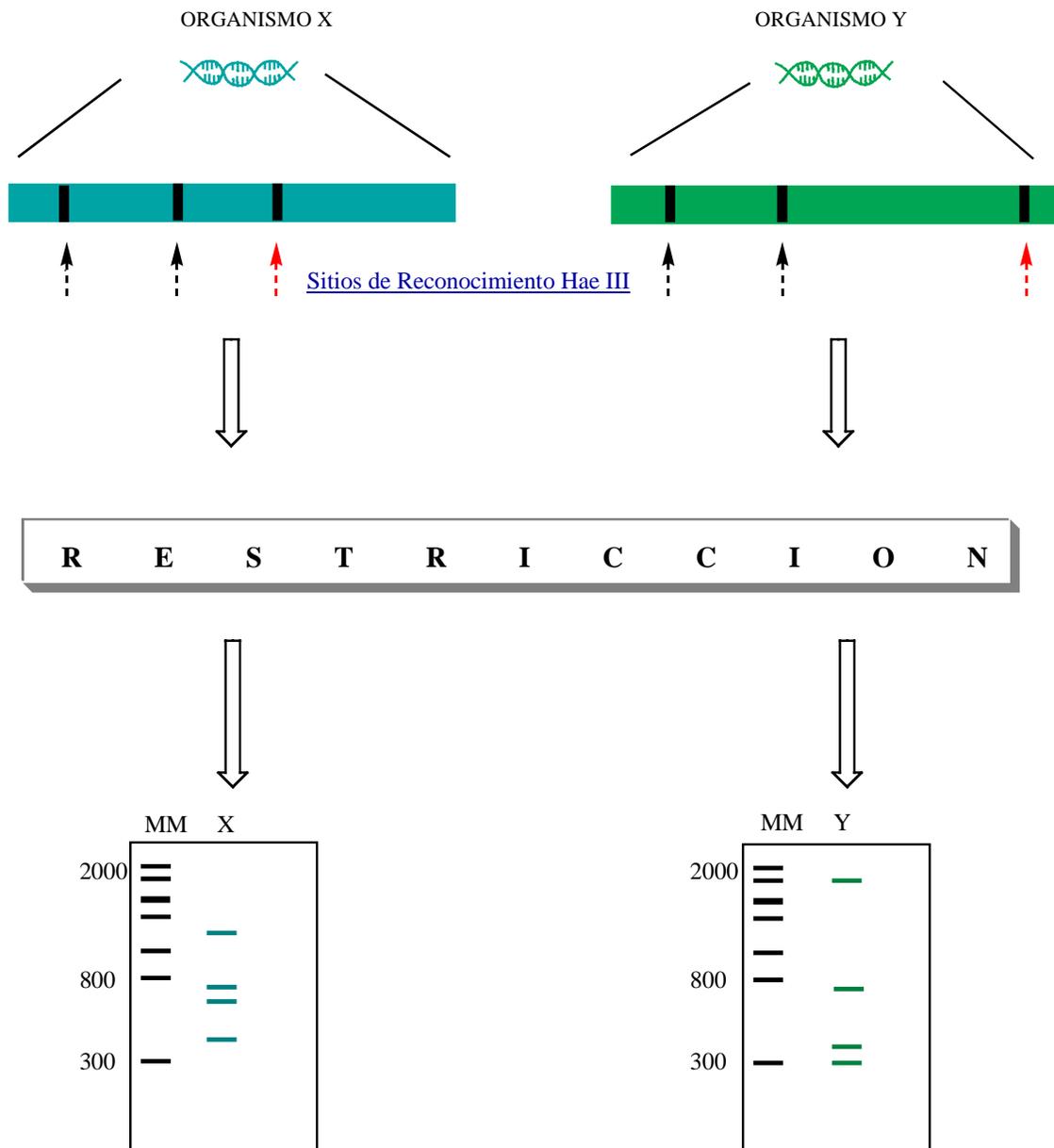


Fig. 11. Fundamento teórico de la técnica de RFLP. El mismo sitio de reconocimiento se encuentra en una posición distinta dentro del producto de PCR, lo que da como resultado en el caso del individuo A dos fragmentos de tamaño muy diferentes y con el organismo B dos muy similares, estos fragmentos visualizados sen un gel de agarosa rinden patrones de restricción distintos

Análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos terminales de restricción (T-RFLP)

En esta técnica, muy similar al RFLP se utilizan primers que contienen una etiqueta fluorescente en el extremo 5' así los fragmentos producto de la reacción de PCR que se digieren se encuentran marcados, después se analizan los fragmentos por electroforesis utilizando un dispositivo para detectar los fragmentos fluorescentes, así únicamente los fragmentos de restricción terminales de cada producto de PCR son detectados

Las identificaciones realizan analizando los fragmentos terminales que suelen ser característicos de cada organismo analizado. Esta técnica es una herramienta comúnmente utilizada para el estudio de la dinámica de poblaciones en suelos, bioreactores, y lodos de tratamiento de aguas (Terence et al 2000, Jirafa et al 2000)

Análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP)

Esta técnica combina elementos de RFLP y PCR y se basa en la amplificación selectiva por PCR de fragmentos de restricción (Vos et al 1995), la técnica consiste en cortar el DNA analizado con dos enzimas de restricción con diferentes frecuencias de corte una claramente mayor que la otra, esto produce un juego de fragmentos de restricción a los que se ligan en los extremos pegajosos (generados por las enzimas de restricción) oligonucleótidos de 18-20pb llamados adaptadores , después se realiza una amplificación utilizando primers complementarios a los adaptadores y a uno o dos nucleótidos mas lo que introduce un factor de selectividad y reduce el numero de amplicones, si es necesario se realiza otra reacción de PCR aumentando un nucleótido más en los primers, para interpretar los resultados los fragmentos se separan en geles de poliacrilamida de tipo desnaturalizante y se obtienen patrones de bandas característicos para cada individuo, la técnica es muy útil en muchos sentidos pues ofrece información sin ser obligatorio el conocimiento de la secuencia que se estudia y es una técnica reproducible, por otra parte entre sus desventajas encontramos la complejidad de los patrones de bandas que muchas veces requieren un análisis por computadora que eleva los costos en tiempo y dinero.

Análisis de Restricción de DNA ribosomal Amplificado (ARDRA).

Esta técnica es muy similar al RFLP con el único cambio de que en el ARDRA el análisis de restricción se hace únicamente sobre genes ribosomales. Una versión automatizada de esta técnica incluye el uso de primers marcados en el extremo 5' con alguna sustancia fluorescente; después de la amplificación el producto de amplificación se digiere con diferentes enzimas de restricción y los fragmentos combinados se cargan en un solo carril de un gel para secuenciar, los fragmentos se separan y los datos generados se comparan con otros utilizando una base de datos. (Giraffa 2000)

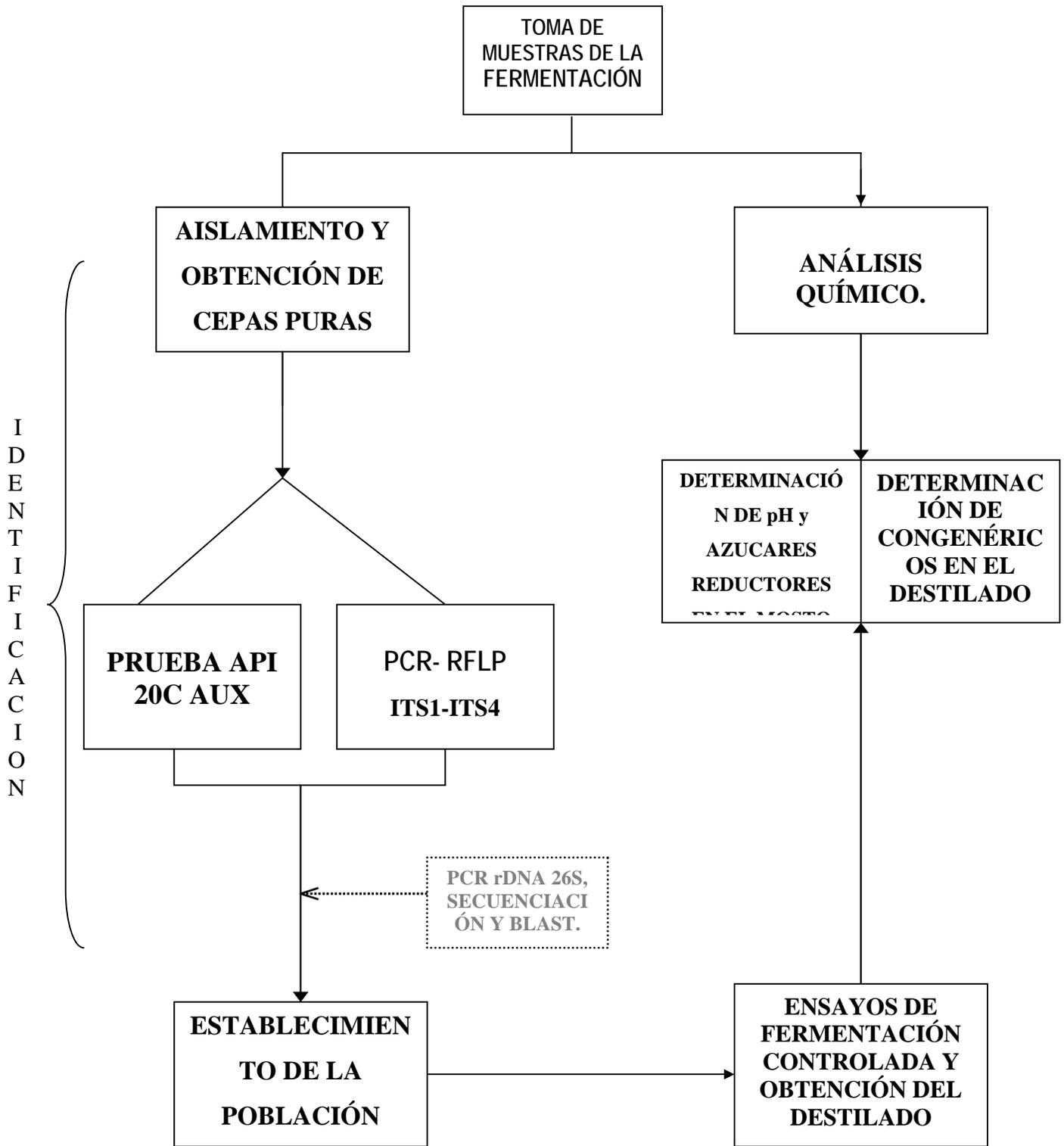
HIPÓTESIS.

“Si *S. cerevisiae* se mantiene durante la fermentación de mostos para producir mezcal, y se constituye como la población dominante, entonces esta levadura debe ser la principal contribuyente a las características organolépticas del destilado”

OBJETIVOS.

- Identificar a las levaduras presentes en los mostos de *Agave angustifolia* haw durante la elaboración de mezcal utilizando métodos metabólicos tradicionales y el análisis de bandas del patrón PCR-RFLP de la región 5.8s RNAr-ITS.
- Establecer los cambios que ocurren en las poblaciones de levaduras, utilizando cuenta total en placa, a medida que se desarrolla la fermentación.
- Establecer la contribución de las levaduras más abundantes, inoculadas de manera individual en una fermentación controlada, en términos de producción de etanol, acetato de etilo, acetaldehído, y alcohol amílico e isoamílico.

MATERIAL Y MÉTODOS



Muestreo de los mostos de *A. angustifolia haw.*

Las muestras se recolectaron en diciembre en la región de Sola de Vega Oaxaca. Se tomaron en total seis muestras en intervalos de 24 horas a lo largo del periodo de fermentación. La primera muestra se tomó antes de la adición de agua (muestra sólida) y se designó como "tiempo cero" (T_0), posteriormente se tomaron muestras líquidas y se designaron como T_1, T_2, \dots etc. Hasta el final de la fermentación T_5 .

El muestreo se realizó con ayuda de jeringas estériles de 50cc, a 10cm por debajo de la superficie del líquido en la tina de fermentación, para obtener una muestra representativa (Allsop 1995). La superficie de la tina se dividió en cuatro cuadrantes y después se tomaron con la jeringa 10ml de cada cuadrante en un punto aleatorio del mismo y se mezclaron en un tubo de 50 mL, al final para obtener una muestra de 40ml (100g en el caso de la fibra). Todas las muestras se tomaron por duplicado en cada tiempo. Las muestras se etiquetaron dependiendo del día en que fueron tomadas y se almacenaron en nitrógeno líquido (-196°C) previa protección de las células con 10% de glicerol. También se tomaron muestras de 200ml de cada tiempo sin glicerol para el análisis químico del mosto y tres muestras de 100ml del destilado.

Aislamiento e identificación de levaduras encontradas en los mostos de *A. angustifolia haw.*

Conteo total de mesófilos aerobios y levaduras en las muestras de *A. angustifolia haw.*

La cuenta total de mesófilos aerobios se llevó a cabo por el método de dispersión en placa de acuerdo a lo propuesto por Milisevic (1992) de la siguiente manera.

Para cada una de las muestras líquidas se prepararon en tubos de ensayo estériles diez diluciones decimales sucesivas de 1ml de muestra en 9ml de agua 0.1% peptonada (Bioxon) estéril. En el caso de las muestras sólidas también se prepararon diez diluciones sucesivas de la siguiente manera se colocó 1g de muestra en una bolsa de plástico estéril y se añadieron 9ml de agua peptonada al 0.1% para posteriormente someter las muestras a 30seg. de agitación en un Stomacher 400 (Seward 400). Las nueve diluciones restantes se prepararon como se indica en el párrafo anterior.

Con 0.1ml de cada dilución se inocularon cajas de petri con medio ACP (Bioxon) para realizar la cuenta total de mesófilos aerobios. Para llevar a cabo el conteo de levaduras y comparar la población de estas con la cuenta total se duplicaron las cajas petri con medio ACP (Bioxon) de la cuenta total sobre cajas de los medios agar extracto de levadura extracto de malta AYM (Bioxon) y Agar papa-dextrosa o "PDA" (Bioxon), suplementados con una solución de ácido tartárico (Sigma) hasta un pH de 4.0.

Las cajas se incubaron durante 72h a una temperatura de $24-28^\circ\text{C}$, y se procedió al conteo de las colonias. Las cajas en donde el crecimiento fue menor o igual a 300 UFC fueron las que se contabilizaron. Todas las cajas se sembraron por duplicado y los resultados reportados, en todos los casos, son el promedio de los conteos.

Aislamiento y obtención de cepas puras de levadura de las muestras de mostos de *A. angustifolia haw.*

Una vez realizada la cuenta en los tres medios, se identificaron las diferentes morfologías presentes y se contó el número de colonias de cada una de ellas para realizar posteriormente una estimación de la proporción en la que cada levadura se encuentra durante cada etapa de la fermentación.

De cada morfología distinta se tomaron aleatoriamente una a una diez colonias que fueron resembradas de manera individual por estría en cajas de medio PDA (Bioxon) acidulado (pH 4.0) para descartar la presencia de bacterias.

Posteriormente las diez colonias de cada morfología se resembraron en una caja de medio WL para diferenciarlas cuando fue posible a través las mismas características de aprovechamiento del colorante

Después se llevó a cabo el examen microscópico para el cual todos los aislados se resembraron en medio YM (Bioxon) y se incubaron durante 24 horas, transcurridas éstas se realizó un examen en fresco bajo los objetivos 10 y 40x de todas las morfologías resembradas para determinar la morfología celular y el modo de reproducción vegetativa.

Una vez que se registró la morfología celular de cada uno, se resembraron nuevamente en medios diferenciales de lisina y cristal violeta para separar a las del género *Saccharomyces* de las que no lo eran.

Todas las levaduras aisladas se mantuvieron a 4°C en tubos inclinados de medio PDA acidulado para su conservación.

Identificación con la prueba API 20CAUX de los aislados obtenidos en las muestras de mostos de *Agave angustifolia haw.*

En esta etapa tres de las diez levaduras resembradas de cada morfología aislada se sometieron a la prueba API 20CAUX (Biomerieux) como primer criterio de identificación. El procedimiento fue el propuesto por el fabricante; se tomó una asada de un cultivo nocturno (24h) con el que se inocula el medio C proporcionado en el Kit hasta una turbidez de 2 en la escala de Mc Farland, con esta suspensión se inoculan las tiras y se colocan en la bandeja de incubación durante 72h a una temperatura de 25-29°C, los resultados se registraron cada 24 h, y se dió como positivo los pozos que presentaban turbidez mayor que la del control negativo. Concluido el tiempo de incubación y con la hoja de resultados, estos se ingresan a la base de datos con el programa API-Lab (Biomerieux) para obtener los porcentajes de identificación de cada una de las cepas. La prueba se realizó por duplicado para cada cepa estudiada.

Extracción de DNA de las levaduras aisladas de la muestra sólida T₀.

La metodología utilizada para extraer el DNA de los aislados de la muestra T₀ fue la siguiente.

Se preparó un cultivo nocturno del aislado en cuestión en 20mL de caldo YM sometidos a un periodo de agitación de 48h a (180rpm) a temperatura ambiente, las células se cosecharon por centrifugación (20 min. 13 000 rpm) y se lavaron, centrifugando en las condiciones antes mencionadas para posteriormente resuspenderse en 2ml de agua destilada estéril, posteriormente se colocó 1mL de esta suspensión en un tubo de centrifuga de 1.5mL, el cual se centrifugó a 15 000 rpm durante 5min. Las células se rompieron por disrupción mecánica de la siguiente manera; se

colocó un mililitro de suspensión celular de cada aislado en un tubo de centrifuga de 1.5mL y se llevó a una microcentrifuga durante 5min. para formar una pastilla. El sobrenadante se descartó y se adicionó a cada tubo una cantidad de perlas de vidrio de 0.5mm Ø equivalente a un volumen de 200mL, después las células se rompieron con ayuda de una punta para micropipeta y se llevaron al vortex en dos intervalos de 10 minutos con un minuto de descanso entre intervalos. Después de la disrupción se adicionaron 1000uL de buffer de extracción a cada tubo y se mezclaron con la punta de una pipeta. Posteriormente se llevaron nuevamente al vortex en dos intervalos de un minuto con un minuto de descanso en hielo terminada la agitación, los tubos se llevaron a la centrifuga y se dejaron ahí durante 10min a máxima velocidad. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos en donde se les adicionaron 490uL de emulsión fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (Sigma) y mezclaron suavemente en un vortex, se llevan a centrifugar 10min a máxima velocidad y este paso se repitió una vez más. Posteriormente, se removieron 600uL de sobrenadante hacia un nuevo tubo y se adicionaron 500uL de cloroformo, se agitaron los tubos en el vortex ligeramente y se centrifugaron durante 5min a máxima velocidad. Después el ADN se precipitó transfiriendo 400uL de sobrenadante hacia tubos nuevos y adicionando lentamente 325uL de isopropanol por las paredes del tubo, se mezcló por inversión un par de veces y después se llevó el tubo a la centrifuga para formar una pastilla de ADN durante 3min a máxima velocidad, en los casos en los que no se observó precipitado los tubos se incubaron a -7°C por dos horas y transcurridas estas se adicionaron 4uL de acetato de amonio 3M, se centrifugo como antes y se decantó el sobrenadante con cuidado. La pastilla formada se lavó cuidadosamente con 1mL de etanol al 70%, se deshecho el etanol y mientras la pastilla aun se encontraba húmeda se agregaron 100uL de agua deionizada estéril

Después de la extracción el DNA se incubó a 55°C durante 5min y se procede a la cuantificación por espectroscopia de UV.

Extracción de DNA de las levaduras aisladas de las muestras líquidas T₁, T₃ y T₅

Disrupción enzimática.

Este método fue propuesto por López (2001) y es una modificación del método original de Querol (1992).

Se preparó un cultivo nocturno de cada uno de los aislados (20mL de caldo YM en agitación durante 48h a 180rpm y a temperatura ambiente), las células se cosecharon por centrifugación (20 min. 13 000 rpm), se lavaron, se centrifugaron en las condiciones antes mencionadas y se resuspendieron en 2mL de agua destilada estéril, posteriormente se colocó 1mL de esta suspensión en un tubo de centrifuga de 1.5mL, se centrifugó a 15 000rpm durante 5min. Una vez cosechadas las células se formó una pastilla con ellas centrifugando a máxima velocidad durante tres minutos, después se resuspendió la pastilla en 95uL de buffer sorbitol(1M)-EDTA (0.1M) y se adicionaron 5uL de una solución Zymoliasa (Sigma) [2.5mg/mL]. Después, los tubos se llevaron a incubar en baño de agua a 37°C durante 20min para formar los esferoplastos. Estos se recolectaron centrifugando los tubos durante 5min a máxima velocidad y descartando después el sobrenadante. La pastilla obtenida se resuspendió en 100uL de buffer Tris-EDTA pH 4.7, se le adicionaron 10uL de SDS 10% y se llevó a mezclar al vortex ligeramente y después a incubar nuevamente a 65°C . Inmediatamente después de que terminó la incubación se adicionaron 40uL de acetato de potasio 5M (Sigma) y se colocaron los tubos en hielo durante 5 minutos. Transcurridos éstos se llevó a centrifugar 15min a máxima velocidad y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo al que se adicionó con cuidado un

volumen igual de isopropanol, la mezcla se agitó suavemente y se incubó a temperatura ambiente durante 10min después de los cuales se recolectó el precipitado por centrifugación a 14,000 g durante 10min. Finalmente se lavó la pastilla con etanol al 70% se centrifugó como antes y se descartó el etanol, se secó a vacío la pastilla y una vez seca pero no cristalizada se adicionaron 50ul de agua bidestilada o buffer TE 1x estéril.

- Cuantificación de DNA por UV.

Debido a su estructura química la molécula de ADN presenta una absorbancia máxima a una longitud de onda de 260nm. Esta única medición realizada por triplicado sería suficiente para determinar la concentración de ADN con el factor $1 \text{ DO} = 50\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Si el ADN se encontrara puro en la muestra sin embargo casi siempre se encuentra en presencia de algunas proteínas por lo que se determina la cantidad de estas midiendo absorbancia a 280nm. Con los valores obtenidos de ambas mediciones se determina la pureza de la muestra a través de la relación $A_{(\text{ADN})} / A_{(\text{Proteínas})}$ si esta es igual o mayor a 1.7 la muestra tiene una buena pureza y puede ser utilizada sin ningún proceso previo de purificación.

Para cuantificar el DNA se utilizó un espectrofotómetro de UV/VIS Genesis 5 (Spectronic) con celdas de cuarzo de 1cm de trayecto óptico. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

- Amplificación por PCR de la región comprendida por los dos ITS del gen rRNA.

El método propuesto es una modificación al de Esteve-Zarzoso et al [(c)1999] y Raspor et al (2001). La amplificación de la región comprendida por los ITSs fue llevada a cabo en un Termociclador Gene Thermal Cycler (Perkin Elmer). Los primers utilizados fueron el ITS1 0.5uM [5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'] y el ITS4 0.5uM [5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'] descritos por White (1990). Los componentes restantes se enlistan a continuación; templado de ADN [$\approx 50\text{ng}/\mu\text{l}$], dNTPs (Invitrogen) 10uM, MgCl₂ [1.5mM], Taq Platinum (Invitrogen) [1.5U/ μl], el volumen final se ajustó en todos los casos a 50ul.

Se utilizó el siguiente programa de temperaturas, una desnaturalización inicial de 5min a 95°C y después 35 ciclos de 1min. de desnaturalización a 95°C, 2min de alineamiento a 52°C y 2 min. de extensión a 72°C, seguidas por una extensión final de 10min a 72°C.

Los pesos del producto de amplificación se estimaron con el marcador de peso molecular DNA X (0.7-12.2Kb, Boehringer Mannheim)

- Restricción del producto de PCR-ITS e Identificación por RFLP.

La digestión de los productos de PCR se llevó a cabo de acuerdo con lo propuesto por Esteve-Zarzoso(1999), con las enzimas de restricción Cfo I, Hae III y Hinf I (Roche) de la siguiente manera:

Se toman 10ul (0.5-1.0) de producto de PCR y se transfieren a un tubo eppendorf nuevo, se adiciona 1ul de suspensión de enzima (1U/ul) y 2.5ul de buffer de lisis (Shure-cut Roche) y se lleva a un volumen total de 25ul. Esta mezcla se incuba a 37°C durante 4horas.

Para visualizar el producto de digestión se colocaron 2uL de la mezcla en un gel de agarosa al 3%, la electroforesis se llevó a 400mA y 80V durante 1h, se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb (100bp ladder-Gibco). El gel obtenido se tiñe con una solución bromuro de etidio (0.5ug/ul) durante 20minutos, se observa en el transiluminador de luz UV para comprobar la restricción y se fotografía con un tiempo de exposición de 30s.

La identificación se realizó comparando los perfiles obtenidos contra los publicados por Esteve –Zarzoso et al (Ibíd.). Para los casos en los cuales los perfiles de restricción no permitieron una identificación se utilizó como tercer criterio de identificación la secuenciación de los dominios D1/D2 del gen rDNA 26S.

Es importante mencionar que cada cepa ensayada se identifico por triplicado por este método, es decir una vez aislada una cepa e identificada por API se tomaron tres colonias distintas de la misma caja y se utilizó el DNA de cada una para usarlo en el PCR y posteriormente someterlo a RFLP.

- Amplificación de los dominios D1/D2 del gen rRNA 26S.

La amplificación de la región mencionada arriba se llevó a cabo con el método propuesto por Kurtzman et al [(d)1998]; a continuación se describen los reactivos y el programa de temperaturas. Los primers utilizados fueron el NL1 0.2mM [5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG] y el NL4 0.2mM [5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG], también se utilizaron MgCl₂, dNTPs (Invitrogen) 10uM, Taq platinum (Invitrogen) 1.5U/uL y un templado de DNA a una concentración aproximada de 50ng/ul en el tubo de reacción.

El programa de temperaturas constaba de 5min iniciales de desnaturalización a 95°C y después 35 ciclos de 1min a 95°C de desnaturalización, 1.5min a 57°C de alineamiento y 2min de extensión a 72°C, además una extensión final de 7min a 72°C.

Los pesos de los productos de PCR se determinaron como en el caso anterior.

La amplificación de los dominios D1/D2 se llevó a cabo solo en los casos en los que el patrón de restricción no permitió identificar a una determinada levadura, o cuando existieron incongruencias severas entre la identificación microbiológica-fisiológica con la identificación molecular. En esos casos específicos después de la amplificación el producto de PCR se envió a secuenciar (Instituto de Fisiología Celular, UNAM) y la identificación se realizó a través de un análisis comparativo de secuencias con ayuda de la herramienta básica de alineación local (BLAST). Esta identificación fue tomada como definitiva cuando los porcentajes de identidad para las levaduras analizadas fueron mayores o iguales a 97%.

Análisis Químico de las muestras.

- Determinación del pH en las muestras T₀-T₅ de mosto de *A. angustifolia* haw.

La determinación del pH en las muestras se llevó a cabo en el lugar de recolección con papel pH (Color pHast EM-Reagents) y en el laboratorio con un potenciómetro Jenway 3020 de la siguiente manera:

Se toman 30ml de muestra y se colocan con ayuda de una pipeta en un vaso de precipitados de 50ml que contenía un agitador magnético de 1cm y se homogenizó la muestra durante 1 min., después se introdujo el electrodo del potenciómetro (que ha sido previamente calibrado con soluciones de pH conocido) en la muestra y se le permitió estabilizarse durante uno o dos minutos después de los cuales se tomó la lectura. Todas las lecturas se tomaron por triplicado a temperatura ambiente

- **Determinación de Glucosa y Fructosa en las muestras T₀-T₅ (HPLC)**

El procedimiento utilizado para la determinación de los azúcares reductores se describe a continuación:

Se toman 10ml de muestra de cada tiempo de la fermentación, estas muestras se filtraron a través de una papel Whatman de poro fino y se centrifugaron a 13,000rpm durante 20min. Posteriormente se filtraron a través de membranas de 0.45um de diámetro (Millipore) y se llevan a sonicar durante 10min para eliminar el gas.

El volumen de inyección fueron 10ul, se utilizó un cromatógrafo Waters 525 equipado con un detector de índice de refracción LC-30RI (Perkin Elmer) y una columna Shodex RS pak KC-811, la temperatura del horno fue de 50°C.

La fase móvil utilizada fue H₃PO₄: H₂O 0.1%, a un flujo de 1.0ml/min., se utilizó la columna Shodex mencionada arriba. La concentración de los azucares se determino por el método de estándar externo, a partir de curvas de calibración.

Ensayos de Fermentación controlada.

Hidrólisis de los carbohidratos presentes en las piñas de *Agave angustifolia* haw:

Los corazones de agave se cortaron en trozos pequeños y se colocaron en vasos de precipitados de 2L, se pesaron y se prepararon para la hidrólisis adicionando 10ml de H₂SO₄ (0.1%) por cada kilogramo de agave, una vez preparados de esta forma los vasos se cubrieron con papel aluminio y se dejaron en la autoclave durante 6 horas a 90°C.

Molienda de las piñas:

En este paso se extrajo el jugo de los trozos de piña con ayuda de un extractor de jugos modelo T1 (TURMIX), las fibras se desecharon y el jugo se pasteurizó a 90°C durante 50min.

Determinación de sólidos solubles en el jugo extraído de las piñas de *Agave angustifolia* haw.

Los sólidos solubles se determinaron en todas las muestras utilizando un refractómetro (Atago HNR-32 0-32 Brix). De la siguiente manera; el refractómetro se calibra a 0 con agua deionizada y posteriormente se coloca un mililitro de solución en la zona de muestra y se toma la lectura. Se enjuaga con agua y se procede del mismo modo con la siguiente muestra. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado para cada muestra.

Preparación del mosto.

Al jugo obtenido de la moliendo se adiciona con sulfato de amonio y extracto de levadura como fuente de nitrógeno adicional hasta una concentración de 1g/L respectivamente. Se ajustó el contenido de sólidos solubles a 17°Brix.

No se adicionó SO₂ a ninguno de los ensayos de fermentación.

Preparación del Inóculo.

El inóculo se preparó por separado para cada una de las levaduras, se tomaron 50 ml de mosto y se ajustaron a 6°Brix, se inoculan con la levadura seleccionada (de acuerdo con la tabla 1) y se dejó en agitación (150rpm) durante 18 horas al cabo de las cuales se obtuvo un crecimiento de 10⁷ cfu/mL.

En el caso especial de *S. cerevisiae*, él inóculo se cultivó como antes y después se ajusto a 10, 12 y finalmente 17 °Brix para evitar problemas de la fermentación relacionados con el choque osmótico al que se somete a las levaduras.

Los ensayos de fermentación se llevaran a cabo por triplicado de acuerdo con la tabla 1 para cada una de las levaduras estudiadas de la siguiente manera:

Tabla 1. Ensayos de Fermentación controlada.

Levadura	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5
R. mucilaginososa	✓	×	×	✓	✓
S. cerevisiae	×	✓	×	×	✓
Z. bisporus	×	×	✓	✓	✓

Todos los ensayos se llevaran a cabo por triplicado, el tiempo de fermentación predeterminado será de 120hrs (en concordancia con la fermentación natural), se conceden dos

intervalos de agitación de 1min a las 36 y 72h de fermentación. La temperatura para todos los experimentos será de 28°C.

Se tomaron muestras de 2ml por triplicado en intervalos de 24h, tomando como inicio(t_0) de fermentación la muestras tomadas un momento antes de la inoculación y como final (t_5) de la misma la muestra tomadas después de cumplirse 120h. Se determinaron sólidos solubles y pH a cada una de ellas por los métodos antes mencionados.

Obtención del destilado de Agave:

Obtención del destilado de Agave:

Una vez concluida la fermentación se decantaron 500ml del jugo y se colocan en un aparato de destilación. La destilación se llevó a cabo en dos etapas: primero hasta obtener un volumen de 50mL lo que en teoría eleva la concentración de etanol hasta 20-30%, posteriormente se rectificó el destilado con ayuda de una columna Vigreux hasta obtener una concentración de alcohol de por lo menos 40%. Terminada la destilación se inyectó la muestra directamente en el cromatógrafo para determinar los congenéricos antes mencionados.

Determinación de congenéricos en los destilados comercial y de laboratorio por cromatografía de gases.

La determinación del etanol, acetato de etilo, acetaldehído y alcoholes amílico e isoamílico se llevó a cabo con una modificación de los protocolos propuesto por Kuhn et al (2003), Ortega et al (2001) y Wang (2003) et al.

Las muestras se centrifugaron a 13 000rpm durante 5 min. , y se inyectaron sin un tratamiento previo de extracción o concentración el interés del análisis se encontraba en la cuantificación de los congenéricos más importantes en cuanto a cantidad en el producto sin perturbar por lo que el análisis directo de la muestra, es más representativo (Manjarrez & Llama 1968) y evita la introducción de un segundo estándar interno para evaluar el porcentaje de recuperación de las extracciones que por cierto es muy bajo para algunos de los analitos mencionados (Ortega 2001).

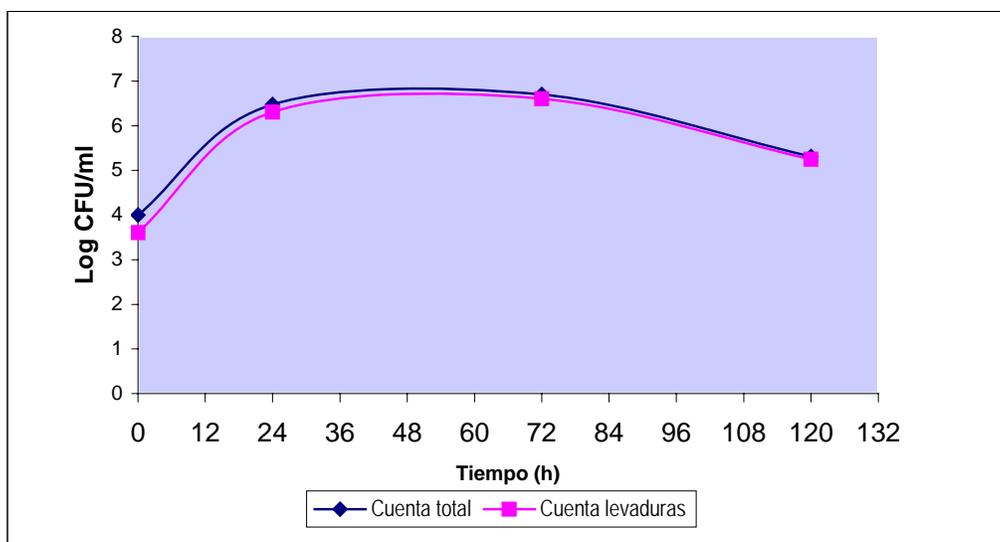
Se utilizó un cromatógrafo Agilent 6590 equipado con un detector de Ionización de llama (FID) 260 y una columna Innowax de la misma marca, el equipo se utilizo en modo splitless a una temperatura de inyector de 250°C con un volumen de inyección de 1ul, el programa de temperaturas fue el siguiente, una temperatura inicial de 40°C durante 5min y después un aumento de 5°C por minuto hasta alcanzar 200°C, el gas acarreador fue H₂ a un flujo de 3ml/min.

La identificación y cuantificación de los compuestos se llevó a cabo comparando los tiempos de retención para compuestos de referencia que fueron inyectados en la construcción de las curvas de calibración, la cuantificación de los mismos se llevó a cabo utilizando el procesador incluido en el programa Chemstation (Agilent) suministrado con el cromatógrafo.

RESULTADOS.

Conteo de mesófilos aerobios y levaduras durante la fermentación de mostos de *A. angustifolia haw* durante la elaboración del mezcal.

Los conteos de microorganismos se llevaron a cabo con el método de dispersión en placa, en los medios ACP para la cuenta total de mesófilos aerobios y PDA para levaduras, los resultados del conteo se muestra en la Grafica 1.



Grafica 1. Cuenta total de mesófilos aerobios vs. Cuenta total de Levaduras. La grafica muestra la dinámica de la población total de mesófilos aerobios (azul) y la de levaduras (rosa) a lo largo de la fermentación.

Aislamiento e Identificación de Levaduras de mostos de *A. angustifolia haw*.

Se identificaron en total 9 morfologías distintas en las diferentes muestras estudiadas desde el inicio (T_0) hasta el final de la fermentación, 8 de ellas fueron identificadas como levaduras y una como un moho.

Las levaduras fueron sometidas a identificación rápida mediante la prueba API 20CAUX, y después a una identificación molecular mediante la restricción del producto de PCR de la región comprendida por los dos ITS como se describió en los métodos. Los resultados de ambos método de identificación se muestran en la tabla 2 y en las figuras del anexo parte I.

Los porcentajes de identidad obtenidos en los ensayos API fueron en los casos correspondientes a las cepas de *S. cerevisiae* y *S. spp* que obtuvieron identificación con 99% de identidad y las de *R. mucilaginoso* que obtuvieron una identificación con un 99% de identidad.

En lo que respecta a las cepas identificadas por ITS como *Zygosaccharomyces* se dio una baja discriminación entre *K. krusei*, y *G. capitatum* con un porcentaje no mayor al 32% para cada

una de ellas. La identificación para *C. magnoliae* se obtuvo un 65% de identidad y la identificación para *C. colliculosa* un 86% de identidad.

Tabla 2. Especies aisladas en cada tiempo de la fermentación caracterizadas por prueba API y por RFLP, se muestra el tamaño de los fragmentos para cada cepa.

ESPECIES AISLADAS EN CADA TIEMPO DE LA FERMENTACIÓN IDENTIFICADAS	IDENTIFICACIÓN POR PERFILES DE RESTRICCIÓN ITS1-ITS4.			IDENTIFICACIÓN POR PRUEBA API.	
	Tamaño del producto PCR (pb)	Tamaño del fragmento de restricción (pb).			
		<i>Hae</i> III	<i>Cfo</i> I	<i>Hinf</i> I	
T₀					
<i>Candida intermedia</i>	450	410	225 + 190	230 + 200	<i>Candida magnoliae</i>
<i>Candida apicola</i>	750	720	340 + 300 + 110	390 + 190 + 160	<i>C. colliculosa</i>
<i>R. mucilaginosa</i>	650	430 + 220	320 + 250 + 100	340 + 220 + 80	<i>R. mucilaginosa</i>
<i>Z. bailli/bisporus</i>	800	780	320 + 300 + 100	(390) 355+230+160	<i>C. Krusei</i> <i>G. capitatum</i>
T₁					
<i>S. cerevisiae</i> ¹	880	310+230+150+120	380 + 360	360 + 150	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i> (<i>l</i>)	880	310+230+150+120	380 + 360	360 + 150	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. spp</i>	880	310+230+150+120	380 + 360 + 140	(750) (460) 360+150	<i>S.cerevisiae</i>
<i>Z. bisporus</i>	800	750	320 + 300 + 100	390+ 225+ 150	<i>C. krusei</i> <i>G. capitatum</i>
T₃					
<i>S. cerevisiae</i>	880	310+230+150+120	380 + 360	360 + 150	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. spp</i>	880	310+230+150+120	380 + 360 + 140	(750) (460) 360+150	<i>S.cerevisiae</i>
<i>Z. bisporus</i>	800	750	320 + 300 + 100	390+ 180+ 150	<i>C. Krusei</i>
T₅					
<i>S. cerevisiae</i>	880	310+230+150+120	380 + 360	360 + 150	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. spp.</i>	880	310+230+150+120	380 + 360 + 140	(750) (460) 360+150	<i>S.cerevisiae</i>

¹ Las repeticiones de *S. cerevisiae* corresponden a cepas diferentes aisladas sobre la base de diferencia en la morfología colonial que fueron identificadas como ya se mencionó.

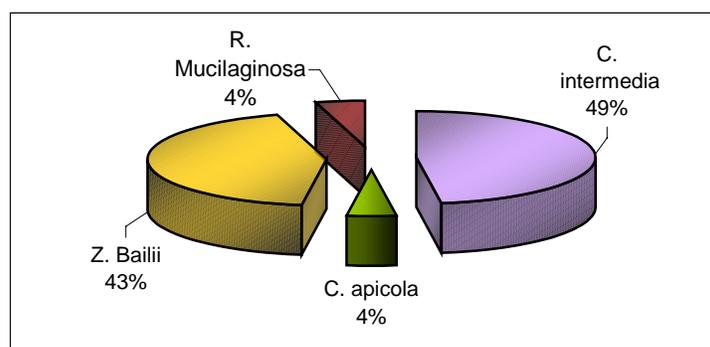
Aquellas cepas que no pudieron ser satisfactoriamente identificadas a través de los respectivos perfiles de restricción i.e. *Z. Bailii*, *Z. Bisporus*, *S. spp* y las cepas de *S. cerevisiae*, se sometieron al tercer criterio de identificación que consistió en la secuenciación de la región comprendida por los dominios D1/D2 del gen rRNA 26S y su posterior comparación utilizando la herramienta BLAST. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Identificación por comparación de secuencias de la región comprendida por los dominios D1/D2 del gen rRNA 26S. La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* previamente identificada como *S. spp* se denomina *S. cerevisiae* (II) y las de *Zygosaccharomyces* como *Z. bailii*.

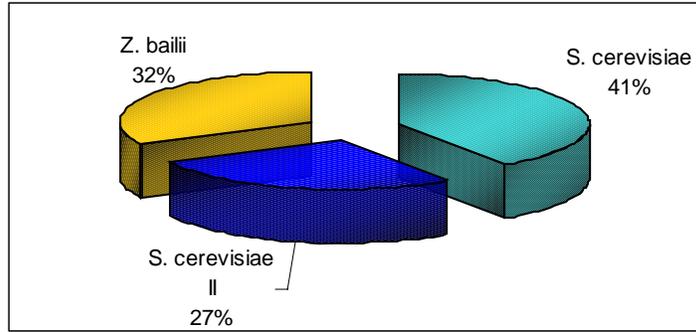
Cepa caracterizad por RFLP-ITS		Caracterización por secuenciación rDNA 26S
	T ₀	
Z. bailii / bisporus		Z. bailii 98% identidad
	T ₁	
S. cerevisiae ^(I)		S. cerevisiae 100% identidad
Saccharomyces spp.		S. cerevisiae 98% identidad (II)
Zygosaccharomyces bailii /bisporus		Z. bailii 98% identidad
	T ₃	
Z. bailii / bisporus		Z. bailii 99% de identidad

Análisis de las poblaciones de levaduras durante la fermentación de mostos de *A. angustifolia* haw.

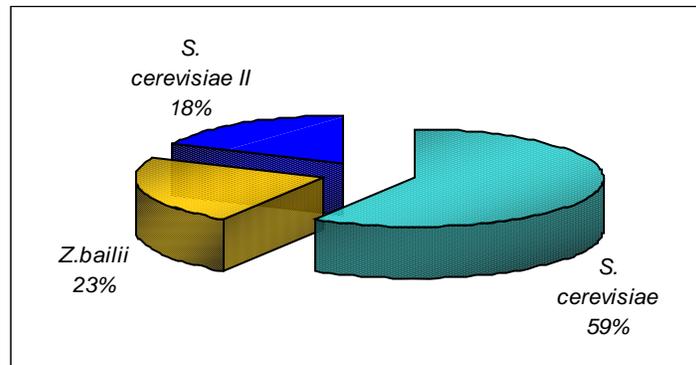
Con los resultados de la identificación y el conteo se calcularon las incidencias de cada especie en relación con el total de colonias contadas, los promedios de los datos para cada tiempo se muestran en las gráficas 2 a 5. Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con el mismo perfil de restricción se consideran como una misma y la que difiere se denota como *S. cerevisiae* (III).



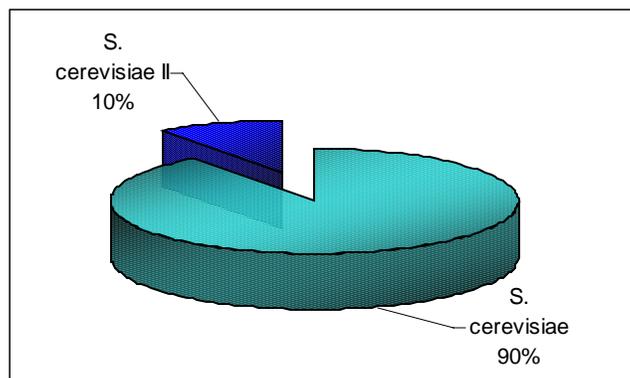
Grafica 2. Incidencia de las especies de levadura aisladas en la muestra T₀ (0hrs) de la fermentación espontánea expresada como porcentaje del total.



Grafica 3. Incidencia de las especies de levadura aisladas en la muestra T_1 (24h) de la fermentación espontánea expresada como porcentaje del total.



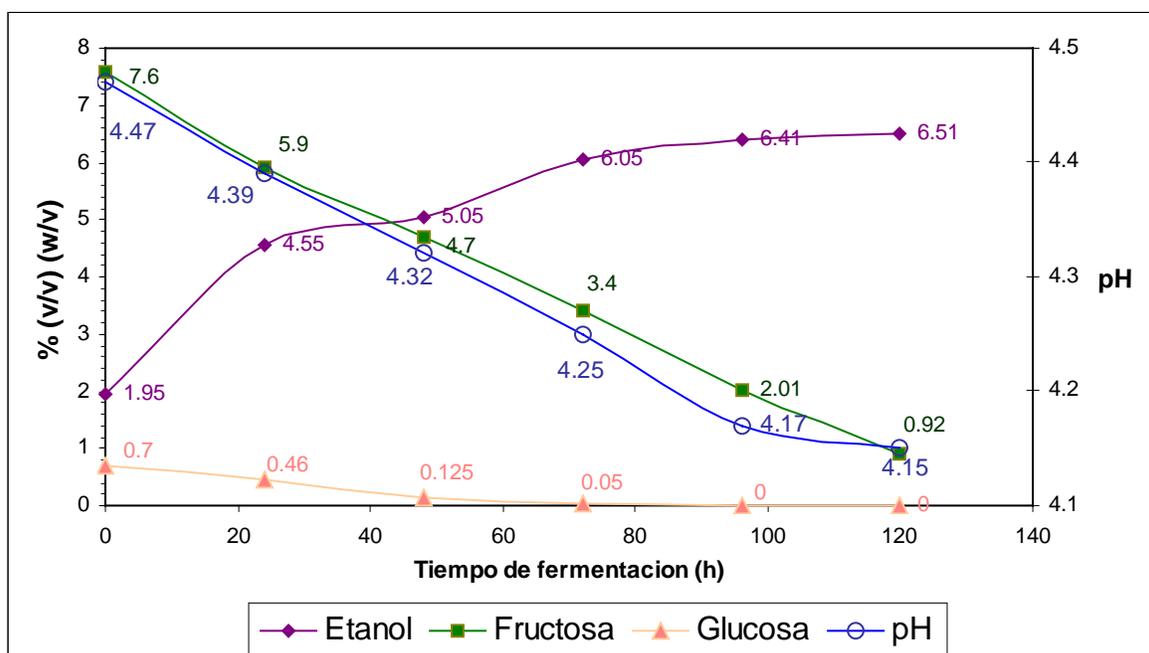
Gráfica 4. Incidencia de las especies de levadura aisladas en la muestra T_3 (72h) de la fermentación espontánea expresada como porcentaje del total.



Gráfica 5. Incidencia de las especies de levadura aisladas en la muestra T_5 (120h) de la fermentación espontánea expresada como porcentaje del total.

Análisis químico de la fermentación espontánea de mostos de *A. angustifolia* haw durante la elaboración de mezcal.

Se determinaron los parámetros de la fermentación como se describe en la sección de métodos con el fin de relacionar estos datos con los de la dinámica de poblaciones. Los datos se muestran en la grafica 6.

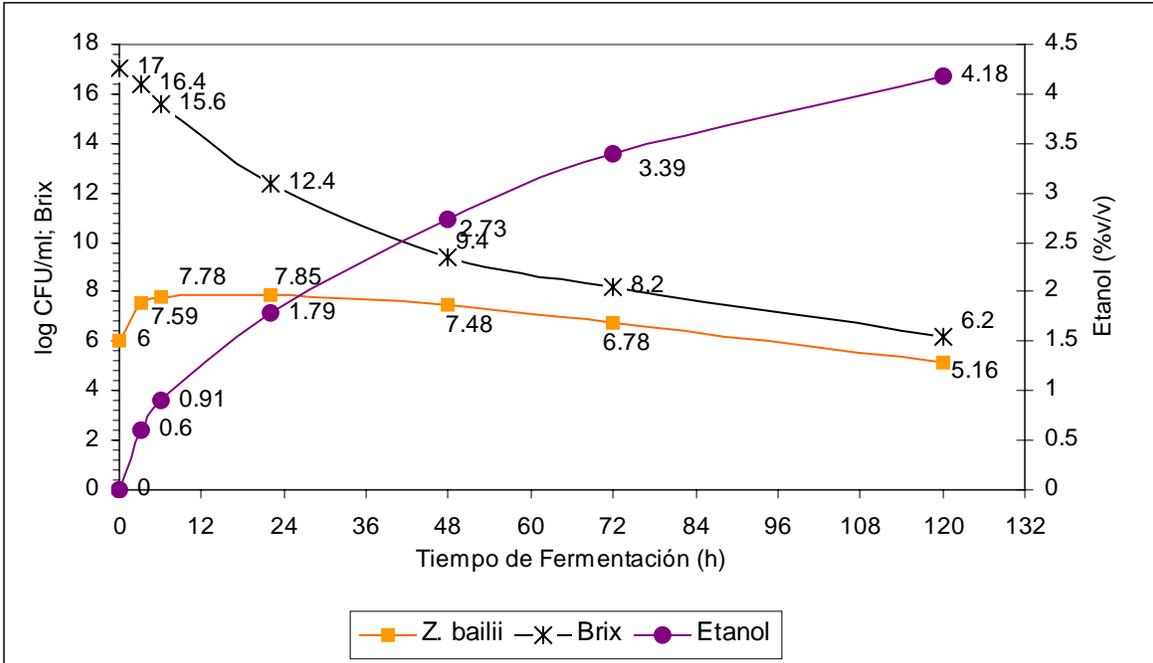


Grafica 6. Determinación del contenido de azúcares reductores, etanol y pH a través de la fermentación espontánea de mostos de *A. angustifolia* haw.

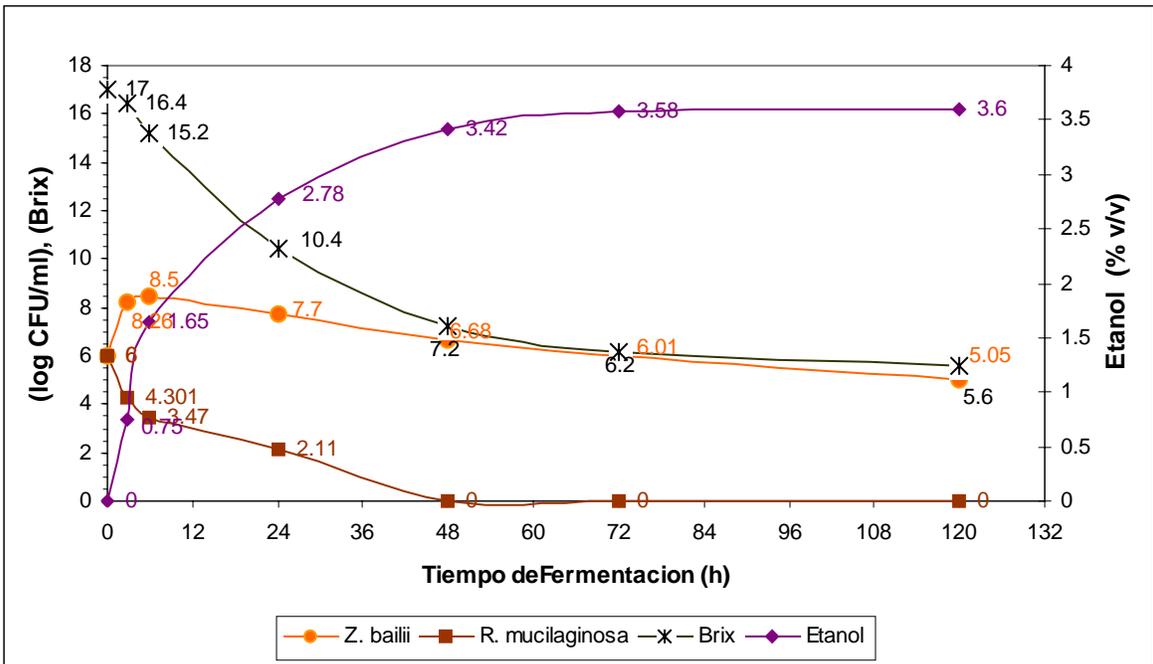
Ensayos de Fermentaciones Inoculadas para determinar el aporte de las levaduras aisladas al destilado.

El desarrollo de los ensayos de fermentación en el laboratorio se llevó a cabo midiendo los cambios en los sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix), el crecimiento del inoculo y la concentración de etanol, los resultados que se muestran son los promedios obtenidos de las tres repeticiones realizadas con cada especie.

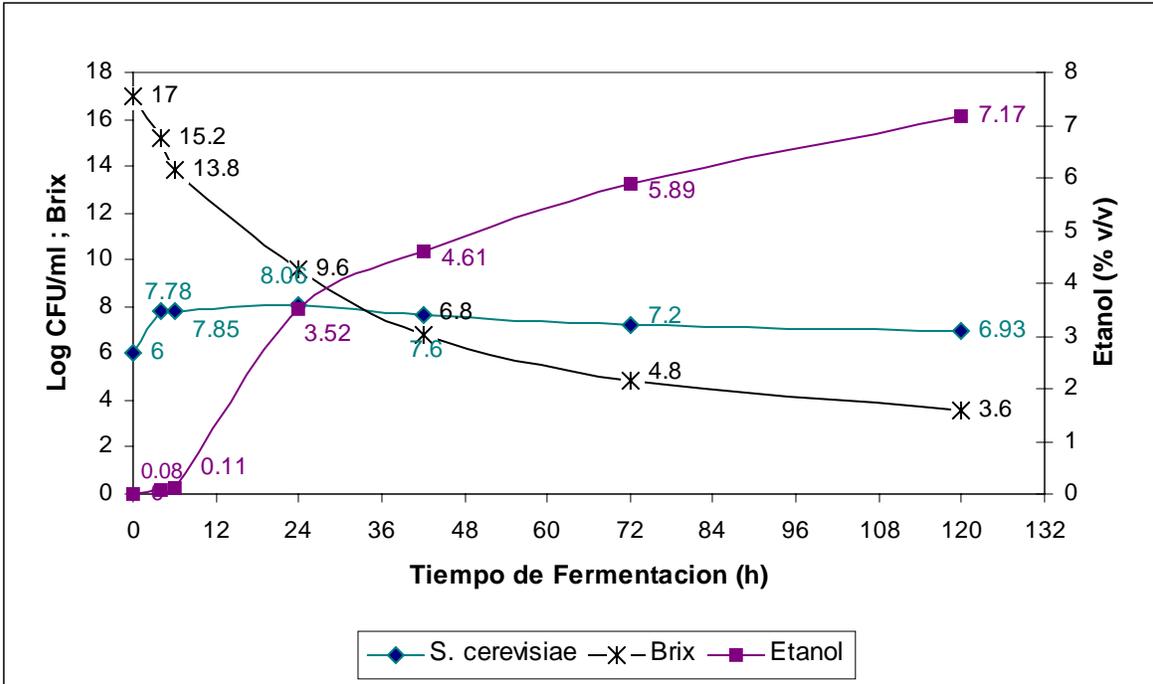
En las graficas correspondientes se muestran los resultados obtenidos en todos los experimentos excepto los de las fermentaciones efectuadas con el inoculo puro de *R. mucilaginosa* en las cuales no se observó crecimiento, cambios en la concentración de sólidos solubles o desprendimiento de CO_2 , por lo que no se consideró necesario elaborar una grafica.



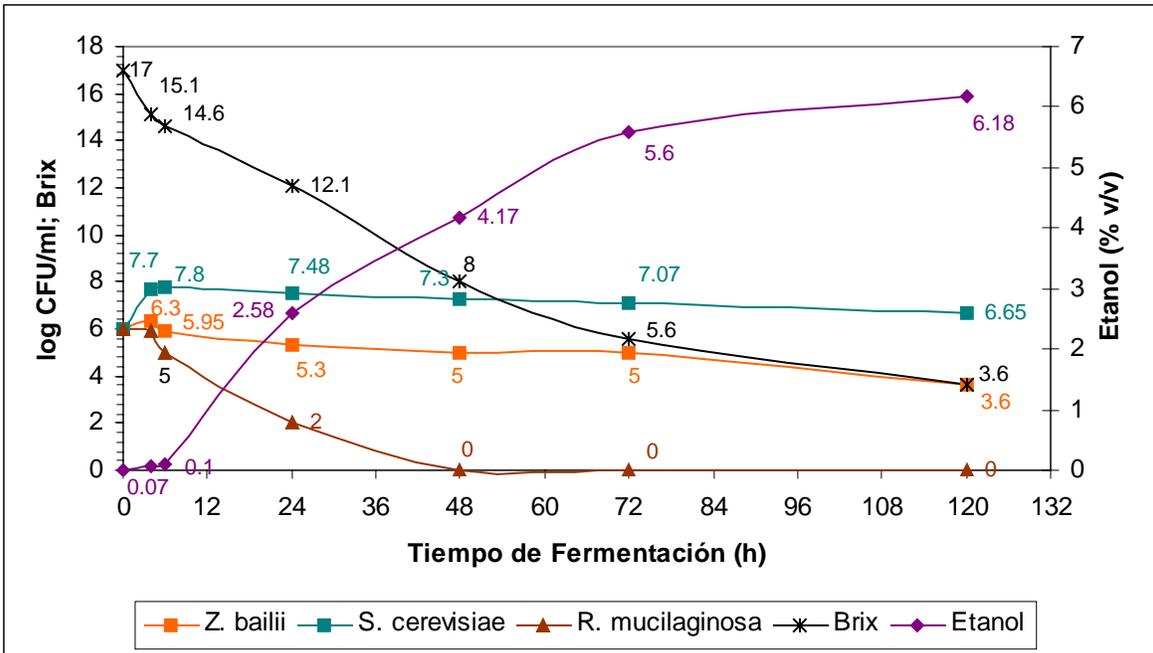
Grafica 7. Dinámica de la fermentación controlada de mostos de *A. angustifolia haw* con inóculo puro de *Z. bailii*



Grafica 8. Dinámica de la fermentación controlada de mostos de *A. angustifolia haw* utilizando un inóculo mixto de *Z. bailii*/*R. mucilaginosa*.



Grafica 9. . Dinámica de la fermentación controlada de mostos de *A. angustifolia* haw utilizando un inoculo puro de *S. cerevisiae*.

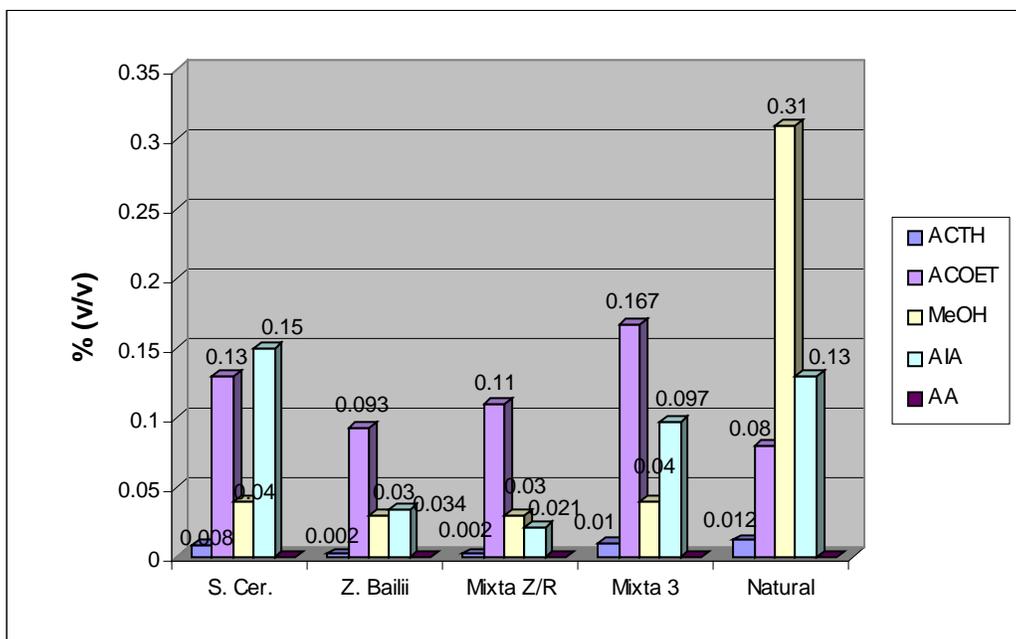


Grafica 10. Dinámica de la fermentación controlada de mostos de *A. angustifolia* haw utilizando un inoculo mixto de *Z. bailii*/ *R. mucilaginosa* / *S. cerevisiae*.

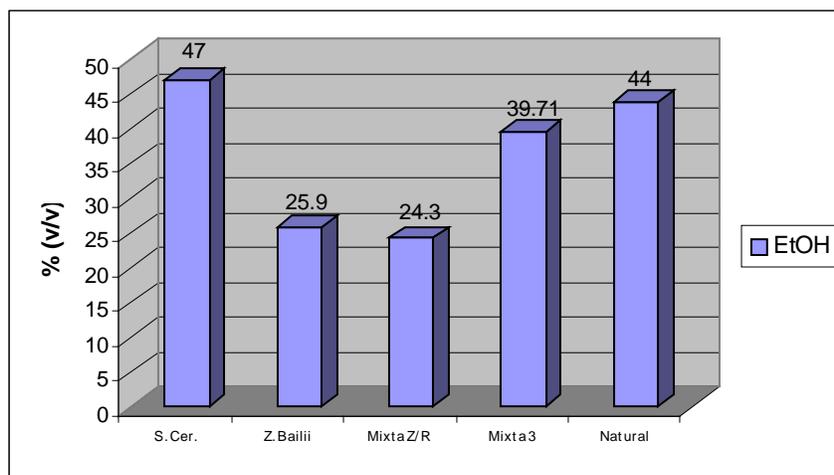
Perfil de congénicos de los destilados.

Se analizaron por cromatografía de gases los destilados obtenidos en los ensayos de fermentación realizados en el laboratorio así como el producto terminado de la fermentación original en sola de vega, para obtener los perfiles de cada destilado en relación con los compuestos congénicos antes mencionados.

Los resultados se muestran en las gráficas siguientes.



Grafica 11. Perfiles de congénicos de los destilados obtenidos de los ensayos de fermentación y de la fermentación espontánea (aquí denominada Natural). Las siglas corresponden a los siguientes compuestos ACTH – Acetaldehído, ACOET- Acetato de Etilo, MeOH- Metanol, AIA-Alcohol isoamilico, AA-alcohol amílico.



Grafica 12. Contenido de alcohol en los destilados obtenidos en el laboratorio y en la fermentación espontánea.

Comparación entre los parámetros de rendimiento y productividad de las fermentaciones de laboratorio y natural.

Tabla 4. Rendimiento y productividad de los ensayos de fermentación de laboratorio y de la fermentación natural.

PARÁMETRO CALCULADO	FERMENTACIÓN.				
	Espontánea	<i>Z. bailii</i>	<i>Z. bailii</i> / <i>R. mucilaginosa</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i> / <i>R. mucilaginosa</i> / <i>Z. bailii</i>
Productividad (P) g Etanol, L ⁻¹ h ⁻¹	0.39	0.28	0.24	0.48	0.42
Rendimiento (Y x/s) Crecimiento –sustrato Ufc / g Azucares	1.4x10 ⁶	1x10 ⁷	2.4x10 ⁹	9.6x10 ⁷	1x10 ⁸
Rendimiento (Y p/s) Producto-sustrato g etanol/ g azucares	0.54	0.45	0.36	0.62	0.54

Tabla 5. Contenido de congenéricos en el destilado de la fermentación natural y en los destilados de

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Z. bailii</i>	<i>Z. bailii</i> / <i>R. mucilaginosa</i>	Mixta 3	Espontánea
Etanol	47	25.9	24.3	39.71	44
Acetato de etilo	0.13	0.093	0.11	0.167	0.08
Acetaldehído	0.008	0.002	0.002	0.01	0.012
Alcohol amílico	0	0	0	0	0
Alcohol isoamilico	0.15	0.034	0.021	0.097	0.13
Metanol	0.04	0.03	0.021	0.04	0.31

laboratorio.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Conteo, aislamiento y caracterización.

Los resultados obtenidos del conteo de mesófilos aerobios y de levaduras a lo largo de todo el proceso de fermentación de mostos de *A. angustifolia* haw (Grafica 1) ofrecen una visión semicuantitativa de la proporción entre las poblaciones de estos microorganismos en cada etapa de la misma. El hecho de que los valores de la cuenta de mesófilos totales y la de levaduras sean tan cercanos entre sí sugieren que al menos en número las levaduras pudieran colocarse como la población más importante del proceso de fermentación desde las etapas tempranas de la misma, lo cual coincide con las afirmaciones de diversos autores en el sentido de que las levaduras constituyen la población dominante de microorganismos en las fermentaciones alcohólicas debido a que se encuentran mejor adaptadas a las condiciones fisicoquímicas del medio (Beltrán et al 2002, Egli et al 1998, Fleet (a) 1990, Fleet 1999), sin embargo se requiere investigación adicional al respecto para confirmar esta teoría.

Los datos obtenidos de unidades formadoras de colonia de levadura por mililitro son más bajos que los que reportados por Cedeño (1999) o Wang et al (2003) para fermentaciones de mosto de *Agave Tequilana* o mostos de uva, lo que puede atribuirse a que en la elaboración de mezcal no se utilizan inóculos comerciales o especialmente preparados, con esto en mente los datos coinciden con lo reportado por Egli et al (1998) para mostos no inoculados en fermentaciones vínicas.

La posible dominancia de las poblaciones de levaduras sobre las de bacterias podría explicarse sobre la base del proceso de elaboración del mezcal y de las características de la materia prima y el mosto que seleccionan a las levaduras de manera natural (Mills et al 2002). En principio los instrumentos de molienda y las tinajas de fermentación no se limpian a conciencia entre lotes de producción lo que deja remanentes de azúcares cuasi cristalizados en donde se mantienen poblaciones de levaduras y algunos hongos en condiciones osmóticas adversas para el crecimiento de bacterias de modo que se cuenta con un inóculo inicial preferentemente de levaduras. Por otro lado el pH (aprox. 4.5) y el contenido de azúcares en el agave cocido reportado en *Agave Tequilana* superior al 13% (Cedeño 1995), seleccionan a las levaduras de manera natural.

Aislamiento e Identificación por API 20 C AUX

Es importante mencionar que el método que se siguió para el aislamiento es de acuerdo con Beltrán et al (2002) aleatorio y semicuantitativo, principalmente solo se seleccionan 10 colonias de cada morfología para obtener cultivos puros, y solo tres de esos 10 cultivos puros son sometidos a identificación de modo que esto debe tomarse en cuenta cuando se discuten los resultados de dominancia poblacional pero sobre todo de diversidad.

Por otro lado el medio selectivo de lisina utilizado para el crecimiento de las especies No *Saccharomyces* resultó de poca utilidad pues algunos ensayos realizados con cajas inoculadas con *S. cerevisiae* mostraron crecimiento lo que llevo a interpretaciones incorrectas hasta que se realizó la identificación molecular, estos resultados pueden deberse según Moore & Johnson (1998) a que

las levaduras de fermentaciones naturales en donde no se utilizan inóculos pueden poseer un genotipo silvestre (wild type) y con ello la capacidad de utilizar lisina o nitrato como única fuente de nitrógeno.

La identificación con la prueba API 20CAUX se realizó con dos objetivos en mente, el primero obtener una identificación rápida de las levaduras aisladas y posteriormente comparar los resultados de la identificación con los obtenidos por RFLP-ITS para comprobar la utilidad de la prueba comercial en la identificación de levaduras de mostos de mezcal.

No existen referencias en el uso de esta prueba de identificación en levaduras aisladas de mostos de Agave, sin embargo con la excepción de las cepas de *S. cerevisiae* y *R mucilaginoso* que fueron identificadas correctamente con un muy buen porcentaje de identidad y repetibilidad todas las demás identificaciones resultaron con valores de identidad inferiores al 90% y no siempre arrojaron resultados reproducibles, estos resultados coinciden con lo establecido por Deak & Beuchat [(c) 1993], y Esteve-Zarzoso et al (1998) en el sentido de que el uso kits comerciales se encuentra restringido a la identificación en clínica y que los resultados pueden ser poco reproducibles (Orberá et al 2004) y poco exactos (Arias et al 2002).

Identificación por RFLP-ITS y secuenciación del gen rDNA 26S

Se utilizaron los cebadores ITS1 e ITS4 para amplificar la región del rDNA que incluye el gen del rDNA 5.8S y los dos espaciadores internos transcritos, los productos de PCR muestran gran variación entre especies desde los 450pb para *C. intermedia* hasta los 880pb para *S. cerevisiae*, los productos de PCR para las diferentes cepas aisladas de *S. cerevisiae* son del mismo tamaño en todos los casos.

- Aislados identificados como pertenecientes al género *Candida*.

El genero *Candida* es muy extenso pues incluye a las levaduras que no pueden ser clasificadas en otros géneros cuando se reproducen asexualmente. Generalmente se considera como un genero complicado en el que no existen métodos estándar de identificación de sus miembros con excepción de aquellas levaduras de relevancia clínica (Esteve-Zarzoso et al (d) 2000).

En la fermentación de mostos de *A. angustifolia* encontramos dos especies de *Candida*, *C. apícola* y *C. intermedia*, con perfiles de restricción únicos y fácilmente identificables especialmente en el caso de *C. apícola*. Esta especie ha sido aislada de una variedad de substratos de entre los que destacan los relacionados con las abejas como son colmenas, frutas y las abejas mismas (Hajsig & Meyer 1978), no es extraño encontrar a esta especie en el mosto en las etapas iniciales de la fermentación si se recuerda que estas son totalmente abiertas y no existe control sobre los insectos que son atraídos por el azúcar hacia los corazones de agave cocidos, el equipo de molienda y los recipientes de fermentación de modo que pueden actuar como vectores, lo cual coincide con reportes de fermentaciones vínicas (Mortimer 1999) y de Tequila (Lachance (a) 1995).

El perfil de restricción de *C. intermedia* muestra en los carriles correspondientes a las enzimas *Hae* III y *Hinf* I (Anexo Fig. 13) la banda de 450pb que corresponde al producto de PCR (señalada con una flecha), la aparición de esta se debe a una digestión incompleta del producto de PCR, esta digestión incompleta se observó con otras levaduras (Fig. 28 y 33) con la enzima *Hinf* I y puede deberse a que en estas reacciones en particular la concentración del producto de PCR muy

elevada para ser digerida en el tiempo establecido (pues se han encontrado reportes con tiempos de digestión de hasta 10h –Fernández et al 2000-) y se requería de un tiempo de incubación mayor. También existe la posibilidad aunque muy remota de que un remanente de alcohol etílico proveniente de la extracción de DNA inhibiera a las enzimas ya que son muy sensibles incluso a concentraciones muy bajas de este compuesto.

La presencia de *Candida intermedia* en el mosto de *Agave* coincide con los reportes de aislamiento en otros alimentos las uvas (Salo & Wirtanen 2005), melazas de caña de azúcar (Aragão et al 1998), Agave cocido (Lachance (a) 1995) y tepache (Moreno-Terrazas et al 2001).

- Aislados identificados como *R. mucilaginosa*.

Rhodotorula mucilaginosa es una levadura no fermentativa que se ha aislado de hojas de plantas (Fell 1997) jugos de frutas (Arias et al 2002), y en raíces de *Agave tequilana* y suelos donde este se cultiva (Lachance 1995), sin embargo llama la atención su presencia en un sustrato como las fibras de *Agave angustifolia haw* en donde la concentración sólidos solubles es de por lo menos 20°Brix puesto que no se encontraron reportes de osmotolerancia en *R. mucilaginosa*.

El perfil de restricción de la Fig. 15 del anexo para *R. mucilaginosa* esta de acuerdo con lo reportado en el trabajo de Esteve-Zarzoso et al [(c)1999], sin embargo no concuerda con el perfil propuesto por Guillamon et al (1998) en el que la banda 100pb no existe; . Esta discordancia tiene al menos dos explicaciones posibles, la primera que las cepas de *R. mucilaginosa* analizadas sean distintas y la analizada por Guillamon tenga un sitio extra de restricción que reduzca el fragmento de 100pb a dos fragmentos más pequeños que no sean tomados en cuenta, la segunda es que las condiciones de visualización de los fragmentos no permitan en el caso del trabajo de Guillamon et al (1998) observar el fragmento de 100pb que aparece en el trabajo de Ezteve –Zarzoso et al (ídem) y en el presente, con una menor intensidad que las dos bandas mayores.

- Aislados identificados como pertenecientes al género *Zygosaccharomyces*.

Con respecto al aislado identificado como perteneciente al genero *Zygosaccharomyces* es importante mencionar que con base en el perfil mostrado en la Fig. 19 del anexo, correspondiente al T₀ no fue posible hacer la identificación hasta el nivel de especies debido a la presencia de una banda de entre 380 y 390pb que aparece en el carril correspondiente a la enzima *Hinf* I, si esta banda no se toma en cuenta el perfil resultante coincide con el de *Z. baillii*, sin embargo si se descarta la banda de 360pb en el mismo gel, entonces el perfil coincide con el de *Z. bisporus*. Por otro lado los aislados de los tiempos T₁ y T₃ poseen perfiles que coinciden casi por completo con los reportados para *Z. bisporus* sin embargo es posible que se requiera de una cuarta enzima de restricción como *Alu* I o *Dde* I (siguiendo la metodología de Esteve-Zarzoso et al [(c)1999] para hacer una identificación mas clara, pues al menos entre estas dos especies las diferencias en los perfiles de restricción son pequeñas, en ocasiones de solo 10pb entre uno y otro cuando se utilizan las enzimas *Hae* III y *Cfo* I, y aunque con la enzima *Hinf* I los perfiles reportados son distintos, el fragmento que los diferencia es menor a 80pb por lo que es difícil visualizarlo, estas razones hicieron evidente utilizar el tercer criterio de identificación propuesto en la sección de métodos.

Con ello en mente se realizó la amplificación de los dominios de expansión D1/D2 del gen del rDNA 26S para estas cepas y se obtuvo en todos los casos un porcentaje de identidad superior al 97% para *Z. baillii*, con este resultado es posible pensar en que las diferencias observadas en los perfiles de restricción para la enzima *Hinf* I sean provocadas por una cepa de *Z. baillii* que sea polimórfica para esta enzima en especial, la existencia mas de un perfil de restricción para cepas de

la misma especie ha sido reportado para levaduras de este mismo genero (Esteve-Zarzoso et al (c) 1999) y para *Pichia fermentans* (Arias et al 2002).

La presencia de levaduras pertenecientes al género *Zygosaccharomyces* en fermentaciones se encuentra ampliamente documentada en fermentaciones vínicas (Moore & Johnson 1998, Romano & Rosella (b) 1998, Esteve-Zarzoso et al (c) 1999, Esteve-Zarzoso et al (e) 2001) aunque también han sido encontradas en mostos de *Agave tequilana weber* (Lachance (a) 1995).

- Aislados identificados como miembros del género *Saccharomyces*.

Con respecto a los aislados de *S. cerevisiae* es importante mencionar que las distintas cepas aisladas durante el tiempo T₁ fueron seleccionadas por diferencias en la morfología colonial, y no se observaron en los tiempos subsecuentes T₃ y T₅. Los perfiles de restricción para todas ellas fueron idénticos y todo ellos concordaron con lo reportado por Esteve-Zarzoso et al [(c) 1999] para esta especie. La presencia de varias cepas de *S. cerevisiae* ya ha sido ampliamente reportada en vinos (De Barros et al 1996, Fernández-Espinar et al 2000) y mostos de cerveza (Jespersen et al 2000).

Aunque todos los perfiles de restricción fueron fácilmente identificables uno de los aislados se sometió a secuenciación con el fin de contar con un doble criterio de identificación molecular para la levadura que predomina durante la fermentación y el resultado de la comparación de secuencias mostró un 100% identidad con *S. cerevisiae*.

Por ultimo los perfiles de restricción de *Saccharomyces spp.* (Fig. 23, 28 y 33 del anexo) ofrecieron un problema similar a lo acontecido con la cepa de *Z. baillii* del tiempo T₀. Los perfiles mencionados muestran en las enzimas *Hae* III y *Cfo* I, fragmentos que coinciden con lo reportado por Esteve-Zarzoso et al [(c) 1999] para *S. cerevisiae*, sin embargo este aislado resultó ser polimórfico para la enzima *Hinf* I en donde se observan dos fragmentos de 780 y 490pb respectivamente por lo que no fue posible asignar la especie con exactitud y se decidió someter a estas cepas a la identificación por comparación de secuencias del gen rDNA 26S.

La identificación por comparación de secuencias arrojó un porcentaje de identidad del 98% con *S. cerevisiae* por lo que puede considerarse a este aislado como una cepa polimórfica para *Hinf* I de *S. cerevisiae* de las cuales también existen diferentes reportes en la literatura (Jespersen et al 2000, Esteve-Zarzoso et al (e) 2001, Van der Aä et al 2001, Romano et al (c) 2003, Baleiras Couto et al 1996 etc), con ello en mente se denominó a la cepa de *S. spp* como *S. cerevisiae* (II).

En síntesis la aplicación del RFLP permitió una identificación rápida y relativamente sencilla de todas las levaduras aisladas de mostos de mezcal hasta el nivel de género. La asignación en el nivel de especies también fue muy aceptable con solo una identificación incorrecta en el caso de *Z. bisporus* por *Z. baillii* sin embargo hay que recordar que estas especies están muy relacionadas y la dificultad en la identificación tiene que ver más con la dificultad de asignar los pesos moleculares correctos a los fragmentos que con la resolución de la técnica. Por otro lado el RFLP-ITS demostró ser útil en la diferenciación de cepas de *S. cerevisiae* y en los casos en los que los patrones de restricción fueron los mismos para cepas morfológicamente distintas puede mejorarse la resolución con el uso de una enzima extra.

Estos resultados coinciden con diferentes trabajos realizados en mostos de vino que señalan al RFLP-ITS como una técnica confiable para identificar levaduras e identificar cepas diferentes

(Arias et al 2002, Baleiras Couto et al 1996, Guillamon et al 1998, Esteve-Zarzoso et al (c) 1999 y (d) 2000, Espinosa et al 2002).

Análisis de las poblaciones de levaduras durante la fermentación.

Los datos obtenidos del conteo de las levaduras en los medios PDA y WL ofrecen una visión semicuantitativa de la dinámica de poblaciones en la fermentación.

En términos de diversidad el tiempo T_0 (gráfica 2) es donde se observa la mayor diversidad de especies de toda la fermentación, la población dominante en este caso está constituida por las levaduras *C. intermedia* y *Z. bailii*, seguida por pequeñas poblaciones de *C. apícola* y *R. mucilaginosa*, la dominancia de especies no *Saccharomyces* coincide con los reportes para fermentaciones vínicas en donde es ampliamente aceptado que las etapas tempranas de la fermentación son dominadas por levaduras de poder fermentativo bajo y medio Fleet [(d) 1993], Pretorius et al (2000).

En cuanto a la dominancia particular de las especies *C. intermedia* y *Z. bailii* en esta etapa de la fermentación puede deberse a la capacidad de estas levaduras para adaptarse al ambiente sólido con baja actividad de agua, una elevada concentración de azúcares y una baja concentración de alcohol.

El hecho de que ningún aislado de *S. cerevisiae* fuera recuperado en esta muestra, no quiere decir que esta levadura no este presente sino que bajo estas condiciones es ampliamente superada en numero por las demás levaduras y aun cuando pudiera crecer en la caja de conteo en detectables (10^2) el método utilizado de selección aleatoria puede haberla dejado fuera del análisis, por otro lado dada la complejidad del sustrato la formación de microambientes es muy probable y es posible que las cepas de *Saccharomyces* se desarrollen en un estrato distinto de la tina, preferentemente cerca de las paredes o el fondo de esta que es donde se piensa se mantiene el inóculo natural de esta especie.

Veinticuatro horas después de la adición de agua es decir en el tiempo T_1 , las levaduras de inicio han desaparecido con excepción de *Z. bailii*. Estos cambios en la diversidad se relacionan con los cambios fisicoquímicos en el medio ambiente como el cambio de una matriz sólida a líquida, la disminución del pH y de la concentración de azúcares reductores, y la elevación de la concentración de etanol, que seleccionan a *S. cerevisiae* y a *Z. bailii*.

En este mismo tiempo fueron aisladas también las diferentes cepas de *S. cerevisiae*, que se constituyen como la población dominante sobre *Z. bailii*.

Cuando la fermentación alcanza las 72h es decir en el tiempo T_3 la diversidad es prácticamente la misma que la del tiempo T_1 aunque se observa una tendencia negativa en el crecimiento de *Z. bailii* y la cepa de *S. cerevisiae* (II). La dominancia de cepas distintas de *S. cerevisiae* en diferentes tiempos de la fermentación ha sido reportada para fermentaciones de mosto de uva (Fleet (b) 1997, Torija et al 2001, Baleiras Couto et al 1996) y se sabe que existen aportes diferentes a las características organolépticas del vino de acuerdo con la cepa dominante, la dominancia de una cepa sobre otra se debe a la mejor adaptación de la misma y en ocasiones a la susceptibilidad de una cepa en particular hacia la actividad de proteínas tóxicas denominadas factor killer (Querol et al 1999, Versavaud et al 1995).

Es posible explicar la declinación de las poblaciones de *Z. bailii* sobre la base de la concentración de alcohol del mosto en este tiempo que se acerca a la media de los valores máximos de tolerancia reportados para este género.

En el final de la fermentación T₅ la población esta constituida únicamente por cepas *S. cerevisiae*, la población de la cepa *S. cerevisiae* (II) ha disminuido pero no llega a desaparecer. Es posible que las levaduras no *Saccharomyces* perduren a lo largo de la fermentación en poblaciones pequeñas que no sean fácilmente recuperables de entre una mayoría de *S. cerevisiae*, incluso existen reportes de un estado similar al viable no cultivable de bacterias observado en *Candida* (Mills et al 2002).

Los datos de la dinámica de poblaciones sugieren una dominancia de *S. cerevisiae* en el proceso fermentativo.

Análisis Químico de la Fermentación Espontánea.

La gráfica 6 muestra que el principal azúcar de la fermentación es la fructosa en concordancia con lo reportado por Cedeño (1995) para mostos de *Agave tequilana*, la fructosa proviene en su mayoría de la hidrólisis de los polímeros de inulina presentes en el Agave. Los contenidos de azúcares reductores en general son más bajos que los reportados para los mostos antes mencionados sin embargo debe tomarse en consideración que en las muestras recolectadas la fermentación en sólido llevaba cuando menos 24 horas de haber iniciado y que en la fabricación de mezcal la concentración de azúcares no se ajusta como ocurre en mostos de tequila. Es importante mencionar que los azúcares remanentes al final de la fermentación coinciden con los datos reportados por Arrizon (2002) y Cedeño (1995) para tequila.

En lo que toca a los valores de pH, estos coinciden con los reportados para fermentaciones de Tequila (Cedeño 1999) en condiciones similares y para otras fermentaciones alcohólicas (Collado 2001, Romano & Rosella (b) 1998) la disminución del pH se debe principalmente a la aparición de ácido acético producto del metabolismo de bacterias y en menor medida del de levaduras (Cedeño ídem), y también a la presencia de ácido láctico que se ha detectado ácido láctico en el mosto (Luis Ramos: comunicación personal) proveniente del metabolismo de bacterias lácticas.

La concentración final de etanol en el mosto (aprox. 60g/L) de la fermentación natural se encuentra dentro del intervalo de 50-80g/L reportado para tequila (Arrizon et al 2002, Cedeño 1995, Pinal et al 1997) el hecho de que la fermentación es abierta y esto ocasiona pérdidas por evaporación, espontánea puede disminuir el rendimiento de etanol, aun se desconocen la magnitud de las pérdidas.

Ensayos de Fermentaciones inoculadas.

Los ensayos de fermentación controlada se llevaron a cabo con el objetivo principal de observar el aporte de las levaduras en el destilado en términos de la producción de etanol, acetaldehído, alcohol amílico, alcohol isoamílico y acetato de etilo. A continuación se discuten los resultados mostrados en las Gráficas 7,8,9 y 10.

- Sólidos solubles

El contenido total final de sólidos solubles en todas las fermentaciones (3-5°Brix) es superior a los 2°Brix que se reportan en promedio para fermentaciones de tequila (Cedeño 1995) y que se

determinaron en la fermentación natural. Sin embargo, es importante mencionar que en promedio los azúcares reductores constituyen un 70% del total de sólidos solubles finales², de manera que aun cuando el remanente verdadero de azúcares esta por encima de lo reportado como ideal, los valores no son tan elevados y comparados con datos provenientes de fermentaciones vínicas –6-8°Brix (Egli 1998, Zhore 2002), son aceptables.

Existen diversas explicaciones para remanentes altos de azúcares, algunas sugieren contaminación bacteriana o presencia de ácidos orgánicos que afectan al metabolismo de las levaduras (Lafon-Lafourcad 1984), sin embargo en estos casos en particular es probable que el consumo incompleto de azúcares se deba a que el elevado contenido de sólidos solubles al inicio de la fermentación disminuye la eficiencia de la misma a través de un estrés osmótico que a su vez aumenta el tiempo necesario para que las levaduras se adapten al medio y con ello el tiempo de fermentación también se alarga, por otra parte hay reportes de que la eficiencia de la fermentación se ve afectada también por el estrés osmótico a través de una disminución en el transporte de azúcares (Glucosa y Fructosa) hacia la célula (Biosca et al 2002, Bisson et al 1987).

De acuerdo con Arrizon et al (2002) y Bisson et al (1987) existe también la posibilidad de que la cantidad de nitrógeno suplementada no sea la óptima para estas cepas de levaduras ya que las necesidades de nitrógeno pueden variar de acuerdo con la especie y con la cepa y afectar directamente al consumo de azúcares y a la fermentación, esto puede ser particularmente cierto para las levaduras no *Saccharomyces*, pues fue en los ensayos con estas especies en donde se observa la mayor concentración de sólidos al final de la fermentación.

Con respecto al consumo de azúcares por *Z. bailii* (Gráfica 7) no se encontraron reportes de ensayos de fermentación en mostos de uva o de Agave para esta especie con los cuales realizar comparaciones, los valores del remanente de sólidos para la fermentación con inóculo puro de esta especie son los mas altos de todos los obtenidos, sin embargo comparado con otras especies como *Candida milleri* que poseen un poder fermentativo similar (Zhore & Erten 2002)

Por otro lado es importante mencionar que aun cuando las poblaciones de *R. mucilaginosa* declinan rápidamente la influencia de estas en el remanente final de sólidos solubles es notoria sobre todo cuando se compara la fermentación de inóculo puro de *Z. bailii* (Gráfica 7), donde se puede apreciar una concentración de sólidos solubles de 6.2°Brix contra los 5.6°Brix obtenidos en la fermentación con el inóculo mixto de inóculo mixto *Z. bailii* / *R. mucilaginosa* (Gráfica 8). Esto puede deberse al consumo de azúcares por *Rhodothorula* mientras la concentración de oxígeno disuelto lo permite, y también a que una vez que las poblaciones de *R. mucilaginosa* comienzan morir y se lisan aportan liberan compuestos nitrogenados en el medio los cuales podrían elevar la concentración de nitrógeno disponible que lo que se traduce en un mejor aprovechamiento de los azúcares según Bisson et al (1987) y Arrizon et al (2002).

Con respecto a las fermentaciones con inóculo puro de *S. cerevisiae* (Gráfica 9) el consumo de azúcares es bastante aceptable si bien permanece ligeramente alto. Al final es el mayor de las tres especies ensayadas incluyendo el ensayo en donde se incluyen las tres especies, el hecho de que *S. cerevisiae* presente el mejor consumo de azúcares reductores se debe a la tolerancia a etanol y a la capacidad fermentativa de la misma que permite seguir metabolizando los azúcares aun después de que la concentración de etanol alcanza valores restrictivos para otras especies.

En la Gráfica 10 se observa que el consumo de azúcares cuando las levaduras no *Saccharomyces* están presentes es menor al cultivo puro de *S. cerevisiae* lo que coincide con los

² El porcentaje restante puede estar constituido por sólidos solubles diversos como dímeros o trímeros de fructosa y pectinas.

reportes de Biosca et al (2002), Fleet [(a) 1990 y (b) 1997] y Zhore & Erten (2002) fermentaciones incompletas y "débiles" que tienen un contenido residual alto de azúcares. Lo anterior puede explicarse considerando que las levaduras no *Saccharomyces* pueden bajar la concentración de nitrógeno disponible y afectar así el consumo de azúcares.

- Etanol

La producción de etanol por *Z. baillii* en el ensayo de inóculo puro (Gráfica 7) se encuentra dentro del intervalo reportado para esta especie (Romano et al 2003) que esta clasificada por Barnett (2000) como de mediano poder fermentativo. No hay datos publicados relacionados con fermentaciones llevadas a cabo en mostos de Agave con esta especie en particular.

Se sabe que *R. mucilaginosa* no participa en la producción de alcohol ya que su metabolismo es oxidativo sin embargo esta levadura puede afectar de manera indirecta a la producción de etanol, a través del consumo de carbohidratos y de la liberación de subproductos que alteran el ambiente fisicoquímico de la fermentación. El efecto de *R. mucilaginosa* sobre la producción de etanol parece ser negativo en todos los casos en donde participa, particularmente en la fermentación mixta con *Z. baillii* (Gráfica 8) en donde el contenido de etanol al final es menor que el obtenido con el cultivo puro de *Z. baillii*.

La producción de etanol por *S. cerevisiae* en el ensayo con inóculo puro (Gráfica 9) fue mayor a la observada en la fermentación espontánea y a la reportada por Cedeño (1995) y Pinal (1997) para mostos de *Agave tequilana*, esto puede atribuirse al suplemento de nitrógeno adicionado, pero también a que no existe competencia por los azúcares disponibles, a que las condiciones de fermentación son menos variables y a que las pérdidas por evaporación son menores en los ensayos de laboratorio.

Con respecto al ensayo en donde el inóculo inicial contiene las tres especies (Gráfica 10), el contenido de etanol es bastante aceptable aunque menor al obtenido con la cepa pura de *S. cerevisiae* y al observado en la fermentación espontánea y no se observa un efecto sinérgico en la producción de etanol como se ha reportado con *Pichia fermentans* (Clemente Jiménez 2005) en fermentaciones vínicas.

Es importante mencionar que la producción de etanol como parámetro aislado solo determina la eficiencia de la fermentación pero una eficiencia alta no es necesariamente un sinónimo de calidad en el producto final.

- Crecimiento

El crecimiento de *Z. baillii* en el cultivo puro (Gráfica 7) alcanza un crecimiento máximo a las 24h de fermentación después del cual la población disminuye sin pasar por una fase estacionaria aparente.

Con respecto al cultivo mixto de *R. mucilaginosa*/*Z. baillii* (Gráfica 8) el crecimiento de la última especie parece estar ligeramente favorecido en las primeras 24h de fermentación por la presencia de *R. mucilaginosa*, esto puede deberse una vez más al efecto que los compuestos liberados en la lisis de las células de esta especie ejercen en el medio, o a una posible relación de comensalismo en la que la viabilidad de *Rhodotorula* se mantiene al asociarse con *Z. baillii* y esta última especie logra un mayor crecimiento poblacional. Esto se encuentra en concordancia con los datos de los azúcares residuales lo que también explica el menor contenido de sólidos solubles al

final de la fermentación. En este ensayo el decaimiento de la población de *Z. baillii* es menos pronunciado que en el cultivo puro y tiende a estabilizarse al final.

En las fermentaciones en las que participa *R. mucilaginosa* sus poblaciones decrecen rápidamente después de la inoculación en el mosto y perduran en un número detectable hasta las 24 horas, esta caída en la población puede explicarse si se tiene en cuenta el efecto que ejercen sobre la viabilidad la baja concentración de oxígeno disuelto en el mosto, el estrés osmótico impuesto por el mismo y principalmente la concentración de etanol a la que esta especie parece ser particularmente susceptible después de que alcanza el 1% en la fermentación.

El crecimiento óptimo para *S. cerevisiae* se observa en la fermentación de cepa pura (Gráfica 10) la población en este ensayo alcanza un crecimiento máximo a las 24h y después entra en una fase muy estable casi estacionaria. Los valores coinciden con lo reportado para fermentaciones de tequila (Cedeño 1995) y son más elevados que los observados en la fermentación natural. La explicación a este crecimiento se encuentra en el inóculo utilizado 10^6 cfu/ml, la disponibilidad de nutrientes que tienen las células y las condiciones controladas de la fermentación. Hay que recordar que la fermentación espontánea es abierta, inicia con un inóculo natural y esta sometida a cambios de temperatura.

Los datos de crecimiento (una población robusta) y remanente de sólidos solubles (con valores relativamente altos) obtenidos de los experimentos en los que participa *S. cerevisiae* sugieren que el tiempo de fermentación asignado fue menor al necesario para completar la misma y obtener muy posiblemente una concentración final de etanol más elevada.

En cuanto a la fermentación con el inóculo triple (Gráfica 9) llama la atención el bajo crecimiento de las células de *Z. baillii* comparado con las demás fermentaciones en donde se utiliza esta especie, esto sugiere que *S. cerevisiae* de algún modo ejerce un efecto negativo sobre *Z. baillii* desde el inicio de la fermentación. Inclusive cuando la concentración de alcohol no es un factor determinante para la implantación de *S. cerevisiae* como población dominante. Una posible explicación reside en que la cepa utilizada de *S. cerevisiae* tenga el fenotipo killer y la cepa de *Z. baillii* sea sensitiva a la toxina, sin embargo aunque existen reportes de cepas de *S. cerevisiae* con este fenotipo (Lachance (a) 1995, Pretorius 2000, Fleet et al (a) 1990) no se encontró ninguno en referencia a la sensibilidad de *Z. baillii*. Los patrones de crecimiento de esta cepa coinciden con los mostrados en reportes para otras levaduras de inicio de fermentación como *Candida*, *Pichia* y *Kloeckera* (Fleet (d) 1993, Zhore et al 2002, Jiménez et al 2005) crecidas en cultivo mixto con *S. cerevisiae*.

Análisis de los destilados obtenidos en los ensayos de fermentación controlada.

A continuación se describen los resultados mostrados en las Gráficas 11 y 12 en donde se compara la concentración de los congénicos mencionados, en los destilados obtenidos de las fermentaciones realizadas en el laboratorio y en la fermentación espontánea.

- Contenido de Acetaldehído

El contenido de acetaldehído en general en todas las fermentaciones de mostos de *Agave angustifolia* estudiadas aquí se encuentra muy por debajo del valor límite (0.05%) reportado para este compuesto en destilados de alto contenido alcohólico. Existen diferentes razones para esta baja

concentración; las características metabólicas de las especies y cepas que participan en el proceso, un bajo contenido de sulfito en el mosto así como la temperatura de fermentación (Liu et al 2000), y la naturaleza misma del compuesto pues casi todo el acetaldehído que se produce dentro de la célula es utilizado como intermediario en alguna otra reacción casi siempre para mantener los niveles de cofactores (Millán & Ortega 1998). El acetaldehído otorga a las bebidas en las que se encuentra un sabor que recuerda la cidra y un olor a manzanas verdes que enriquecen el mismo cuando se encuentran en una la proporción adecuada. La sobre producción de acetaldehído ha sido relacionada con una interrupción súbita de la fermentación, o un proceso de floculación prematuro en la misma y es altamente indeseable en la mayor parte de las fermentaciones alcohólicas.

De acuerdo con la Gráfica 11 el menor contenido de acetaldehído de las fermentaciones analizadas se encuentra en los ensayos llevados a cabo con *Z. bailii* como cepa pura y en cultivo mixto con *R. mucilaginosa* estos datos de baja producción de acetaldehído están en concordancia con los reportes de Romano et al [(a) 1994, (c) 2003] para levaduras de este mismo genero y se atribuyen a las diferentes capacidades metabólicas de cada especie (Plata et al 2005). En contraste las concentraciones mas elevadas de este compuesto se observan en la fermentación espontánea (0.012%), la fermentación con el inóculo triple (0.01%) y luego en el ensayo con inóculo puro de *S. cerevisiae* (0.008%), estos resultados sugieren un aporte especialmente significativo por esta especie al contenido final de acetaldehído, superior al realizado por las levaduras de inicio de fermentación, estos datos se encuentran en concordancia con los reportes de Romano et al [(c) 2003] para ensayos de fermentación en mostos de vinos. También es importante mencionar que parece existir un efecto sinérgico en la producción de acetaldehído en cultivos mixtos, esto se ha reportado con anterioridad para otros compuestos en fermentaciones mixtas con levaduras del género *Pichia* (Clemente-Jiménez et al 2005).

No se encontraron datos con relación a la producción de este compuesto por levaduras del género *Rhodothorula*, aunque al ser una levadura oxidativa debe producirse solamente como subproducto en reacciones de degradación como la de la treonina o de cimenos.

- Contenido de Acetato de etilo.

El acetato de etilo es el éster más abundante en destilados provenientes de fermentaciones alcohólicas de tequila y mezcal (Cedeño 1995, Manjarrez & Llama 1969) y junto con el acetato de isoamilo uno de los más importantes compuestos de sabor y aroma en las fermentaciones alcohólicas en general (Verstrepen et al 2003, Plata et al 2005), el sabor y aroma que imparte es difícil de describir y en ocasiones solo se denota como olor y sabor a disolvente. Se forma en las levaduras en una variedad de reacciones que incluyen la fermentación de azúcares y purinas.

Las concentraciones para todos los destilados se encuentran dentro del intervalo establecido como deseable en la norma oficial mexicana para mezcal (NOM-070-SCFI-1994).

La concentración mas elevada de este compuesto se encontró en el destilado de la fermentación de laboratorio de inóculo triple, que es incluso más alta que la obtenida en la fermentación natural, la explicación a esta concentración inusualmente elevada puede estar en la competencia que existe en la fermentación natural por los azúcares, que constituyen uno de los factores que afectan a la síntesis del acetato, pero también en el mantenimiento de una temperatura relativamente alta y constante de fermentación (20-30°C) que se relaciona con una tasa elevada de producción de esterres (Verstrepen et al 2003).

Aunque no hay reportes que correlacionen la concentración de nitrógeno asimilable con la producción de acetato de etilo en tequila o mezcal existen datos de mostos de cerveza que sugieren una relación (Sablayrolles & Ball 1995) y pueden servir para explicar la mayor producción de este compuesto en los ensayos de laboratorio teniendo en cuenta el suplemento de nitrógeno adicional.

Los valores de concentración en los ensayos de laboratorio no están tan separados e incluso se observa un posible aporte a la producción de *R. mucilaginosa*, una vez mas puede ser un aporte directo a través de la producción del compuesto o bien ejercido de manera indirecta por los compuestos liberados después de la lisis celular. El aporte de *Z. bailii* es evidente y se observa en este caso al igual que con el acetaldehído aunque mucho mas pronunciado, un posible efecto sinérgico en la producción del compuesto por *S. cerevisiae* y *Z. bailii*. Sin embargo basados en la producción individual de cada especie es lógico sugerir que el aporte principal en términos de producción esta dado por *S. cerevisiae*.

No se encontraron datos reportados en la bibliografía en referencia a la producción de acetato de etilo.

- Contenido de Metanol

El contenido de metanol en una bebida alcohólica es una variable importante no tanto por el sabor y aroma a maderas que otorga sino más bien por su toxicidad.

En los destilados de laboratorio analizados (Grafica 11) la presencia de metanol es una constante. Aunque se han encontrado reportes de su biosíntesis en levaduras y en el banco de datos MycoBank solo una proteína se relaciona con su producción, como subproducto de la demetilación de una fosfoproteína fosfatasa mitocondrial.

En mostos de tequila existe la teoría (Cedeño 1995) de que el metanol encontrado es producido por la acción de esterasas sobre pectinas metiladas presentes de manera natural en el Agave, el hecho de que el *Agave angustifolia* posee también un contenido de pectinas considerable (Granados 1993) y de que se han realizado estudios sobre de la producción de esterasas extracelulares por *S. cerevisiae* (Esteve-Zarzoso et al (a) 1998) permiten suponer la posibilidad de que el contenido de etanol en las fermentaciones de laboratorio pudiera deberse a este tipo de reacciones.

Todos los destilados de los ensayos de laboratorio se encuentran dentro de la norma de contenido máximo de metanol para mezcal que es de 0.3%, sin embargo, el destilado natural tiene una concentración que se encuentra bordeando el límite, esta concentración elevada puede atribuirse a que las piñas utilizadas en la fermentación natural no habían madurado adecuadamente y por lo tanto pudieran tener un alto contenido de pectinas metiladas y en menor medida es posible que el contenido elevado se deba a la acción de algunas bacterias capaces de sintetizar este compuesto a partir de CO₂ (Xin et al 2004). Sin embargo es necesaria investigación adicional sobre este particular.

- Contenido de Alcohol isoamílico

El alcohol isoamilico es junto con el acetato de etilo uno de los compuestos más importantes en el tequila, no solo en cuanto a cantidad sino también en el aporte a las características organolépticas (Cedeño 1995, Pinal et al 1997) .

Este compuesto otorga a los destilados de mostos de uva un olor frutal parecido al del plátano y un sabor que en proporciones adecuadas recuerda al brandy (Patel et al 2003)

El valor máximo recomendable en mezcal es del 0.3% de modo que todos los destilados analizados se encuentran dentro de la norma, la producción de las levaduras no *Saccharomyces* es en este caso baja y el efecto del cultivo mixto es más bien negativo. El aporte más importante a la fermentación en términos de este compuesto es el de *S. cerevisiae*, y puede apreciarse en el perfil del destilado con cepas puras, estos datos coinciden con los reportados por Romano et al [(c) 2003] Patel (2003), Clemente Jiménez et al (2005) en vinos y Pinal et al (1997) en tequila y confirma a *S. cerevisiae* como la principal productora de alcohol isoamílico de la fermentación.

La elevada producción de alcohol isoamílico en el caso del ensayo con inóculo puro es atribuible a la especie misma que se caracteriza por una elevada producción del producto (Romano et al 2003) y a la combinación del alto contenido de azúcares y el suplemento de nitrógeno que disminuyen la magnitud de la relación C/N lo que se traduce según Pinal et al (1997), Biosca et al (2002) y Wang et al (2003) en que las células de levadura incrementan la tasa de reacciones de desaminación de aminoácidos en este caso leucina, que da lugar a al α -cetoisocaproato, precursor del alcohol isoamílico.

También es importante mencionar la influencia de la temperatura en la producción de este alcohol, en mostos de tequila (Cedeño 1995, Pinal et al 1997) se relaciona una temperatura de fermentación de 30°C o más con una producción elevada del compuesto, de manera que resulta lógico pensar que el ensayo de laboratorio que no se somete a cambios drásticos en la temperatura como ocurre en la fermentación natural³ presente un mayor contenido del compuesto.

- Contenido de Alcohol amílico

El alcohol amílico se forma también por reacciones de desaminación de aminoácidos en este caso la isoleucina, en los artículos consultados que hacen referencia a este compuesto en vinos y tequilas, se menciona su coelución con el alcohol isoamílico y se cuantifican juntos, lo mismo ocurre con sus propiedades organolépticas que se reportan idénticas.

Hasta la fecha solo los estudios de Almanza (comunicación personal) en mostos de Agave tequilana siguieron una presencia importante de este alcohol en el tequila; en la fermentación espontánea de mostos de mezcal se detectó el compuesto pero en una proporción muy pequeña, menos del 0.01% (punto más bajo de la calibración) y por debajo del umbral de sabor (0.02%) reportado para este compuesto. En los ensayos de laboratorio no hubo respuesta alguna del detector para este compuesto en ningún caso.

Se sabe (Wang et al 2003) que en vinos el alcohol isoamílico siempre supera en proporción al amílico sin embargo no se conoce la explicación a este fenómeno. Es posible que la explicación se encuentre en el bajo contenido de isoleucina en los mostos, o por el contrario en la elevada concentración de leucina que llevan a la célula a utilizarla primero. También ser que se deba a las características metabólicas de *S. cerevisiae* que prefieran utilizar la leucina sobre la isoleucina cuando requieren satisfacer sus necesidades de nitrógeno aunque no hay evidencia de ello.

³ Es importante recordar que la fermentación es abierta y la temperatura por las noches puede bajar hasta los 9°C.

- Contenido de Etanol.

A menudo el etanol no se considera un congenérico sin embargo aporta un aroma característico y su sabor se define en vinos y cervezas simplemente como alcohólico registrado en la parte media de la lengua.

El contenido de etanol en los destilados (Gráfica 12) es un reflejo de lo que ocurrió en cada una de las fermentaciones y las razones del contenido de alcohol etílico en cada una de ellas fueron discutidas previamente.

Todas las fermentaciones se encuentran dentro de la norma que para mezcal impone un valor máximo recomendado de 55%. Sin embargo las llevadas a cabo con los inóculos de no *Saccharomyces* se encuentran por debajo de valor mínimo permitido (36%).

Se destaca el elevado contenido alcohólico de la fermentación de inóculo puro de *S. cerevisiae*, que resultó ser mayor que la del producto obtenido en la fermentación natural. Una razón además de las expuestas con anterioridad para el elevado contenido alcohólico es el proceso de destilación que al realizarse con equipo adecuado permite un mejor control de la temperatura y una mejor recuperación del producto.

Comparación entre los sistemas de fermentación.

El contenido de congenéricos de Tabla 5 y los parámetros de rendimiento de producto/sustrato (p/s), crecimiento/sustrato (x/s) y productividad (P) calculados en la Tabla 4 se muestran para facilitar una comparación entre las fermentaciones de laboratorio y natural.

En coincidencia con la discusión anterior mejor sistema en términos de producción de etanol es el realizado con el inóculo puro de *S. cerevisiae*, mientras que el sistema más similar a la fermentación natural fue el cultivo mixto en el que se incluyeron las tres especies de levaduras ensayadas pues tienen el rendimiento producto sustrato y su productividad difiere en 0.03g etanol / L · h.

Con respecto al análisis de congenéricos, se observa que el destilado obtenido de la fermentación con *S. cerevisiae* es el más parecido en términos de concentración de etanol, acetato de etilo y alcohol isoamilico, mientras que el destilado proveniente del ensayo de inóculo triple es que presenta la mayor concentración de acetaldehído. Debe mencionarse también que la fermentación natural mostró un contenido de metanol mayor al de todas los ensayos de laboratorio lo que puede deberse como se explico antes al grado de madurez de las plantas utilizadas.

Es necesario aclarar que estos resultados no pueden analizarse en términos cuantitativos sin pesar en aporte a las características organolépticas del producto terminado pues como se mencionó antes el sabor y aroma de una bebida esta determinado por una mezcla de múltiples compuestos y el hecho un mezcal tenga un contenido alcohólico muy alto no le otorga necesariamente características agradables al gusto por lo que aun cuando *S. cerevisiae* resultara la principal productora de etanol y los compuestos mencionados de sabor y aroma (acetaldehído, acetato de etilo, alcohol isoamilico) es necesario determinar el aporte de todas las levaduras presentes en la fermentación en términos de estos mismo compuestos y de otros que aunque se encuentren en menor concentración afectan al sabor y aroma del producto terminado.

CONCLUSIONES.

- Se identificaron como *Candida apicola*, *Candida intermedia*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Z. baillii* a las levaduras cultivables procedentes de un mosto de *Agave angustifolia* haw empleado en la producción de mezcal en la región de Sola de Vega Oaxaca.
- Se determinaron las poblaciones predominantes en cada etapa de la fermentación y los cambios en ellas a través del tiempo.
- Se identificó a *Candida intermedia* como la levadura dominante en la etapa inicial de la fermentación
- Se identificó a *Saccharomyces cerevisiae* como la población dominante las etapas medias y finales de la fermentación.
- Se observó que las levaduras de la especie *Z. baillii* forman la segunda población más importante en número a lo largo de la fermentación.
- Se determinó el aporte de las especies dominantes y de *R. mucilaginosa* a la fermentación a en términos de la producción de acetato de etilo, etanol, alcohol isoamilico, alcohol amílico, acetaldehído (Tabla 5)
- Se definió a *S. cerevisiae* como la principal productora de etanol, acetato de etilo alcohol isoamilico y acetaldehído durante la fermentación y por lo tanto como la especie que más aporta a las características organolépticas del producto terminado.

PERSPECTIVAS.

El estudio de la microbiota existente en los mostos de Agave en la producción de mezcal y su repercusión en las características organolépticas del producto terminado tienen enormes perspectivas de crecimiento pues no fue posible encontrar trabajos en referencia a este destilado fuera del trabajo de (Manjarrez 1969) sobre la determinación de congenéricos por cromatografía

Entre las posibilidades a estudiar se encuentran:

La caracterización exhaustiva de la microbiota en el mosto incluyendo también a bacterias y hongos que pudieran estar presentes y que seguramente tienen un impacto en el sabor del producto terminado. Dentro de este apartado se sugiere la aplicación de técnicas como la electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante DGGE para obtener una imagen real de la microbiota presente tanto de levaduras como de bacterias y evitando los problemas relacionados como la recuperación de los microorganismos en medios de cultivo.

La caracterización de las cepas de *S. cerevisiae* y estudio de la dominancia poblacional y dinámica de poblaciones para, después poder estudiar el impacto de las diferentes cepas en el destilado y seleccionar así una o varias cepas que posean la mayor cantidad de características deseables para el proceso como tolerancia a etanol, a estrés osmótico y térmico, baja producción de H₂S, elevada producción de congenéricos, factor killer, etc.

Determinar la influencia de la concentración de nitrógeno, temperatura y oxígeno disuelto sobre la producción de etanol y congenéricos por la cepa de *S. cerevisiae* seleccionada.

Posterior modificación genética de la cepa seleccionada para crear una súper cepa de manera similar a los intentos reportados en vinos (Pretorius 2000)

El estudio del aporte organoléptico de las especies de *Candida* identificadas en este trabajo así como de *Pichia fermentans* que ha sido reportada como una excelente opción para fermentaciones mixtas con *S. cerevisiae* por Clemente Jiménez (2005), con el objetivo de encontrar microflora secundaria que enriquezca el perfil de aroma y sabor del producto terminado.

Una vez que se han seleccionado las cepas correspondientes el siguiente paso sería componer un inóculo mixto y estudiar su desarrollo en una fermentación tradicional en el estado de Oaxaca para determinar la implantación sobre las levaduras nativas y la contribución real en destilado con el fin de ofrecer un producto más homogéneo y de características reproducibles.

Estudiar el efecto de la adición de sulfito sobre el sabor y aroma de la fermentación para proponerlo como solución al problema recurrente que se presenta en mostos de mezcal de fermentaciones lentas o detenidas prematuramente

El estudio del aporte de las levaduras estudiadas en compuestos secundarios de sabor y aroma como acetato de amilo, acetato de isoamilico entre otros.

ANEXO.

PARTE I

Perfiles de restricción para las levaduras aisladas de la muestra:

Tiempo 0 (T_0)	p. 62
Tiempo 1 (T_1)	p. 64
Tiempo 3 (T_3)	p. 66
Tiempo 5 (T_5)	p. 67

PARTE II

Cromatogramas

Determinación de glucosa y fructosa en el mosto (HPLC) en la fermentación natural	p. 69
Cromatograma de la determinación de congénicos en la fermentación natural	p. 69
Comparación de los cromatogramas de la determinación de congénicos en la fermentación natural y en los ensayos de laboratorio	p. 70

T₀ Muestra Sólida.

Candida intermedia

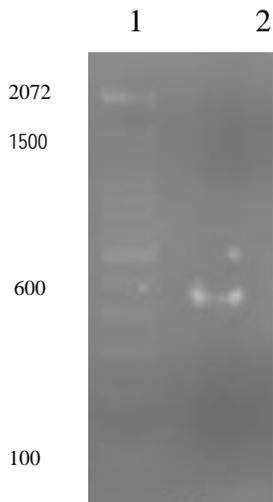


Fig. 12 Tamaño del producto de amplificación por PCR; 1. MM, 2. *C. intermedia*.

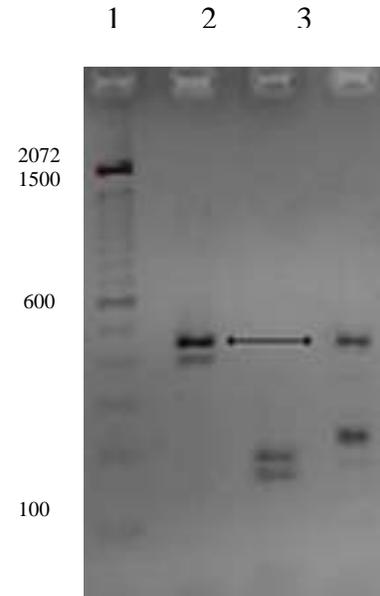


Fig. 13. Perfil de restricción para *C. intermedia*, 1.MM, 2. *Hae* III, 3. *Cfo* I, 4. *Hinf* I.

Rhodotorula mucilaginosa

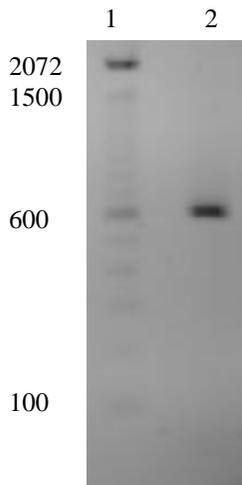


Fig. 14 Tamaño del producto de amplificación por PCR; 1. MM, 2. *R. mucilaginosa*

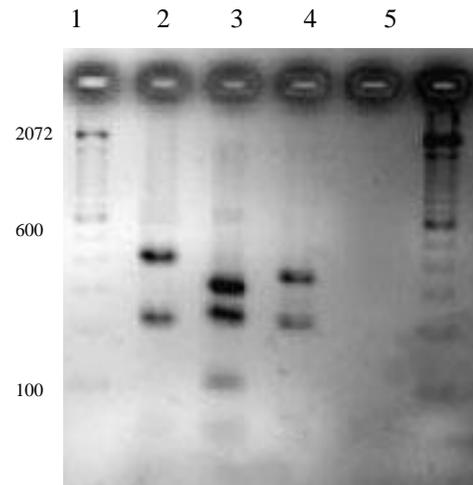


Fig. 15. Perfil de restricción para *R. mucilaginosa*, 1.MM, 2. *Hae* III, 3. *Cfo* I, 4. *Hinf* I.

Candida apicola.

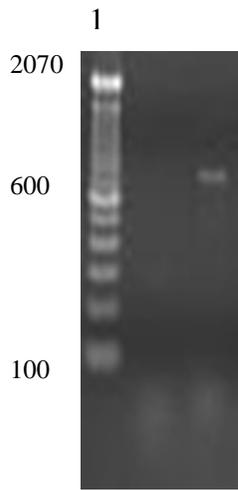


Fig. 16 Tamaño del producto de amplificación por PCR; 1. MM, 2. *C. apicola*

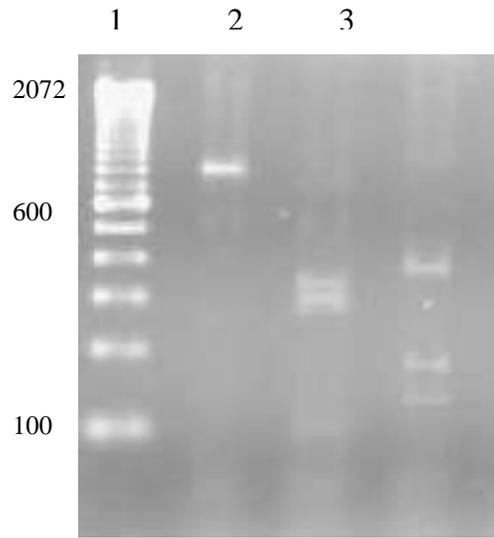


Fig. 17. Perfil de restricción para *C. apicola*, 1.MM, 2. *HaeIII*, 3. *CfoI*, 4. *HinfI*, 5. -, 6. MM

Zygosaccharomyces bailii

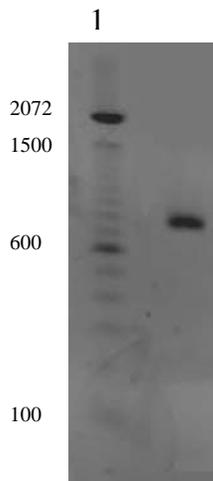


Fig. 18 Tamaño del producto de amplificación por PCR; 1. MM, 2. *Z. bailii*

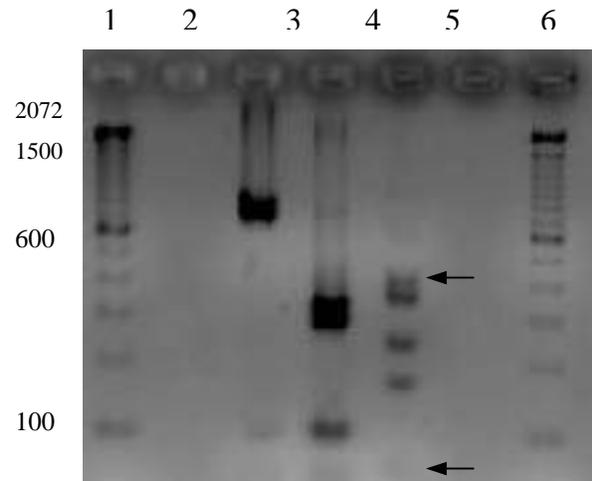


Fig. 19. Perfil de restricción para *Z. bailii*, 1.MM, 2. - 3. *HaeIII*, 4. *CfoI*, 5. *HinfI*, 6. -, 7. MM.

T1 Muestra Líquida.

S. cerevisiae y *S. spp*

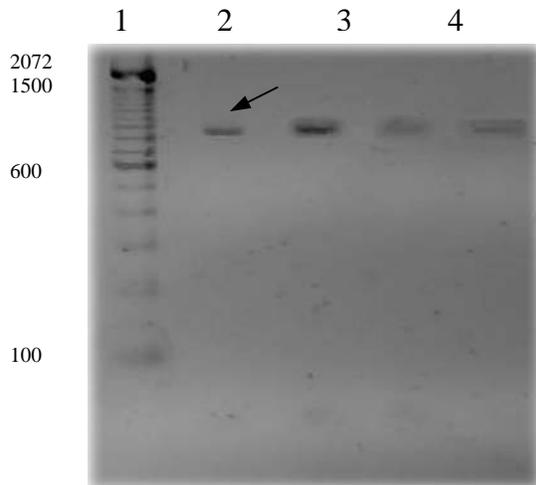


Fig. 20 Tamaño del producto de amplificación por PCR; 1. MM, 2. *S. cerevisiae* (III), 2. *S. cerevisiae*, *S. cerevisiae* (I), *S. cerevisiae* (II).

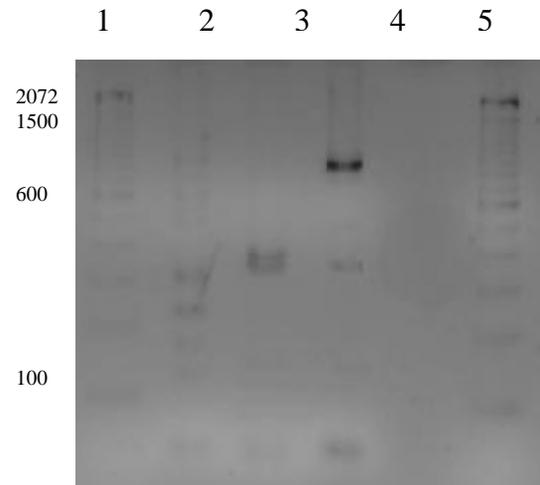


Fig. 21. Perfil de restricción para *S. cerevisiae*, 1.MM, 2. -, 3. *HaeIII*, 4. *CfoI*, 5. *HinfI*, 6. -, 7. MM.

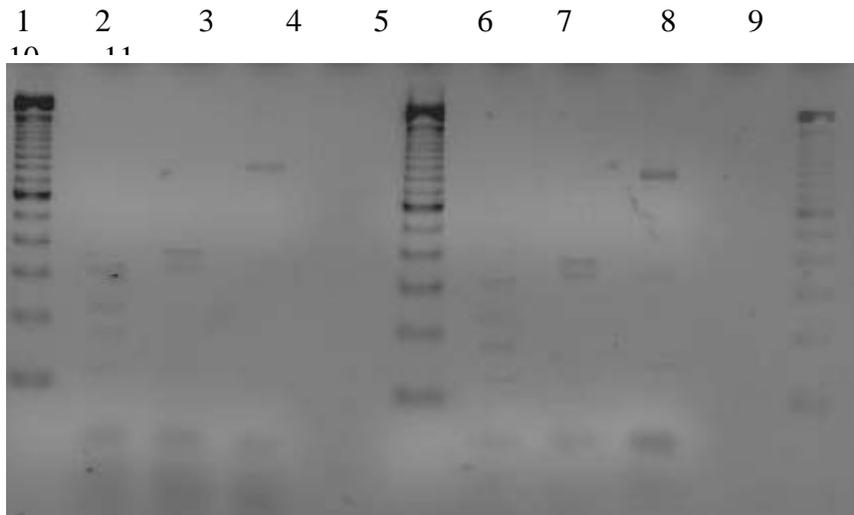


Fig. 22. Perfil de restricción para *S. cerevisiae* izquierda y *S. cerevisiae* (I) en la derecha; carriles: 1. MM, 2. *Hae III*, 3. *Cfo I*, 4. *Hinf. I*, 5. -, 6. MM, 7. *HaeIII*, 8. *Cfo I*, 9. *HinfI*, 10. -, 11. MM.

S. spp

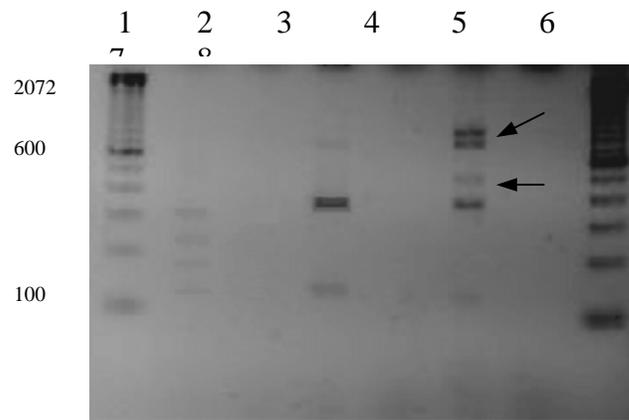


Fig. 23. Perfil de restricción para *S. spp*, 1.MM, 2. *HaeIII*, 3. -, 4. *CfoI*, 5. -, 6- *HinfI*. 1, 7. -,8. MM.

Zygosaccharomyces bisporus

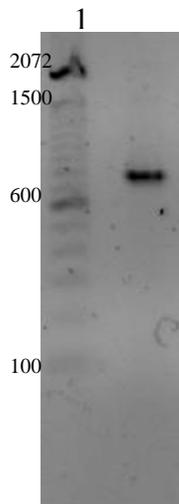


Fig. 24 Tamaño del producto de amplificación por PCR; 1. MM, 2. *Z. bisporus*

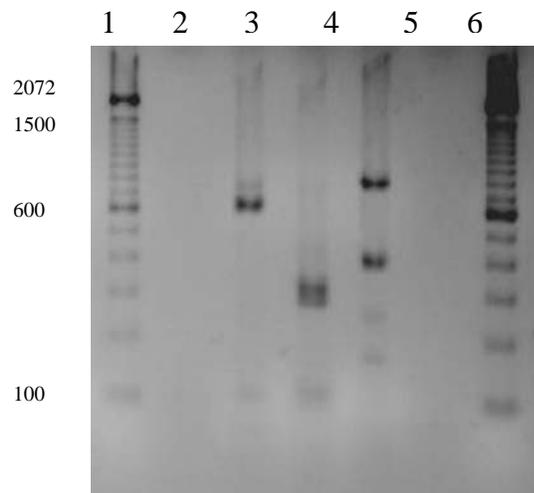


Fig. 25. Perfil de restricción para *Z. bisporus*, 1.MM, 2. -, 3. *HaeIII*, 4. *CfoI*, 5. *HinfI*, 6. -, 7. MM.

T3 Muestra Liquida.

S. cerevisiae y *S. spp.*

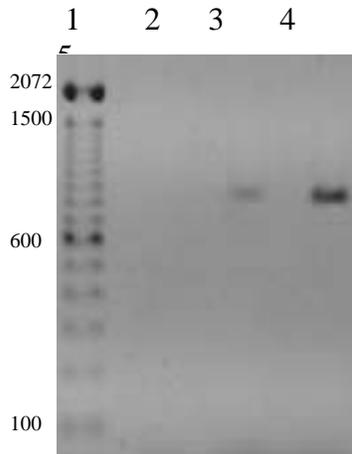


Fig. 26 Tamaño del producto de amplificación por PCR; 1. MM, 2. -, 3. -, 4. *S. cerevisiae*, 5. *S. spp.*

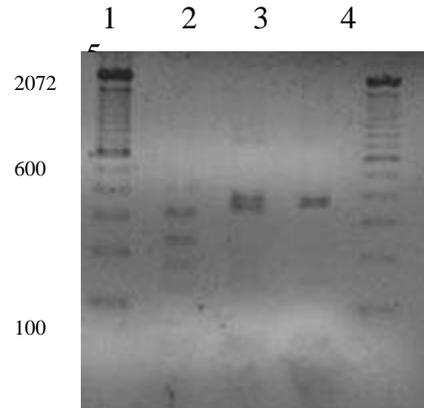


Fig. 27. Perfil de restricción para *S. cerevisiae*, 1. MM, 2. *Hae* III, 3. *Cfo* I, 4. *Hinf* I, 5. MM.

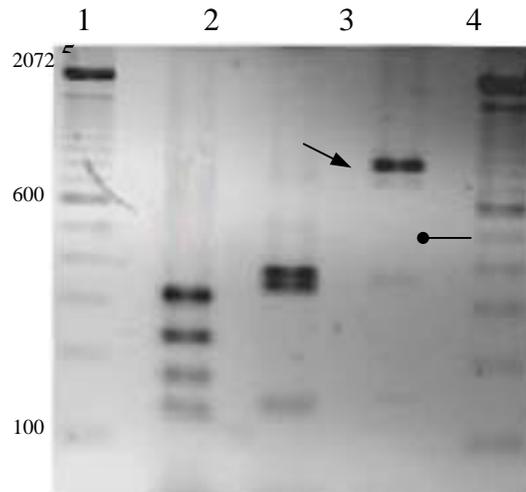


Fig. 28. Perfil de restricción para *S. spp.*, 1. MM, 2. *Hae* III, 3. *Cfo* I, 4. *Hinf* I, 5. MM.

Zygosaccharomyces bisporus.

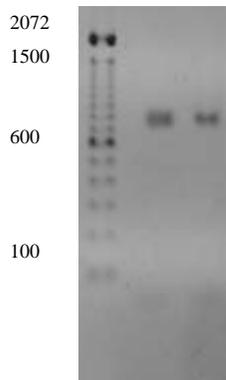


Fig. 29 Tamaño del producto de amplificación por PCR; 1. MM, 2. *Z. bisporus*

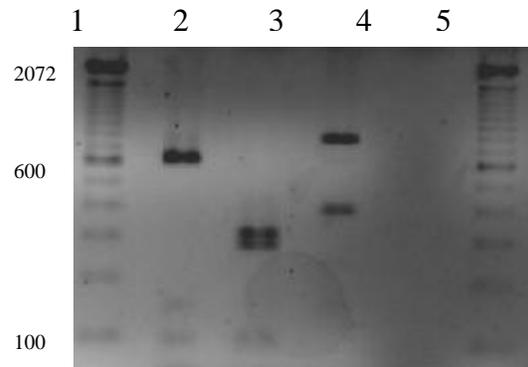


Fig. 30. Perfil de restricción para *Z. bisporus*, 1. MM, 2. *Hae* III, 3. *Cfo* I, 4. *Hinf* I, 5. -, 6. MM.

T5 Muestra Liquida.

Saccharomyces cerevisiae.

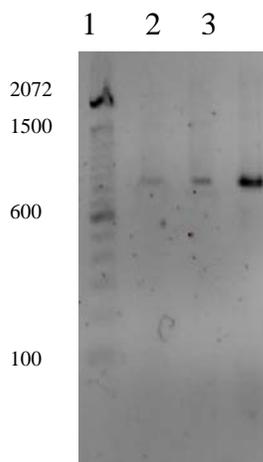


Fig. 31 Tamaño del producto de amplificación por PCR; 1. MM, 2. *S. cerevisiae*, 3. *S. cerevisiae*, 4. *S. spp.*,

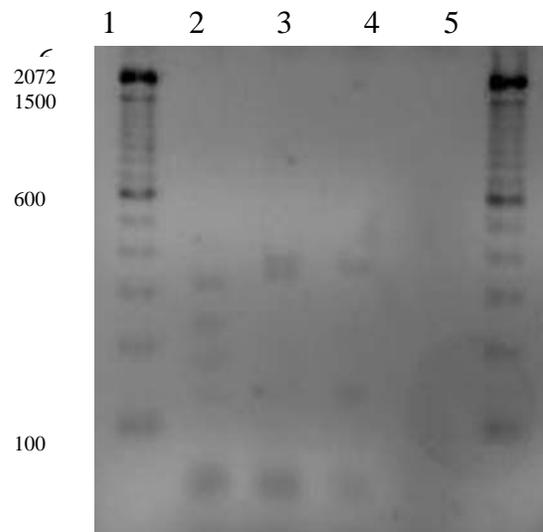


Fig. 32. Perfil de restricción para *S. cerevisiae*, 1. MM, 2. *Hae* III, 3. *Cfo* I, 4. *Hinf* I, 5. -, 6. MM.

Saccharomyces spp

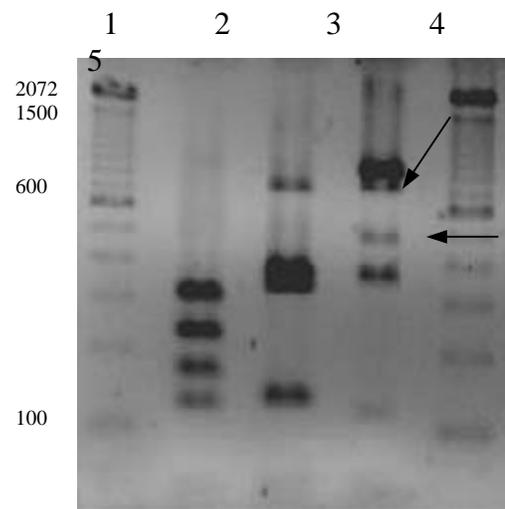
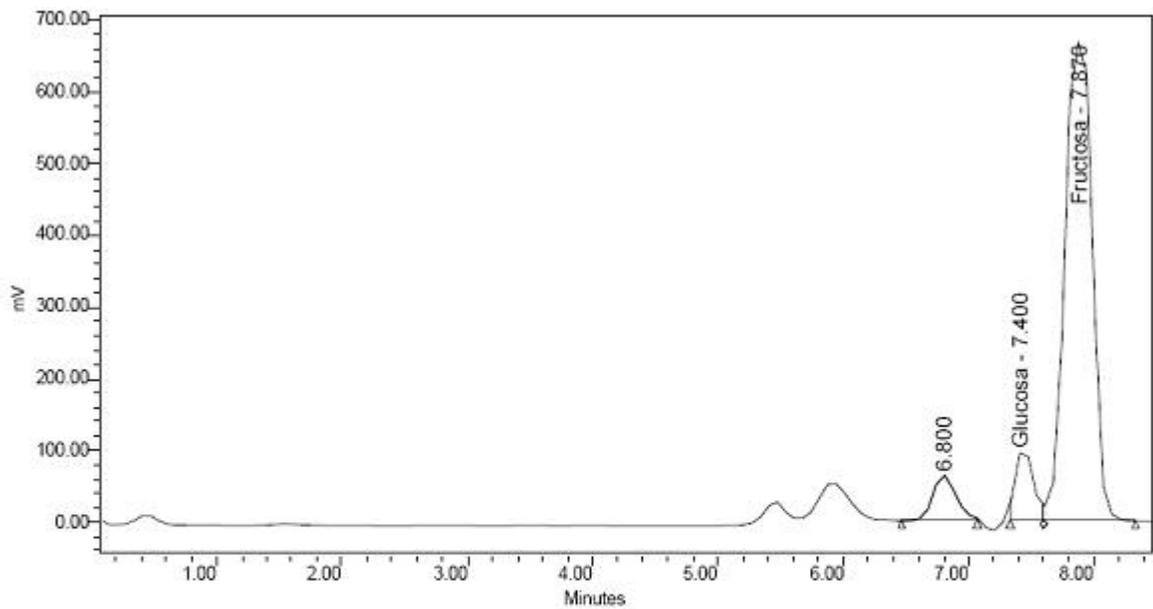
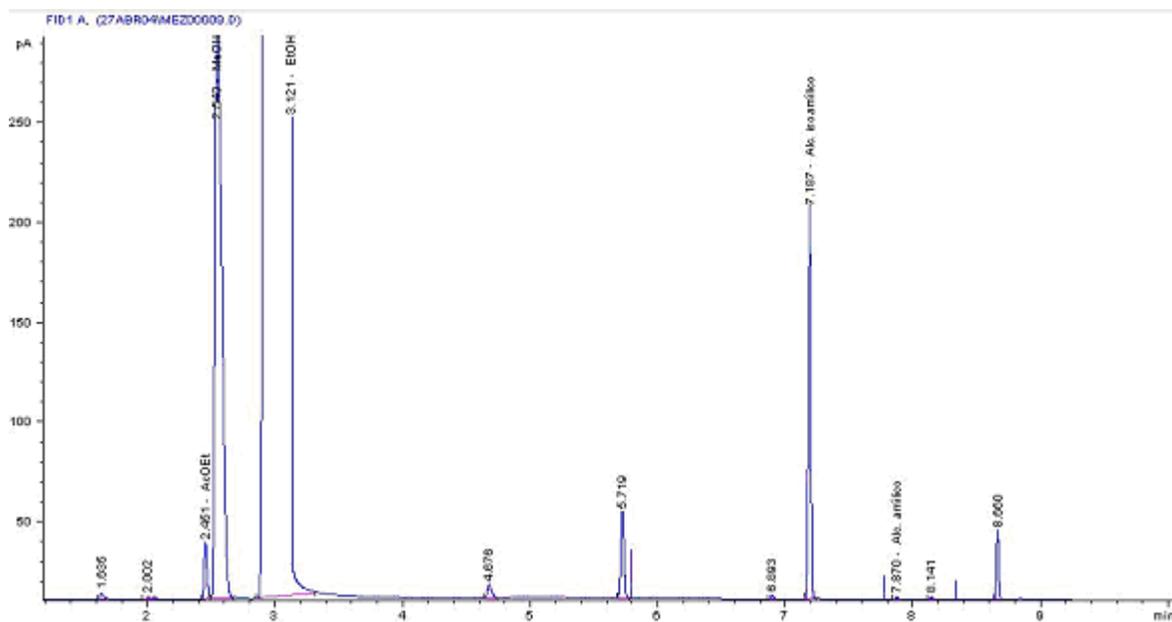


Fig. 33. Perfil de restricción para *S. spp.*, 1. MM, 2. *Hae* III, 3. *Cfo* I, 4. *Hinf* I, 5. MM.

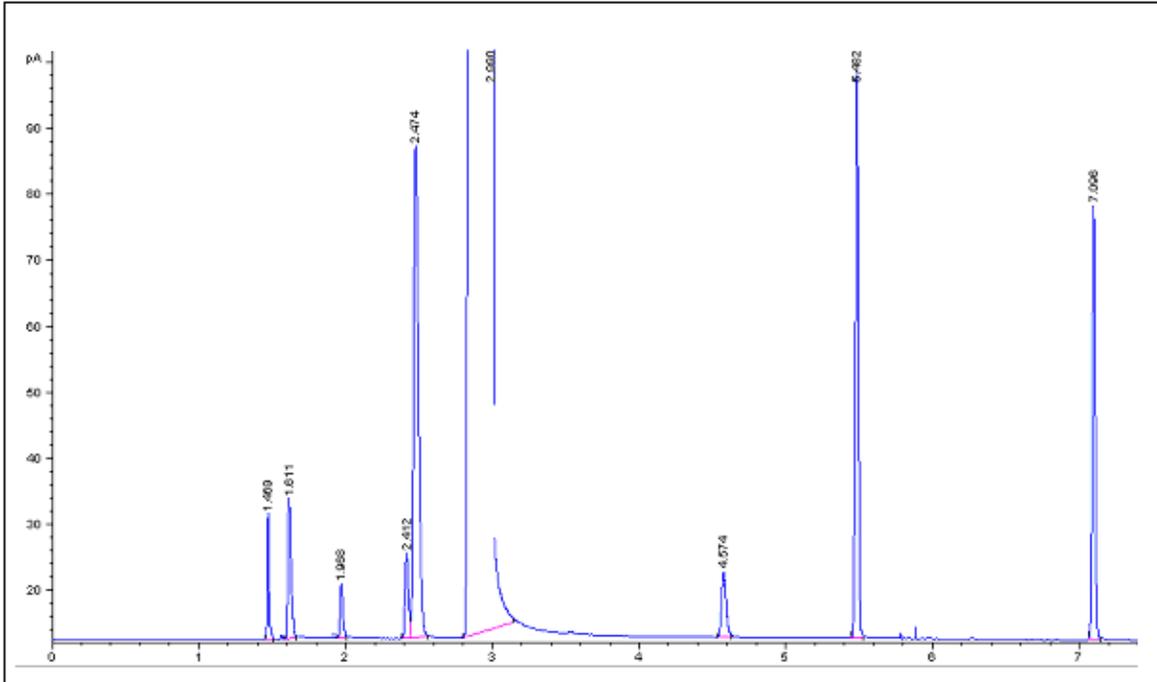


Peak Name	RT (min)	Area (V*sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1	6.800	836038	6.97	60313	7.08		
2 Glucosa	7.400	990876	8.26	95196	11.18	0.696	%
3 Fructosa	7.870	10173374	84.78	696306	81.74	7.297	%

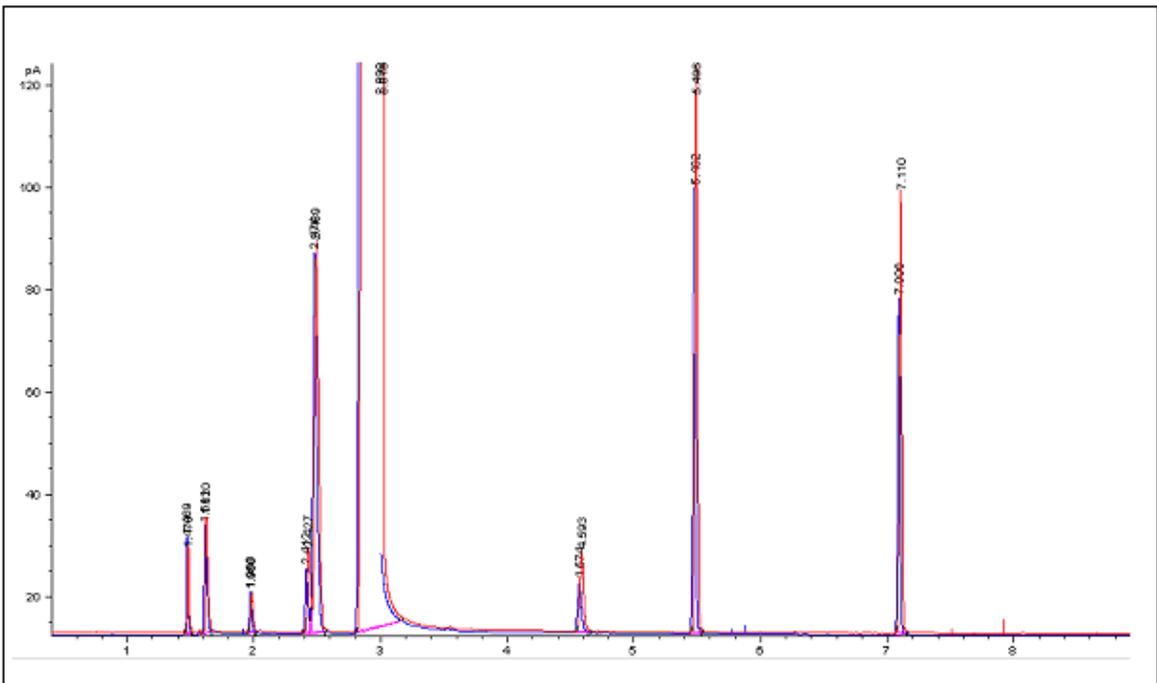
Cromatograma de la determinación de azúcares reductores por HPLC en el mosto de *Agave angustifolia* haw durante la elaboración de mezcal.



Cromatograma de la determinación de congénicos en el mosto de *Agave angustifolia* haw durante la elaboración del mezcal



Cromatograma de la determinación de congénicos en el ensayo de laboratorio con inóculo puro de *S. cerevisiae*.



Comparación de la producción de congénicos en las fermentaciones de laboratorio con inóculo triple (*Z. bailii*, *R. mucilaginosa* y *S. cerevisiae*) en rojo y mixta (*Z. bailii* *R. mucilaginosa*) en azul.

BIBLIOGRAFÍA.

1. **Alexander H., Anasanay-Galeote V., Dequin S., Blondin B.**, "Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*", *FEBS Letters*, **498**, (2001), pp98-103.
2. **Allsop D.**, *Microbial Diversity and Ecosystem Function*, UK (1995), CAB International-UNEP-UNESCO, pp. (3-9), (305-310).
3. **Amann Rudolf, Kühl Michael**, "In situ Methods for assessment of microorganisms and their activities", *Current Opinion in Microbiology*, **1**, (1998), 352-358.
4. **Andrighetto C, Psomas E., Tzanetakis N., Suzzi G., Lombardi A.** Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Lett Appl Microbiol.* 2000 Jan;30(1):5-9.
5. **Aragão Insuellas de Azeredo L., Gomes T. Ana, Mendonça-Hagler Lêda C., Hagler Allen N.**, Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil, *International Microbiology* **1**, (1998) pp. 205–208
6. **Arias C.R., J. K. Burns, L. M. Friedrich, R. M. Goodrich, and M. E. Parish** Yeast Species Associated with Orange Juice: Evaluation of Different Identification Methods *Appl. Environ. Microbiol.*, April 1, 2002, **68**, 1955 - 1961.
7. **Arrizon Javier, Gschaedler Anne**, "Increasing fermentation efficiency at high sugar concentrations by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of tequila fermentation process", *Canadian Journal of Microbiology*, **48**, (2002), pp 965-970
8. **Astromoff Anna**, "*Saccharomyces cerevisiae*: Genetics and Genomics", *In Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Demain Arnold L. (ed), 2th edition, USA 2000, ASM Press, pp435-446.
9. **Barnett J.A., Payne R. W., Yarrow D.**, *Yeast Characteristics and identification*, third edition, UK (2000), Cambridge editorial.
10. **Beltrán Gemma, Torija Maria de Jesus, Novo Mite, Ferrr Nemi, Poblet Montserratl**, "Analyses of Yeast populations during alcoholic fermentation: A six years follow-up study, *System. Appl. Microbiol.* **25**, (2002), pp. 287-293
11. **Beuchat Larry R.**, *Food and Beverage Microbiology*, AVI Book, USA 1987.
12. **Bisson L.F., Neigeborn L., Carlson M.**, "The gene SNF3 is required for high affinity glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*", *Journal of Bacteriology*, **169**, (1987), 1656-1662.

13. **Biosca Josep, Fernández Ma. Rosario, Larroy carolina, González Eva**, "Descripción y funciones de las alcohol deshidrogenasas de *Saccharomyces cerevisiae*. Algunos aspectos de la ingeniería metabólica aplicados a la fabricación de cerveza", *Cerveza y Malta* **155**, (2002).
14. **Blomberg Lennart**, *Tequila, Mezcal y Pulque, México* (2000), Ed. Diana.
15. **Bull Alan T., Ward Alan C., Goodfellow Michael**, "Search and Discovery for Biotechnology: the paradigm shift", *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**, (2000), pp573-606.
16. **Capece A., Fiore C.**, "Molecular and technological approaches to evaluate strain biodiversity in *Hanseniaspora uvarum* of wine origin", *Journal of Applied Microbiology*, (2004) pp 1-8
17. **Cedeño Cruz M. Et al**, "Production of Tequila from Agave", *Tequila Herradura, México*, (1995) <http://www.scocia.com/newsite/Tequila.pdf>.
18. **Cedeño M.**, "Tequila Production", *Critical Reviews in Biotechnology*, **15**, (1995), pp1-11
19. **Clemente Jimenez J.M., Mingorance-Carzola L., Martinez Rodriguez S.**, "Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation" *Int. Journal of Food Microbiology*, **98**, (2005)
20. **Cocolin L. Aggio Daniel, Manzano Marisa, Cantoni Carlo, Comi Guiseppe**, "An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk" *International Dairy Journal* **12** (2002) pp. 407-411
21. **Collado Quique**, "Levaduras y la fermentación alcohólica", Dossier, ACE revista de enología, CONABIO-SIRE <http://148.225.52.2/tax01302.htm>
22. **Cortes M.B., Moreno J., Zea L., Moyano L., Medina M.**, "Changes in Aroma compounds of sherry wines during their biological aging carried out by *Saccharomyces cerevisiae* races *bayanus* and *capensis*", *J. Agric. Food Chem.*, **46** (1998), pp 2389-2394
23. **Dahlöf Ingela, Baillie Harriet, Kjelleberg** "rpoB Microbial Community Analysis Avoids Limitations Inherent in 16S rRNA Gene Intraspecies Heterogeneity", *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (2000) pp3376-3380
24. **De Angelo J.** , "A New Medium for the detection of Wild Yeasts in Brewing Culture Yeast", *J. Amer. Brew. Chem.*, **45**, (1987), pp135-140
25. **De Barros Lopes Miguel, Soden Alson, Henschke Paul**, "PCR Differentiation of Commercial Yeast Strains Intron Place Primers", *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, (1996), pp 4514-4520.
26. **(a) Deak, T. & L. R. Beuchat**, "A collaborative study on media for the enumeration of yeasts in foods". *Int. J. Food Microbiol*, **43**, 1998, pp:91-95.

27. (b) Deak T. & Beuchat L., *Handbook of Food Spoilage Yeasts*, USA 1996, CRC Press, pp 111-148
28. (c) Deak T., "Simplified techniques for identifying foodborne yeasts in foods", *International Journal of Food Microbiology*, **19**, (1993) pp 15-26.
29. Dees Peter, Ghiorse W.C., "Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA", *FEMS Microbiology Ecology*, **35**, (2001) pp207-216
30. Díaz R., Gamazo C., *Manual Práctico de Microbiología*, 2ª edición, España2000, Editorial Masson, pp. 75-89.
31. Dieffenbach Carl W., Dragon Elizabeth A., "Setting up a PCR Laboratory", *PCR Primer: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press *PCR Techniques* USA 1995
32. Egli Christopher, Henick-King Thomas, "Identification of Brettanomyces/Dekkera species based on Polymorphism in the rRNA Internal Transcribed Spacer Region", *American Journal of Enology and Viticulture*, **53**, (2001), pp 241-247.
33. Egli C.M., Edinger W.D., Mitrakul C.M., Nehick-Kiing T., "Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations an their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines", *Journal of Applied Microbiology* **85** (1998), pp 779-789
34. Espingel-Ingroff Angela, Stockman L., Robertrs G., Pincus D., Pollack Jacl & Marler J., "Comparison of RapID Yeast Plus System with API 20C System for Identification of Common, New, and Emerging Yeast Pathogens". *Journal of Clinical Microbiology* **36** (1998), pp 883-886
35. Espinosa Juan Carlos, Fernandez.Gonzalez Monica, Ubeda Juan, "Identification of White Wine Yeasts by PCR-RFLP without previous Isolation on the Plate" *Food Technology and Biotechnology*, **40**, (2002), pp 157-160.
36. (a) Esteve-Zarzoso Braulio, Manzanares Paloma, Ramón Daniela, Querol Amparo, "The role of non-Saccharomyces yeasts in industrial winemaking" *International Microbiology* **1**, (1998)
37. (b) Esteve-Zarzoso et. al., "Rapid Identification of wine Yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region", *Archives in Microbiology* **169**, (1998) pp. 387-392
38. (c) Esteve-Zarzoso Braulio, Manzanares Paloma, Ramón Daniel, Querol Amparo, "Identification of yeasts by RFLP of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers" *Int. Journal of Syst. Bacteriol.* **49** (1999) pp329-337.

39. **(d) Esteve-Zarzoso B., Gostíncar A., Bobet R., Querol A.**, "Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from El Penedes area (Spain)", *Food Microbiology* **17** (2000) pp553-562.
40. **(e) Esteve-Zarzoso B., Peris-Toran M. J., Garcia-Maiquez E., Uruburu F.**, "Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines", *Applied and Environmental Microbiology*, **67** (2001), pp2056-5061.
41. **(f) Esteve-Zarzoso Braulio, Peris-Torán María José, Ramón Daniel, Querol Amparo**, "Molecular Characterization of *Hanseniaspora* species" *Antonie van Leeuwenhoek*, **80**, (2001) pp 85-92.
42. **Fal Allen**, "The Microbrewery Laboratory Manual – A Practical Guide to Laboratory Techniques and Quality Control Procedures for Small-Scale Brewers", Part 1: Yeast Management." *Brewing Techniques*, **2**, (1994), pp 28-35.
43. **Fell Jack, Boekhout J.W.**, "Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined as large subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis, *Int. J. Syst. and Evol. Microbiology* **50**, (2000) , pp1351-1371
44. **Fernández Espinar Ma. Teresa, Braulio Esteve-Zarsozo, Querol Amparo, Barrio Eladio**, "RFLP analysis of the ribosomal internal Transcribe Spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts", *Antonie van Leeuwenhoek* **78**, (2000) pp 87-97.
45. **Fernandez M., Ubeda J.F., Briones A.I.**, "Typing of non- *Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine making", *International Journal of Microbiology*, **59**, (2000), pp29-36.
46. **Fields Marion L.**, *Fundamentals of Food Microbiology*, AVI Publishing, USA 1979.
47. **(a) Fleet Graham H.**, "Growth of Yeasts during Wine Fermentation", *J. of Wine Research*, **1**, (1990), pp. 211-219.
48. **(b) Fleet Graham**, "Wine", In *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, Dayle Michael and Larry Beuchat, ASM Press USA 1997.
49. **(c) Fleet Graham H.**, "Microorganisms in Food ecosystems", *Int. Journal of Food Microbiology*, **50**, (1999), pp101-117.
50. **(d) Fleet Graham H.**, "Yeasts grown during fermentation", In *Wine Microbiology and Biotechnology* G.H. Fleet (ed.), USA 1993, Harwood Academic Publishers, pp (27-55).
51. **Fraizer W.C.**, *Food Microbiology*, Mc, Graw Hill, USA 1978.
52. **Freydiere A.M., Guinet R., Boiron P.**, "Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods," *Medical Mycology* **39**, (2001), pp.9-33.

53. **Giraffa Giorgio, Neviani Erasmo**, "DNA-Based culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food associated ecosystems", *Int. Journal of Food Microbiology*, **67**, (2001) pp19-34.
54. (a) **Goffeau A.**, "The yeast Genome Directory", 1997 The yeast genome directory. *Nature* **387** (1997) Suppl., pp 5 -103.
55. (b) **Goffeau A., B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, S. G. Oliver**, "Life with 6000 genes", *Science* **274**, (1996), pp546-567
56. **Goncalves de Lima, Oswaldo**. *EL maguey y el pulque en los códices mexicanos*, Fondo de Cultura económica, México 1956
57. **González Alicia, Valenzuela Lourdes**, *Saccharomyces cerevisiae*, En *Microbios en Línea*, Martínez Romero Esperanza (ED), <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/index.html>.
58. **Granados Sánchez**, *Los Agaves de México*, Universidad Autónoma de Chapingo, México 1993 pp.
59. **Granchi L., M. Bosco, A. Messini and M. Vincenzini.**, "Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR—RFLP analysis of the rDNA ITS region", *Journal of Applied Microbiology* **87** (1999), pp 949-953
60. **Guillamon José Manuel, Sabate Josepa, Barrio Eladio, Cano Joseph, Querol Amparo**, "Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region", *Archives in Microbiology* **169**, (1998), pp. 387-392
61. **Hajsig & Yarrow**, "Candida apicola", *International Journal of systematic Bacteriology*, **28**, (1978) pp611-612
62. **Halffter, G. & Ezcurra, E.**, 1991. ¿Qué es la Biodiversidad?. En: *La Diversidad Biológica de Iberoamérica*. Acta Zoológica Mexicana, G. Halffter compilador, México 1992, CYTED-D, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. pp.3-24
63. **Helms C.**, "Methods: Denaturate Gradient Gel electrophoresis", web report, http://hdklab-wustl.edu/lab_manual/dgge/dgge1.html
64. **Hopple John, Vilgalys Rytas**, "Phylogenetic Relationships in Mushroom Genus Coprinus and Dark-spored Allies Based on Sequence Data from the nuclear gene coding for the large ribosomal subunit RNA: Divergent domains, Outgroups and Monophyly", *Molecular Phylogenetics and Evolution* **13**, (1999) pp. 1-19

65. **Hunter-Cevera, Jennie C.**, "The value of microbial diversity", *Current Opinion in Microbiology*, **1**, (1998), pp- 278-285.
66. **Inácio João**, "In situ Accessibility of *Saccharomyces cerevisiae* 26S rRNA to Cy3-Labeled Oligonucleotides Probes Comprising the D1 and D2 domains" *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (2000) pp3376-3380
67. **INEGI**-Página del Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática INEGI-regiones económicas, ingreso bruto por estados, Oaxaca. www.inegi.gob.mx
68. **James T.C., Campbell S., Donnely D.**, "Transcription profile of brewery yeast under fermentation conditions", *J. of Applied Microbiology*", **94**, (2003), pp. 432-448.
69. **Jespersen Lene, Vand der Aa Kühle, Petrsen Kamila M.**, "Phenotypic and genetic diversity of *Saccharomyces* contaminants isolated from lager breweries and their phylogenetic relationship with brewing yeasts", *International Journal of Food Microbiology*, **60**, (2000) pp 43-55.
70. **Jiménez Antonio & Vasquez David**, "Quantitative binding of antibiotics to Ribosomes from a Yeast Mutant Altered on the peptidyl-transferase center" , *European Journal of Biochemistry*, **54**, (1975), pp. 483-492
71. **King, A. y Dickinson, J.**; Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*», *Yeast*, **16**, (2000) pp. 499-506
72. **Kuhn Eberhardt R., Vickers Allen K.**, "Complete Separation and Quantitation of Fusel Oil by Capillary GC", Agilent Technical paper, USA 2003, www.agilent.com/chem.
73. **(a) Kurtzman Cletus P & Robnett C.J.**, "Phylogenetic relationships among species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces* and *Schizosaccharomyces* determined from partial ribosomal RNA sequences, *Yeast*, **7**, (1991), pp 61-72.
74. **(b) Kurtzman Cletus P.**, "rRNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationship among yeasts", *International Journal of Systematic Bacteriology*, **42** (1992), pp. 1-6
75. **(c) Kurtzman Cletus P. Robnett C.J.**, "Identification of clinically important ascomycetous yeasts and yeast-like fungi based on nucleotide divergence of in the 5' end of the large subunit (26S) ribosomal DNA gene", *Journal of Clinical Microbiology*, **35** (1997), pp1216-1223.
76. **(d) Kurtzman Cletus P., Robnett Christine J.**, "Identification of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences", *Antonie van Leeuwenhoek* **73**, (1998) pp. 331-371

77. (a) **Lachance Marc-André**, "Yeast communities in a natural tequila fermentation", *Antonie van Leeuwenhoek* **73**, (1995) pp. 151-160.
78. (b) **Lachance Marc André**, "The D1/D2 domain of the large-subunit rDNA of the yeast species *Clavispora lusitaniae* is unusually polymorphic" *FEMS Yeast Research*, **4**, (2003) 253-258.
79. **Lafon-Lafourcade, S., Geneix, C. and Ribéreau-Gayon, P.**, "Inhibition of grape must by fatty acids produced by yeast they elimination by yeast ghosts" *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, (1984), pp 1246-1249
80. **Lewin Benjamin**, *Genes VII*, Marbán, España 2001.
81. **Liu S.Q. and G.J. Pilone**. "An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *International J. of Food Science and Technology*", **35**, (2000), 49-61
82. **Lilly M., Lambrechts M.G., Pretorius I.S.**, "Effect of Increased Yeast Alcohol Acetyltransferase Activity on Flavor Profiles of Wine and Distillates", *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (2000) pp 744-753.
83. **Lopandic, K. and H. Prillinger** (2001). "Genotypic identification and phylogenetic characterization of yeasts from Austrian dairy products." ALVA-Tagungsbericht
84. **López Victoria, Querol Amparo, Ramón Daniel, Fernandez Espinar Maria Teresa**, "A simplified procedure to analyze mitochondrial DNA from industrial yeasts", *International Journal of Food Microbiology*, **68**, (2001), pp 75-81
85. **Luna Zamora Roberto**, *La historia del Tequila, de sus regiones y sus hombres*, 2ª ed., Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, México 1991.
86. **Madigan M, Martin J.M., Parker J**, *Brock Biology of Microorganisms* 8th ed., Prentice Hall, USA 2001.
87. **Manjarrez A., Llama M.**, "Cuantificación de los componentes volátiles en tequilas y mezcales por cromatografía de fase vapor", *Revista de las Sociedad Química de México*, **XIII**, (1969) pp. 1A-4A.
88. **Margarida Baleira Couto, Bob Ejisma, Harmen Hofstra, Jos H.J. Huis**, "Evaluation of Molecular Typing Techniques to Assess Genetic Diversity among *Saccharomyces cerevisiae* Strains" , *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, (2000), pp41-46.
89. **Middelhoven W. J.**, "Identification of Yeasts present in Sour fermented food and fodders", In *Food Microbiology protocols*, Spencer John (ed), Humana Press, USA 2001.

90. **Mian M.A., Fleet G.H., Hocking A.D.**, "Effect of diluent's type on viability of yeasts enumerated from foods or pure culture", *International Journal of Food Microbiology* **35**, (1997) pp 103-107
91. **(a) Millán C., Mauricio J.C.; Ortega J.M.**; "Alcohol and aldehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*: specific activity and influence on the production of acetic acid, ethanol and higher alcohols in the first 48hrs of fermentation of grape must", *Microbios* **64**, (1990), pp 93-101.
92. **(b) Millán C., Ortega J.M.**, "Production of Ethanol, Acetaldehyde, and Acetic Acid in Wine by Various Yeast Races: Role of Alcohol and Aldehyde Dehydrogenase" *American Journal of Enology and Viticulture*, **39** (1998), pp107-112.
93. **Milisevic P. B.**, Yeast and Molds, In *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 3th edition, edited by Vanderzan Carl Splittstoesser, DonAmerican, USA 1992 Public Health Association pp239-249S
94. **Mills David A., Johansen Eric A., Cocolin Lucca**, "Yeast Diversity and Persistence in Botrytis Affected Wine Fermentations", *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, (2002) pp 4884-4893
95. **(a) Moncalvo Jean-Marc, Drehmel Dennis, Rytas Vilgalys** "Variation in modes and rates of Evolution in Nuclear and Mitochondrial Ribosomal DNA in the Mushroom Genus *Amanita* (Agaricales, Basidiomycota): Phylogenetic Implications", *Molecular Phylogenetics and Evolution* **16**, (2000) pp. 48-63.
96. **(b) Moncalvo Jean-Marc, Lutzoni Francois M**, "Phylogenetic Relationship of Agaric Fungi Based on Nuclear Large Subunit Ribosomal DNA Sequences", *Syst. Biol.* **49**, (2000) pp. 303-305.
97. **Moore K. J. Johnson M.G.**, "Indigenous Yeast Microflora on Arkansas White Riesling (*Vitis vinifera*) Grapes and in Model Must Systems" *Journal of Food Science*, **53** (1998), pp1725-28.
98. **Moreno-Terrazas R, Lappe-Oliveiras P.E., Vasquez-Juarez R**, "Identification of yeasts isolated from Tepache a traditional fruit fermented beverage", [2001 IFT Annual Meeting - New Orleans, Louisiana](#)
99. **Mortimer, R. , Polsinelli**, "On the origins of wine yeast", *Research in Microbiology*, **150**, (1999) pp 199-204
100. **Myco Bank Yeast**; Searches for: *C. apicola*, *C. intermedia*, *R. mucilaginosa*, *Z. baillii* [http://www.cbs.knaw.nl/yeast/\(kveo4vqdulwhvd55xjnuvsb\)/BioloMICS.aspx](http://www.cbs.knaw.nl/yeast/(kveo4vqdulwhvd55xjnuvsb)/BioloMICS.aspx).
101. **Nadal D, Colomer B, Piña B.**, "Molecular polymorphism distribution in phenotypically distinct populations of wine yeast strains", *Applied and Environmental Microbiology* **62** (1996) pp 1944–1950.

102. **Niness Kathy R.**, "Nutritional and Health Benefits of Inulin and Oligofructose" , American Society for Nutritional Sciences, Supplement, (1999), pp 1402-1404S.
103. **Orberá Ratón Teres**, "Métodos moleculares de Identificación de Levaduras", Revista Iberoamericana de Micológia, **21**, (2004), pp15-19.
104. **Ortega Catalina, López Ricardo, Cacho Juan, Ferreira Vicente**, "Fast analysis of important wine volatile compounds development and validation of a new method based on a gas chromatographic-flame ionization detection analysis of dichloromethane microextracts"; Journal of Chromatography **923**(2001) pp 205-214
105. **Pallman C., Brown B.J., Olineka L.T., Cocolin L.**, "Use of WL medium to profile native flora fermentations" , . American Journal of Viticulture and Enology, **52**, (2001), pp198-203.
106. **Patel Sangeeta, Shibamoto Takayuki**, "Effect of 20 Different yeast strains on the production of volatile components in Symphony wine" , Journal of Food Composition and Analysis, **16**, (2003), pp469-476
107. **Penn Charles**, *Handling Laboratory microorganisms*, Open University Press, USA 1991
108. **Perbal Bernard**, *A practical Guide to Molecular Cloning*, USA (1984) Ed. John Wiley & Sons.
109. **Pinal Leticia, Cedeño Miguel, Gutierrez Humberto**, "Fermentation parameters influencing higher alcohols production in the tequila process", Biotechnology Letters **19**, (1997), pp45-47.
110. **Plata C., Mauricio J.C., Millan C., Ortega J.M.**, "Influence of glucose and oxygen on the production of ethyl acetate and isoamyl acetate by *Saccharomyces* strain during alcoholic fermentation", World Journal of Microbiology and Biotechnology **21** (2005), pp. 115-121
111. **Pescott Lansing M., Harley John P., Klein Donald A.**, Microbiology 5th edition, Mc Graw Hill, USA 2000.
112. **Pretorius I. S.**, "The tailoring of designer grapevines and wine yeasts for a Market-directed and quality focused wine industry Yeast", **16** (2000) pp. 675-729
113. **Querol A., Barrio Eladio**, "A comparative study of different methods of yeast strain characterization" Syst. Appl. Microbiol. **15**, (1992), pp 439-446.
114. **Raspor P., S. Smole Mozina, N. Cadez**, "Identification of yeast from grape/must/wine system", Food Microbiology Protocols In Methods in Biotechnology, Vol 14, J.F.T. Spencer A.L. Rogout de Spencer (eds.) Humana Press, Canada 2001.
115. **Reader U., Broda P.**, "Rapid Preparation of DNA from filamentous fungi", Letters in Applied Microbiology **1** (1985) pp 17-20.

116. **Reysenbach Anna-Lousie, Giver Lori J., Wickham Gene S.**, "Differential Amplification of rRNA genes by Polymerase Chain Reaction", *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, (1992) pp3417-3418
117. **(a) Romano P., Suzzi G., Comi G., Zironi R.**, "Acetaldehyde production in *Saccharomyces* wine yeasts", *FEMS Microbiology Letters*, **118**, (1994), pp213-218
118. **(b) Romano Patricia & Marchese Rosella**, "Metabolic characterization of *Kloeckera apiculata* strains from star fruit fermentation", *Antonie van Leeuwenhoek* **73**, (1998) pp. 321-325.
119. **(c) Romano P., Fiore C., Paraggio M., Carusso M., Capece A.**, "Function of yeast species and strains in wine flavor", *International Journal of Food Microbiology*, **86**, (2003), pp169-180.
120. **Rossen Lones, Norskov Pernille, Holmstron K.**, "Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA extraction solutions", *International Journal of Food Microbiology*, **17**, (1992) 37-47
121. **Sabate Josepa, Cano José, Esteve-Zarzoso Braulio, Guillamón José Manuel**, "Isolation and Identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes", *Microbiological Research* **157**, (2002) pp267-275.
122. **Sablayrolles J.M., Ball C.B.**, "Fermentation Kinetics and the production of volatiles during alcoholic fermentation", *Journal of American Society of Brewing Chemistry* **53**, (1995), pp 71-78
123. **Salo S. & Wirtanen G.**, "Disinfectant Efficacy on Food borne Spoilage Yeast Strains", *Food and Bioproducts Processing*, **83**, (2005), pp 288-296
124. **(a) Sánchez Marroquín**, *Los Agaves de México en la industria alimentaria*, Centro de Estudios Económicos y Sociales del Tercer Mundo, 1979.
125. **(b) Sánchez-Marroquín, A.**, "Nuevos datos acerca de la microbiología del pulque". - *Memoria y Revista de la Academia Nacional de Ciencias* **56** (1949), pp. 505-517.
126. **Scott J.A., Strauss N.A.**, A review of current methods in DNA fingerprinting, In *Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Apergillus* classification*. R.A. Samson & J.A. Pitt (eds) Harwood Academic Publishers, Netherlands 2000.
127. **Sherman Fred**, An Introduction to the Genetics and Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast genetics*. In *The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine*, VCH Pub, Germany (1997).
128. **Smith A. D., Datta S. P., Smith Howard G., Bentley R., Mckenzie A.H.** (editors), *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*, USA 1997

129. **Smit E, Leeflang P, Wernars K.**, "Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis", *FEMS Microbiology Letters*, **23**, (1997) pp.249-261
130. **Steinkraus Keith H., Microbes, Food and Man**, En *Alimentos Fermentados Indígenas de México*, Wachter Ma. Del Carmen, Lappe Patricia, Universidad Nacional Autónoma de México, México (1993)
131. **Stewart Robert, Tompkins Thomas A., Savard Louise, Russell Inge, Terrance M.**, "RAPD Characterization of Brewery Yeast and Beer spoilage Bacteria", *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **54**, (1996) pp 91-96
132. **Tibor Deak**, *Handbook of Food Spoilage Yeasts*, USA 1996, CRC Press.
133. **Sojilida, Ogury Toyoko, Okozumini Katsuko**, "Genetic Diversity of the internal transcribed space (ITS) and 5,8 S rRNA among the clinical isolates of *Candida parapsilosis* in Brazil and Japan", *Journal of Japanese Medical Mycology* **46**, (2005) pp133-137
134. **Terence Marsh L., Saxman Paul, Cole James**, "Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Program, a Web Based Research Tool for microbial Community Analysis", *Applied and Environmental Microbiology* **66**, (2000) pp3616-3620
135. **Torija María de Jesús, Rozés Nicolas, Poblet Montse, Guillamon José Manuel**, "Yeast population dynamics in spontaneous fermentations", *Antonie Van Leeuwenhoek* **79**, (2001), pp345-352.
136. **Van der Aa Külhe Alis, Jespersen, Glover Richard L.K., Diawara Bréhima**, "Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from West African sorghum beer", *Yeast* **18** (2001), pp1069-107
137. **Van Zyl J.A. & du Plessis L. de W.**, " The microbiology of South African winemaking Part1, The yeasts occurring in vineyards, musts and wines. *South African Journal of Agricultural Science*, **4**, (1961), pp393-395.
138. **Versabaud A., Corocux P., Roulland C.**, " Genetic Diversity and Geographical Distribution of wild *S. cerevisiae* strains from the wine producing area of Charentes, France.", *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, (1995), pp3521-3529.
139. **Verstrepen Kevin J., Stijin D.M., Van Laere D.M., Bart M.P., Vanderhaegen**, "Expression Levels of The Yeast Alcohol Acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a Broad Range of Volatile Esters", *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, (2003), pp5228-5237.
140. **Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M.**: "AFLP: A new technique for DNA fingerprinting", *Nucleic Acids Research* (1995), **23**:4407-4414.

141. **Wacher Ma. Del Carmen, Lappe Patricia**, Alimentos Fermentados Tradicionales de México, Universidad Nacional Autónoma de México, México (1993)
142. **Wadlin J K, Hanko G, Stewart R, Pape J, Nachamkin I.**, "Comparison of three commercial systems for identification of yeasts commonly isolated in the clinical microbiology laboratory.", *Journal of Clinical Microbiology* (1999);**37**:1967–1970.
143. **Wang X. D., Bohlscheid J.C., Edwards C.G.**, "Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid" *J. Applied Microbiology* **94**, (2003) pp. 349-359
144. **Wheeler R. T., Kupiec M.n Magnelli P., Abeijon C., Fink G.R.**, " A *Saccharomyces cerevisiae* mutante with increased virulence", *Proced. Nat, Acad. Science* **5**, (2003) pp.2766-2770
145. **White T.J., Burns T., Taylor J.**, Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics, In Innis MA., In *PCR Protocols* Gelfand DH., Sninsky J , White T.J., (eds), USA 1990, Academic Press, pp315-322.
146. **Wilson Ian G.**, "Problems with the Polymerase Chain Reaction", In *Food Microbiology Protocols*, Spencer F.T., Ragout de Spencer Alicia, USA 2001, Ed. Humana Press.
147. **Xin Jia Ying, Cui Jun-Ru, Niu Jian.zhong, Shao feng Hua**, "Biosynthesis of Methanol from CO and CH by Methanotrophic Bacteria", *Biotechnology*, **3** (2004), pp 67-71.
148. **Xufre Angela, Simoes Fernanda, Girio Francisco, Clemente Alda**, "Use of RAPD Analysis for Differentiation among six Enological *Saccharomyces* Spp. Strains", *Food Technology and Biotechnology*, **38**, (2000), pp53-58.
149. **.Zhore D.E., Erten H.**, "The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation", *Process Biotechnology*, **38**, (2002), pp. 319-324.