



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL Y COMPUESTOS
CONGENÉRICOS EN MOSTOS DE *Agave potatorum* UTILIZANDO
LEVADURAS AISLADAS DE FERMENTACIONES DE MEZCAL**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA
DIANA CECILIA ESPINOSA MENDOZA**



MÉXICO, D.F.

2013



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: GRANADA MACÍAS MARÍA DEL PILAR**

VOCAL: **Profesor: RUÍZ TERÁN FRANCISCO**

SECRETARIO: **Profesor: QUIRASCO BARUCH MARICARMEN**

1er. SUPLENTE: **Profesor: RUÍZ VILLAFÁN BEATRIZ**

2º SUPLENTE: **Profesor: CALDERÓN VILLAGÓMEZ HILDA ELIZABETH**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: FACULTAD DE QUÍMICA. CONJUNTO E. EDIFICIO DE ALIMENTOS Y QUÍMICA AMBIENTAL. LABORATORIO 321.

ASESOR DEL TEMA:

DR. FRANCISCO RUÍZ TERÁN

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. HILDA ELIZABETH CALDERÓN VILLAGÓMEZ

SUSTENTANTE:

DIANA CECILIA ESPINOSA MENDOZA

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por ser mi *alma mater* y representar para mí, y para muchos otros jóvenes del país, la ventana al saber y al conocimiento que me permitió acceder a las cúpulas más elevadas del pensamiento crítico del país. Para la UNAM mi eterno agradecimiento.

En segundo lugar a la Facultad de Química, por todas las enseñanzas y los grandes momentos que encontré en sus aulas. A los Profesores que con tanto ahínco y dedicación imparten sus cátedras para beneficio de los alumnos. A todo el saber encerrado en su biblioteca, a todos esos grandes momentos de conocimiento en los laboratorios y los momentos de recreo en sus jardines, un millón de gracias.

A continuación me gustaría agradecer a cuatro personas que han tenido un impacto sobresaliente en mi vida. A mis padres, Martha y José Luis, por todos estos años de apoyo, amor, cuidados, disciplina y dedicación. Es gracias a su apoyo incondicional que he logrado llegar hasta el día de hoy, no me alcanzarían las palabras para expresar mi infinito amor y agradecimiento a ustedes. A mis hermanos, Helena y José Luis, que han sido mis compañeros de juegos y aventuras durante toda mi vida. A ustedes cuatro les agradezco de manera infinita.

Por supuesto es necesario mencionar a todos mis amigos y compañeros de carrera que estuvieron en cada uno de los pasos de esta gran aventura que fue la carrera de Química de Alimentos. A Hasibi, Guadalupe, Belén, Mariana Bolívar, Rosario, David, Alejandro Domínguez, Andrea, Alejandro Cortés, Mariana Domínguez, Stefania, Irma y Berenice; amigos que por siempre tendrán un lugar especial en mi corazón y por supuesto un muy especial agradecimiento.

A su vez también me gustaría hacer una mención muy especial para el Dr. Francisco Ruíz Terán (Pancho), mi asesor de proyecto de tesis, quien con gran diligencia, paciencia, dedicación y buen humor me guió durante este proceso. Siempre listo y dispuesto a ayudar a sus tesisas, Pancho demostró ser un magnífico asesor de tesis por lo que me gustaría dedicarle un agradecimiento muy particular con estas líneas.

Del mismo modo quiero agradecer a la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch y a la Profa. María del Pilar Granada Macías por sus muy valiosas aportaciones a la realización de esta tesis. Por todos sus consejos, su paciencia y todo el tiempo dedicado a la mejora de este texto.

Igualmente es necesario mencionar al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) y al Programa Nacional de Becas y Financiamiento (PRONABES). Es gracias a su apoyo que muchos estudiantes tenemos la oportunidad de continuar nuestros estudios y proyectos de tesis. Como una estudiante que ha sido beneficiada por estos programas de apoyo quisiera manifestar mi profundo agradecimiento.

Me gustaría agradecer también a la Dra. Hilda Calderón y al Dr. Arturo Navarro por toda su ayuda y paciencia para enseñarme a utilizar los equipos del laboratorio, por atender a mis seminarios y expresar sus ideas al respecto de manera constructiva.

No pueden faltar en este agradecimiento Jorge, Marcos, MaFer, Marlen y Hasibi quienes hicieron del tiempo de experimentación en el laboratorio un momento muy divertido y enriquecedor.

A todos ustedes muchas gracias.

**“Sólo aquellos que se arriesgan a ir muy lejos,
pueden llegar a saber lo lejos que pueden ir”
(T.S. Elliot)**

Índice

Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes.....	4
Bebidas y Alimentos Fermentados	4
El Mezcal y su Proceso de Elaboración.....	6
Factores que Afectan el Sabor y Aroma del Mezcal.....	10
Las Levaduras y su Importancia	12
Fermentación Alcohólica	15
Métodos Moleculares de Identificación de Levaduras.....	18
Métodos para la identificación de levaduras a nivel de especie	21
Análisis de las regiones ribosomales	21
Secuenciación de regiones ribosomales	22
Análisis de restricción de regiones ribosomales.....	23
Polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción (RFLP).....	23
Análisis de restricción del gen MET2	23
PCR-Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)	24
PCR-Tiempo real.....	24
Métodos para la identificación de levaduras a nivel de cepa	25
Métodos basados en la técnica de PCR.....	25
RAPD (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico).....	25
Microsatélites y minisatélites	26
<i>Análisis de los elementos δ</i>	26
<i>Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)</i>	27
<i>Análisis de restricción del ADN mitocondrial</i>	27
<i>Electroforesis en campo pulsado (PFGE)</i>	28
Fundamentos Analíticos	30
Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	30
Componentes básicos del sistema HPLC	31
Fundamentos teóricos	33
Cromatografía de gases.....	34

Componentes básicos de un cromatógrafo de gases	34
Hipótesis	36
Objetivo	36
Objetivo general.....	36
Objetivos particulares	36
Metodología	37
Preparación de los mostos para las fermentaciones.....	38
Hidrólisis del tallo de <i>Agave potatorum</i>	38
Preparación del mosto.....	38
Preparación de las cepas de levaduras para su inoculación en los tubos de fermentación.....	38
Procedencia de las cepas empleadas en las fermentaciones de los mostos de <i>Agave potatorum</i>	38
Preparación de los inóculos para su empleo en mostos de <i>Agave potatorum</i>	39
Muestreo de las fermentaciones	40
Determinación de concentración de sólidos solubles (°Brix), pH y células en cada muestra	41
Determinación de azúcares y ácidos orgánicos empleando HPLC	42
Determinación de etanol y compuestos congénicos empleando el cromatógrafo de gases.....	42
Identificación de las cepas de las levaduras aisladas	42
Análisis estadístico.....	45
Resultados y Discusión.....	46
Identificación a nivel de especie de las cepas de las levaduras aisladas	46
Análisis del consumo y producción de compuestos durante las fermentaciones	48
Fermentación realizada con la cepa DI-14 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	49
Fermentación realizada con la cepa JA-10 (<i>Issatchenkia orientalis</i>).....	53
Fermentación realizada con la cepa JG-19 (<i>Pichia manshurica</i>)	57
Fermentación realizada con las cepas DI-14 y JG-19 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Pichia manshurica</i>).....	61
Fermentación realizada con las cepas DI-14 y JA-10 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Issatchenkia orientalis</i>).....	65
Fermentación realizada con las cepas JA-10 y JG-19 (<i>Issatchenkia orientalis</i> y <i>Pichia manshurica</i>).....	69

Fermentación realizada con las cepas DI-14, JA-10 y JG-19 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> y <i>Pichia manshurica</i>)	73
Conclusiones	78
Bibliografía.....	79

Resumen

En el presente estudio se realizaron ensayos, en el laboratorio, de fermentaciones dirigidas en mostos de *Agave potatorum* para analizar el aporte de alcohol etílico y compuestos congénicos así como el consumo de glucosa, fructosa y sacarosa por parte de tres diferentes cepas de levaduras aisladas previamente de mostos de agave en la elaboración de mezcal.

Para la realización de este proyecto en primera instancia se identificaron tres cepas de levaduras empleando el método PCR-RFLP en las regiones ITS1-5.8-ITS2. Estas cepas forman parte de un grupo de levaduras que fueron previamente aisladas de diferentes casas productoras de mezcal en el Estado de Oaxaca. Estas cepas fueron agrupadas con base en los resultados obtenidos del PCR-RFLP del gen 26S, específicamente de las regiones D1 y D2 de los mismos. A partir de estos agrupamientos han sido seleccionadas para este estudio tres cepas debido a la alta frecuencia con la que se encontraron entre estos conjuntos aislados. Las cepas seleccionadas posteriormente se emplearon para la fermentación de mostos hechos a partir de *Agave potatorum*, también conocido como Tobalá, proveniente del Estado de Oaxaca. Estos mostos fueron elaborados a partir de un ejemplar de *Agave potatorum* fresco que fue troceado e introducido al autoclave por 3 horas a 121°C, posteriormente los trozos de agave fueron introducidos a un extractor de jugos para obtener el mosto y el bagazo del agave los cuales fueron empleados para obtener los mostos de fermentación. Una vez concluidas las fermentaciones se determinaron las concentraciones de azúcares y ácidos orgánicos empleando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución, evaluando el consumo de azúcares y producción de ácidos orgánicos de cada una de las levaduras empleadas. A su vez se empleó un cromatógrafo de gases para evaluar la producción de etanol y demás compuestos congénicos. Nos interesa conocer la contribución individual de cada cepa tanto en el consumo de azúcares del mosto como en la producción de etanol y compuestos congénicos.

Introducción

El mezcal es una bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de los agaves previamente hidrolizadas o cocidas y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, siendo susceptible de ser enriquecido con hasta en 20% de otros carbohidratos en su preparación (NOM-070-SCFI-1994).

La palabra mezcal proviene del náhuatl *mexcalli* que a su vez se divide en *metl* “maguey” e *ixcalli* “cocido”, “pencas de maguey cocidas”. El mezcal es una bebida popular de México, es un licor destilado de la fermentación de tallos cocidos de ciertos agaves silvestres y cultivados nativos de las regiones áridas y semiáridas de México (Granados Sánchez, 1993). El mezcal es un líquido de aroma y sabor *sui generis* de acuerdo a su tipo. Es incoloro o ligeramente amarillento cuando es reposado o añejado en recipientes de madera de roble blanco o encino, o cuando se aboque sin reposarlo o añejarlo.

De acuerdo con la Denominación de Origen Mezcal esta bebida se puede producir únicamente en los estados de Oaxaca, Guerrero, Durango, San Luis Potosí y Zacatecas (IMPI-Denominación de origen Mezcal). Sin embargo, el estado de Oaxaca es el estado en el que se encuentran la mayoría de los productores y personas que dependen económicamente de esta actividad. Siendo, en este estado, la industria del mezcal la principal debido a la cantidad de empleos y de divisas que genera a través de las exportaciones a algunos países de América, Europa y Asia.

A pesar de la importancia de la industria del mezcal en México su proceso de elaboración sigue siendo muy rudimentario teniendo una etapa de fermentación poco controlada en la que participan distintos microorganismos que no han sido propiamente identificados. Del mismo modo, no se encuentran reportes en la bibliografía en los que analicen a los microorganismos encontrados en las fermentaciones de mezcal por separado para conocer su comportamiento durante este proceso y que muestren cuáles son los compuestos generados durante la

fermentación del mezcal que le dan sabor y aroma (compuestos congénicos) relacionándolos con su influencia en la calidad de la bebida.

Las levaduras juegan un papel muy importante durante la fermentación de los mostos de *Agave* ya que éstas son las responsables de la producción de etanol y compuestos congénicos que otorgan una parte del sabor y aroma característicos al mezcal (Lappe *et al.*, 2008). A lo largo de la fermentación ocurre una rápida sucesión de varias especies de levaduras; esto es, mientras se incrementa la concentración de etanol las levaduras no-*Saccharomyces*, poco resistentes a estas condiciones, limitan su actividad metabólica y crecimiento; por el contrario las levaduras más resistentes al etanol mantienen su actividad metabólica y su crecimiento, convirtiéndose en las especies dominantes. Se ha observado que la levadura predominante en los procesos de fermentación es *S. cerevisiae* (Fleet, 2008).

La identificación de las levaduras presentes durante la fermentación del mezcal puede llevarse a cabo empleando métodos basados en sus características morfológicas y fisiológicas. Sin embargo, estos métodos requieren de mucho tiempo, recursos y experiencia y no se puede asegurar una buena identificación. Una alternativa al uso de estos métodos son las técnicas moleculares. Entre estos métodos moleculares se encuentra el análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). El RFLP de un producto de amplificación por PCR de la región comprendida por los espaciadores internos transcritos (ITS1, ITS2) es utilizado para la identificación de levaduras en general y ha sido 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).

Antecedentes

Bebidas y Alimentos Fermentados

La fermentación es un proceso de obtención de energía proveniente de la oxidación de compuestos orgánicos, como los carbohidratos, en el que se emplea un aceptor de electrones endógeno que es usualmente un compuesto orgánico. Al compararlo con la respiración aerobia vemos que en ésta los electrones son donados a un aceptor de electrones exógeno que es el oxígeno vía la cadena de transporte de electrones. La fermentación usualmente se da en condiciones anaerobias en las que no existe el proceso de fosforilación oxidativa para mantener la producción de ATP (adenosin trifosfato) por medio de la glucólisis. Por lo que en una fermentación el piruvato se metaboliza en ácido láctico, en fermentaciones homolácticas; etanol y dióxido de carbono en fermentaciones alcohólicas; y ácido láctico, así como otros ácidos y alcoholes en las fermentaciones heterolácticas. Las fermentaciones no necesariamente se llevan a cabo en medios anaerobios, sin embargo, algunas levaduras prefieren obtener energía mediante la fermentación a llevar a cabo fosforilación oxidativa, siempre que haya azúcares disponibles en el medio para su consumo. Los hidratos de carbono son el sustrato más común para llevar a cabo fermentaciones siendo el etanol, ácido láctico, lactato y dióxido de carbono los productos más comunes de éstas. Sin embargo la fermentación como tal puede también llevarse a cabo a partir de ácidos grasos, aminoácidos y bases nitrogenadas (Castillo *et al.*, 2005).

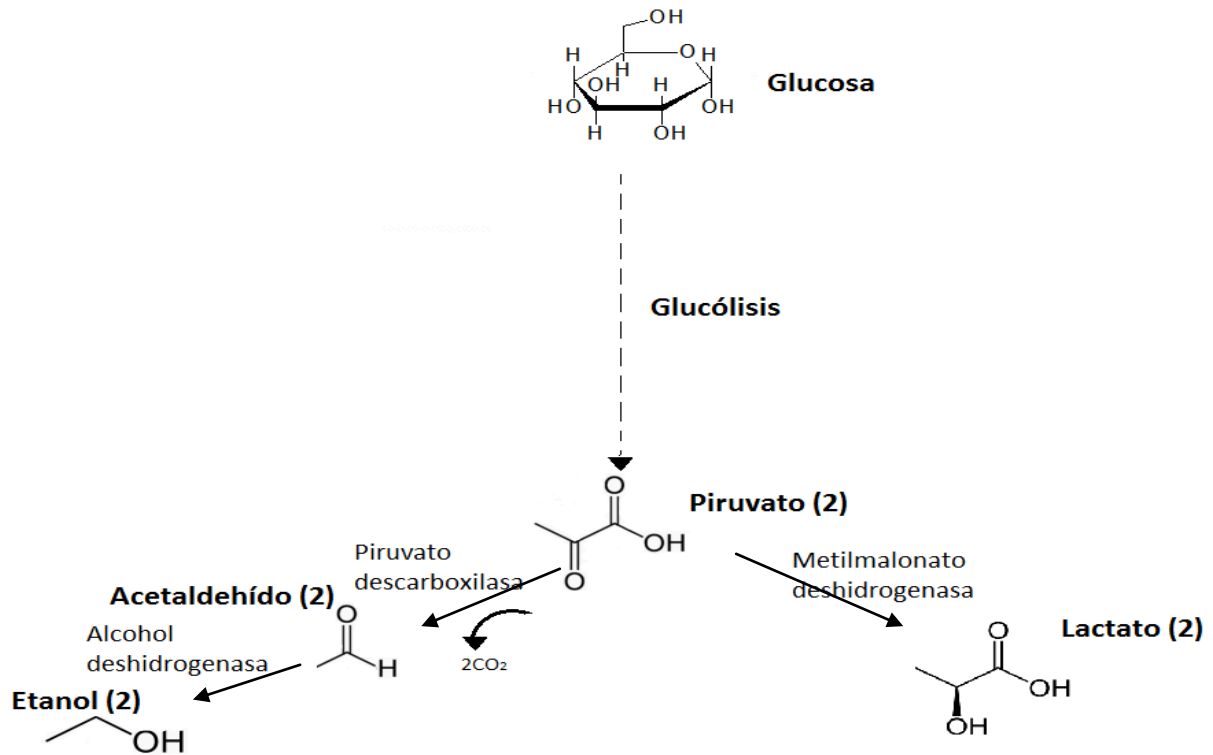


Figura 1. Representación esquemática de la fermentación alcohólica y ácido láctica.

Un alimento o bebida fermentada es por tanto aquel en el que sus componentes originales han sido modificados por la acción de uno o varios microorganismos. Por lo que al final de su procesamiento cuenta con características distintas al alimento original tales como aromas y sabores que son agradables.

El proceso de elaboración de alimentos fermentados es uno de los conocimientos más antiguos de la humanidad. Alrededor del mundo se consumen alimentos y/o bebidas fermentadas de muchos tipos, ejemplos de ello son: el vino, la cerveza, el sake, el vodka, la sidra, el vinagre, las aceitunas, el pan hecho con levadura, los quesos, el yogur, el jocoque, fermentados del soya como el miso, la salsa de soya, cárnicos fermentados como el salami, chorizo, pepperoni, entre muchos otros.

En particular en México existe una gran variedad de bebidas y alimentos fermentados tradicionales que se consumen actualmente. Se elaboran a partir de frutas, plantas y granos diversos. Entre ellos se encuentran el pozol que se prepara a partir del maíz, el pulque elaborado con aguamiel que es la savia azucarada de ciertos magueyes, tepache cuya materia prima es fruta, el tequila,

mezcal, bacanora y sotol que se elabora con diferentes variedades de Agave, el tesgüino cuya variedad más común se prepara empleando maíz al igual que el tejuino, la tuba preparado con la savia de la palma de coco, el colonche hecho a partir de tunas, el tejate hecho con maíz y cacao, entre muchos otros (Andrade, 2006).

El Mezcal y su Proceso de Elaboración

Mezcal es el nombre que comúnmente se ha dado desde hace al menos 400 años a las bebidas elaboradas por medio de la destilación de los mostos fermentados de las piñas o cabezas cocidas de maguey o Agave (Illsley *et al*, 2012). Desde tiempos prehispánicos se ha empleado el maguey para elaborar alimentos, fibras para la elaboración de textiles y bebidas de bajo contenido alcohólico y debido a todas estas aplicaciones se le denominó Agave que viene del griego *Agavos* “noble” o “admirable”. Se cree que a la llegada de los españoles a México se comenzó a producir lo que conocemos ahora como mezcal gracias a que introdujeron el proceso de destilación y se pudo producir una bebida con mayor contenido alcohólico (Côté *et al.*, 2003).

Los agaves son plantas perennes, con hojas dispuestas en espiral y arregladas en rosetas en el ápice de un tallo. Este tallo puede ser corto y sobrepasar unos pocos centímetros del suelo o puede ser largo y erecto llegando a medir, en algunos casos, hasta tres metros de altura. Las hojas por lo general son fibrosas, suculentas, con la base dilatada y carnosas; su forma varía de lineal a ovalada. El número de hojas varía de 5 a 10 en *Agave gypsophila* y *Agave nizandensis*, hasta de 150 a 200 en *Agave rhodacantha* (García-Mendoza, 2007).

De un total aproximado de 200 especies, México tiene 150, con 119 especies endémicas. El género *Agave* es un grupo muy diverso que se distribuye en Norte, Centro y Sudamérica, con mayor presencia en México, convirtiéndolo en centro de origen y diversificación del grupo (García-Mendoza, 2007). La especie de Agave que se utilizó en este estudio es *Agave potatorum*. Este maguey crece de manera

silvestre desde la zona sur del estado de Puebla hasta el estado de Oaxaca y Chiapas. *A. potatorum* es un Agave pequeño que crece como una roseta basal con 30-80 hojas de color verde pálido de aproximadamente 30cm de longitud cuyos bordes tienen espinas cortas de color negro-rojizo. *Agave potatorum* es una especie de reproducción exclusivamente sexual ampliamente utilizada en la elaboración de mezcal en los estados de Guerrero y Oaxaca (Scheinvar, 2008).

Actualmente la producción de mezcal está regulada por la NOM-070-SCFI-1994 en la que se especifica que las especies de agave permitidas para la elaboración del mezcal son las siguientes: *Agave Angustifolia Haw* (maguey espadín), *Agave Esperrima jacobi*, *Agave Weberi cela*, *Agave Potatorum zucc*, *Agave Salmiana Otto Ex Salm SSP Crassispina (Trel) Gentry* (maguey verde o mezcalero) y otras especies de agave, siempre y cuando no sean utilizadas como materia prima para otras bebidas con denominaciones de origen dentro del mismo estado productor.

De acuerdo con la Denominación de Origen Mezcal esta bebida se puede producir únicamente en los estados de Oaxaca, Guerrero, Durango, San Luis Potosí, Zacatecas, 11 municipios en Tamaulipas y un ejido en Guanajuato (IMPI-Denominación de origen Mezcal). Sin embargo el estado de Oaxaca es el principal productor de esta bebida a nivel nacional participando con el 65% de su producción. La producción anual de mezcal es de 6 millones de litros con valor de 180 millones de pesos. El mezcal se exporta principalmente a Estados Unidos, Japón, Taiwán, Italia, Holanda, España, Francia, Alemania y Canadá (Secretaría de Economía, México, 2010; Notimex, 2012).

En general la producción de mezcal es el resultado de conocimientos transmitidos de generación en generación. Los mezcaleros o mezcalilleros, también llamados palenqueros, ya que a la destilería se le conoce en Oaxaca como palenque, han incorporado nuevos elementos para mejorar la elaboración del destilado de Agave; sin embargo, esencialmente se sigue conservando el sistema aprendido siglos atrás.

La elaboración del mezcal inicia con el conocimiento de la planta en las áreas de recolección o las áreas de cultivo. El maguey requiere de poco trabajo para su

crecimiento hasta el momento de la cosecha. En los primeros 9 años el maguey pasa por varias etapas de crecimiento hasta que inicia el proceso de maduración indicado con la presencia del calehual o quiote el cual es cortado.

A los magueyes maduros se les cortan las hojas y se rasuran hasta dejar limpias las piñas. Éstas se colocan en hornos rústicos excavados en la tierra y operados con leña y piedras que permanecen incandescentes. El objetivo de la cocción de las piñas es la hidrólisis de los azúcares complejos contenidos en las mismas para obtener azúcares sencillos que puedan ser fermentados más adelante.

Posteriormente el material cocido se martaja en pozas forradas de madera o muele empleado molinos de martillos, molinos circulares de piedras o con herramientas de impacto. Una vez hecho esto se coloca el mosto en barricas o tinajas de fermentación hechas de madera, piedra, barro u otros materiales. El proceso de fermentación dura de 11 a 30 días y una vez completado el producto es vertido en el alambique u olla de destilación. Durante la destilación se separan la cabeza de destilación que tiene un alto contenido alcohólico (80% v/v) y la cola de destilación que tiene un contenido alcohólico de 30%v/v aproximadamente, la cual, por lo general, se somete a un proceso de refinado (Sagarpa, 2005).

Generalmente se lleva a cabo una segunda destilación, también llamada refinado o rectificando, en esta se utiliza la cola de la destilación anterior. Con ello se obtiene un producto con mayor grado de pureza. Y se realiza un ajuste del grado alcohólico para obtener mezcales con contenido alcohólico entre 45 y 75% (v/v). Se mezcla con las puntas y las colas de destilación y se va verificando el perlado, aroma y sabor para asegurar su calidad.

De acuerdo con la cantidad de carbohidratos provenientes del agave que se empleen en la elaboración del mezcal este se clasifica en dos tipos:

- Mezcal 100% agave (Tipo I): Es el producto obtenido de la destilación y rectificación de mostos elaborados directa y originalmente con los azúcares de las cabezas maduras de agave previamente hidrolizadas y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no.

- Mezcal (Tipo II): Es el producto obtenido de la destilación y rectificación de mostos en cuya formulación se han añadido hasta un 20% de otros carbohidratos , siempre y cuando no se eliminen los componentes que le dan las características a este producto, no permitiéndose las mezclas en frío.
(NOM-070-SCFI-1994).

Ambos tipos de mezcal pueden clasificarse según las siguientes categorías:

- Mezcal joven: Mezcal obtenido directa y originalmente con los azúcares extraídos de los agaves
- Mezcal reposado: Es aquel que se deja por lo menos 2 meses en recipientes de madera de roble blanco o encino, para su estabilización y es susceptible de ser abocado.
- Mezcal añejo: Éste ha sido sujeto a un proceso de maduración de por lo menos un año en recipientes de madera de roble blanco o encino, cada una con capacidad máxima de 200 litros y es susceptible de ser abocado.
- Mezcal de pechuga: Es aquel que en la etapa de fermentación, se le adicionan frutas: ciruela pasa, piña, chabacano y manzana; razón por la cual el mosto resultante, después de la destilación, confiere al mezcal de pechuga su sabor dulce y afrutado.

El abocado es un procedimiento llevado a cabo con el fin de suavizar el sabor del mezcal, mediante la adición de uno o más productos naturales, saborizantes o colorantes permitidos en las disposiciones legales correspondientes (NOM-070-SCFI-1994).

El mezcal se diferencia del tequila en cuanto a que el proceso de este último está totalmente industrializado y adaptado a estándares de calidad internacionales. Además para la elaboración de tequila se emplea únicamente *Agave tequilana* Weber variedad azul comúnmente conocido como Agave azul mientras que el mezcal sólo se puede elaborar con las especies de *Agave* especificadas por la NOM-070, mencionadas anteriormente. Otra diferencia radica en que el proceso

de fermentación y destilación del mezcal se lleva a cabo incluyendo el bagazo del *Agave* mientras que para la fabricación de tequila éste no se incluye.

Factores que Afectan el Sabor y Aroma del Mezcal

Los múltiples sabores y aromas del mezcal están determinados por varios aspectos: el tipo y procedencia del maguey usado, además del entorno ecológico donde creció así como las prácticas de cultivo y cosecha de la planta; las prácticas culturales y tecnológicas empleadas en su elaboración incluyendo la microbiota presente en la fermentación; el proceso de destilación al igual que el de añejamiento; así como el gusto histórico de la región donde se elaboró y del maestro mezcalillero que lo procesó.

Los sabores y aromas que resultan de la fermentación varían si se realiza en tinajas de madera, ollas de barro, oquedades en la roca madre o en cueros de res; pero también influyen los microorganismos que la producen, que pueden variar en cada región. En la destilación, el sabor y aroma dependen del tipo de destilador empleado —ollas de barro, de cobre, de cobre con madera o cobre con barrica— y el número de destilaciones realizadas. Pero también de la forma tradicional de ajuste o no de la riqueza alcohólica; esto es, si se hace con puntas y colas, con puntas y agua o con alguna otra combinación de las acostumbradas en las distintas zonas mezcaleras. Por último, cada demarcación tiene su propio gusto histórico, y es éste, por obra del maestro mezcalero, el que en última instancia determina el sabor y aroma de cada mezcal y establece las normas tradicionales, social e históricamente construidas, de control de la calidad del mismo (Pérez, 2007).

Las características principales de los diferentes agaves empleados como materia prima para la elaboración de mezcal involucran principalmente a la presencia de fructanos (fructanos altamente ramificados y neo-fructanos) (Mancilla-Margalli, López., 2006). Éstos son utilizados por la planta como sustancias de reserva; y la presencia de algunos compuestos como terpenos también contribuyen al sabor del producto final.

En el mezcal el alcohol influye de manera importante sobre su sabor y aroma; sin embargo, otros compuestos orgánicos presentes, en cantidades mucho menores, son también responsables de esos atributos y contribuyen en gran parte a caracterizar esta bebida. Estos compuestos se denominan congenéricos y pueden ser alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, ésteres y sustancias con azufre. Algunos congenéricos provienen del sustrato o materia prima inicial, otros son producidos por los microorganismos fermentadores. Los factores que intervienen en el tipo y concentración de compuestos congenéricos existentes en una bebida alcohólica son el tipo de microorganismos de fermentación empleados, la temperatura de fermentación, la concentración del oxígeno en el medio, la naturaleza y la concentración de los azúcares fermentables, de los aminoácidos y de las vitaminas presentes así como las operaciones posteriores a la fermentación alcohólica (añejamiento y destilación) afectan considerablemente las concentraciones de los compuestos congenéricos (Hernández *et al.*, 2003).

Se estima que existen más de 200 compuestos diferentes en el mezcal que contribuyen a la complejidad de aromas y sabores característicos de esta bebida (Manjarrez & Llama, 1969). Dentro de éstos se encuentran alcoholes superiores, acetato de etilo, acetaldehído, ácidos orgánicos, ésteres, etanol y metanol. Este último afecta de manera considerable al producto final ya que si excede 3g/L permitido por la norma vuelve al mezcal no apto para su comercialización. De igual manera el producto final no debe de exceder 4g/L de alcoholes superiores.

Durante el proceso de producción del mezcal ocurre una fermentación compleja donde participan poblaciones mixtas de bacterias (lácticas y acéticas) y levaduras (*no-Saccharomyces* y *Saccharomyces*). Esta microbiota es la responsable de la presencia de la mayoría de los compuestos químicos y volátiles que confieren las características sensoriales del producto final (Lappe *et al.*, 2008).

Tabla 1. Características generales del mezcal (Lappe *et al.*, 2008; Cova, 2010).

B. Mezcal	
Tipo de bebida	Destilada
Especie de Agave / Estado de producción	<i>A. salmiana</i> San Luis Potosí <i>A. cupreata</i> Michoacán <i>A. inaeuidens</i> <i>A. angustifolia</i> <i>A. americana</i> var. <i>oaxacensis</i> <i>A. karkwinskii</i> Oaxaca <i>A. marmorata</i> <i>A. potatorum</i> <i>A. duranguensis</i> Durango <i>A. fourcroydes</i> Yucatán
Substrato	Mosto
Microbiota funcional	Bacterias: <i>Lactobacillus pontis</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. farraginis</i> , <i>Weissella cibaria</i> , <i>W. paramesenteroides</i> , <i>Zymomonas mobilis</i> . Levaduras: <i>no-Saccharomyces</i> (<i>Candida</i> spp. <i>Candida parapsilosis</i> <i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Hanseniaspora</i> spp., <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Pichia caribbica</i> , <i>P. guilliermondii</i> , <i>T. delbrueckii</i>) y <i>Saccharomyces</i> (<i>S. cerevisiae</i>)
Productos de fermentación	Etanol, ácidos orgánicos, ésteres, terpenos, aldehídos

Las Levaduras y su Importancia

Las levaduras son microorganismos eucariontes clasificados en el reino Fungi. Son unicelulares, aunque algunas especies levaduriformes pueden volverse de tipo multicelular mediante la formación de cadenas de células en gemación conocidas como pseudohifas o hifas falsas, como se observa en la mayoría de los hongos. Las levaduras forman colonias pastosas sobre los medios de cultivo, constituidas en su mayor parte por células aisladas que suelen tener formas alargadas, esféricas, elipsoides u ovoides. Las dimensiones pueden ir de 1 a 9 µm de ancho y 2 a más de 20 µm de longitud, dependiendo de la especie, nutrición, edad y otros factores (Kurtzman, *et al.*, 2005; Ancasi EG).

La reproducción de las levaduras puede ser de tipo sexual o asexual. La mayor parte de las levaduras se reproducen asexualmente por medio de mitosis y muchas se reproducen por un proceso de división asimétrica llamada gemación.

En ésta se forma una prominencia, o célula hija, sobre el individuo progenitor; el núcleo de la célula madre se divide en un núcleo hijo y migra a la célula hija. La prominencia continúa creciendo hasta separarse de la célula madre formando una nueva célula que usualmente es más pequeña que la célula progenitora. Algunas levaduras se reproducen por fisión creando dos células hijas del mismo tamaño (Yeong, 2005).

Se ha observado que las células diploides modifican su forma de reproducción en respuesta a la disponibilidad de nutrientes o bien a condiciones de estrés. Si hay nutrientes disponibles éstas se reproducen de manera asexual, mientras que al haber falta de éstos las células se reproducen sexualmente mediante meiosis produciendo esporas haploides que pueden proceder a aparearse (Neiman, 2005).

Las levaduras son quimioorganotróficas; es decir, utilizan compuestos orgánicos como fuente de energía y no requieren de luz solar para su crecimiento. Su fuente de carbono proviene principalmente de azúcares simples tales como glucosa y fructosa o disacáridos como sacarosa y maltosa. Algunas especies pueden metabolizar pentosas como ribosa, alcoholes y ácidos orgánicos. Pueden requerir oxígeno para llevar a cabo respiración celular, siendo aerobias estrictas; o bien tener un metabolismo fermentativo y ser anaerobias facultativas, ya que también pueden producir energía por métodos aerobios. Las levaduras crecen en medios con pH neutro o ligeramente ácido. Su rango de temperatura de crecimiento puede variar dependiendo de la especie (Ancasi EG).

Estos microorganismos son muy comunes en el ambiente y a menudo son aislados de materiales ricos en azúcares. Se las puede encontrar, por ejemplo, en la cáscara de frutas, tales como uvas, manzanas o duraznos; exudados de plantas, como la savia de cactáceas. Levaduras que incluyen a *Candida albicans*, *Rhodotorula rubra*, *Torulopsis spp.* y *Trichosporon cutaneum* han sido encontradas como parte de la microbiota de la piel en personas (Sláviková *et al.*, 2003; Herrera *et al.*, 2010; Oyeka *et al.*, 2002).

Las levaduras han servido al hombre durante muchos siglos para la elaboración de alimentos. Su importancia es aún mayor en la actualidad porque se las emplea

en muchos procesos fermentativos, se utilizan en la producción de etanol a gran escala así como vitaminas del complejo B, en la producción de diferentes proteínas y hormonas empleadas en medicina, antibióticos, colorantes, entre otros. Las levaduras también han contribuido al progreso científico, particularmente la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, por ser un buen modelo para el estudio de los procesos bioquímicos y metabólicos básicos de las células eucarióticas vivas.

Durante este estudio se emplearon tres levaduras para la fermentación de mostos de *Agave potatorum*. Estas levaduras fueron identificadas, empleando la técnica PCR-RFLP así como la secuenciación del gen 26S de las mismas (véase pp. 15-19 y pp. 39), como cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Issatchenkia orientalis* y *Pichia manshurica*. Algunas de las particularidades de estas especies de levaduras son:

Saccharomyces cerevisiae:

Esta levadura ha sido encontrada en frutas, suelos, entre otros, y se emplea para la elaboración de vinos, cerveza, quesos, pan, etc. Es una levadura de tipo ascomiceto que se reproduce de manera asexual por gemación. Las células tienen formas ovaladas, redondas o cilíndricas. Fermentan glucosa, galactosa, maltosa, sacarosa y fructosa. No producen ácido acético y son capaces de crecer en un medio que contenga etanol (CBS-KNAW, 2012). *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los organismos eucariontes modelo más estudiado en biología celular y molecular. Es el microorganismo responsable de las fermentaciones más comunes.

Issatchenkia orientalis:

Ha sido encontrada en suelos, en tanques de fermentación en fábricas de ácido cítrico, llevando a cabo fermentaciones de cacao en Ghana e Indias Occidentales, como contaminante industrial en fermentaciones en Hungría, como parte de la levadura empleada para la elaboración de pan en Finlandia, ha sido encontrada también en jugo de frutas, mostos de cerveza, entre otros. Es un ascomiceto que se reproduce por gemación. Puede formar pseudohifas. Sus células son de forma elipsoidal elongada. Fermenta glucosa, no produce

ácido acético y puede crecer en medios con etanol, con 10% de NaCl y 1% de acetato (CBS-KNAW, 2012).

Pichia membranifaciens:

Ha sido encontrada en uvas en Sudáfrica, en suelos, en plátanos, piñas, cerveza, levadura para la elaboración de pan, vino, sidra, pepinillos, entre otros. Es un ascomiceto y se reproduce de manera asexual por gemación. Sus células presentan formas ovals y cilíndricas. Fermenta glucosa, no produce ácido acético y su crecimiento en medios con etanol es variable (CBS-KNAW, 2012).

Fermentación Alcohólica

Es un proceso biológico en el que algunos azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa son convertidos en energía celular y se libera etanol y dióxido de carbono como productos de desecho metabólico. Debido a que las levaduras llevan a cabo esta conversión en ausencia de oxígeno, la fermentación alcohólica es considerada como un proceso anaerobio.

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

En una fermentación la aireación provoca un aumento de la biomasa o población de levaduras, ya que hay una mayor disponibilidad de energía para las levaduras, lo que se traduce en una disminución en la producción de etanol, debido a que se reduce la fermentación en favor de la respiración, a este fenómeno se le conoce como “Efecto Pasteur”. No obstante, cuando la concentración de azúcares es elevada las levaduras las metabolizan por la vía fermentativa, aún en presencia de

oxígeno, este fenómeno recibe el nombre de “Efecto Crabtree” y se presenta en las levaduras a partir de una concentración de azúcares de 9g/L (Hidalgo, 2010).

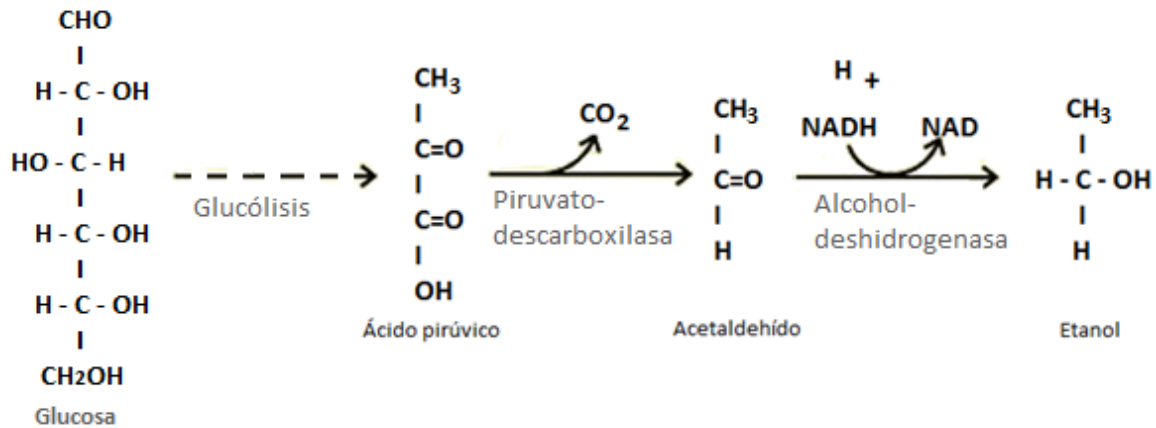


Figura 2. Fermentación alcohólica.

El etanol en el medio fermentativo aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática y disminuye su poder de selectividad, incrementando el flujo de entrada de protones hacia el citoplasma, donde la célula se defiende del exceso de acidez aumentando la actividad de la “bomba de protones” ATPasa de la membrana plasmática, y que tiene como consecuencia un progresivo abandono del metabolismo y síntesis de los compuestos nitrogenados. Al estar la bomba de protones ocupada en expulsar el exceso de protones que le viene del exterior, empleando una gran cantidad de energía en accionar este mecanismo. El etanol también inhibe la actividad de la ATPasa y reduce el contenido global de esteroides, terminando por inactivar las funciones vitales de las levaduras y por lo tanto, paralizando la fermentación alcohólica (Hidalgo, 2010).

Además de etanol, en la fermentación alcohólica se producen, a partir del ácido pirúvico, otros compuestos, entre ellos destacan el ácido acético, ácido butírico, acetona, ácido láctico, acetoina, butanediol-2,3, ácido fumárico, ácido oxalacético, ácido succínico, ácido propiónico, diacetilo, acetato de etilo, entre otros (Hidalgo, 2010). En los mostos fermentados analizados en este proyecto se encontraron ácido láctico, ácido acético, acetato de etilo y etanol como productos de fermentación de las levaduras inoculadas.

Durante la fermentación alcohólica, las levaduras son capaces de formar cantidades apreciables de ácido acético ($\text{CH}_3\text{-COOH}$), de 100 a 400 mg/L dependiendo de la especie o cepa de levadura que interviene en la fermentación.

La formación de ácido acético se explica por dos vías bioquímicas, la primera a partir de ácido pirúvico, que con el cofactor CoA-SH forma acetilcoenzima A, el cual por último es transformado en ácido acético. La segunda es a partir de acetaldehído, compuesto que se forma inmediatamente antes del etanol, que se transforma directamente por oxidación en ácido acético. Ambos mecanismos están muy ligados a la síntesis de lípidos, los cuales dependen de la formación de la acetilcoenzima A, por lo que las levaduras que producen una menor tasa de ácido acético son aquellas que sintetizan mayores cantidades del primer compuesto.

Además de la levadura existen otros factores que influyen en la producción de ácido acético durante la fermentación alcohólica, destacando entre éstos la anaerobiosis, algunas carencias de vitaminas y aminoácidos, las temperaturas de fermentación elevadas durante la fase de crecimiento exponencial (25 a 30°C) y los pH inferiores a 3.1 o superiores a 4 (Hidalgo, 2010).

El ácido láctico ($\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH}$) es un compuesto importante producido durante la fermentación alcohólica (200-300mg/L) y procede de la reducción del ácido pirúvico, siendo mayoritaria la formación del isómero ácido D(-)láctico .

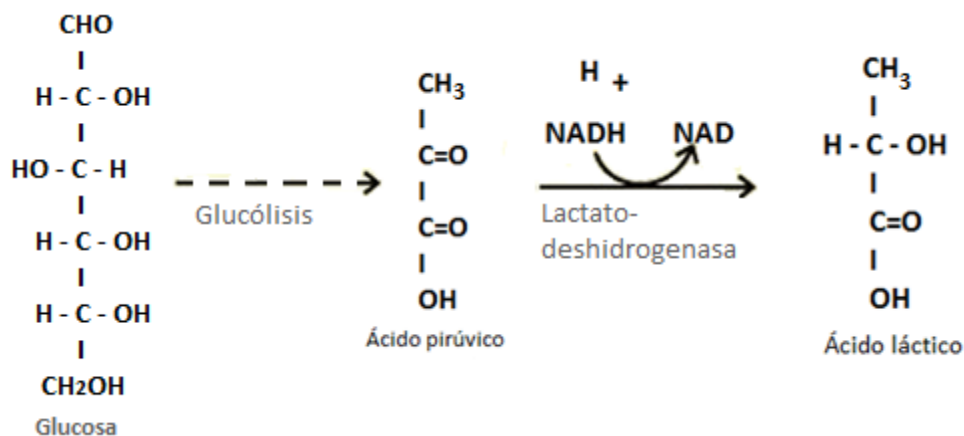


Figura 3. Fermentación láctica.

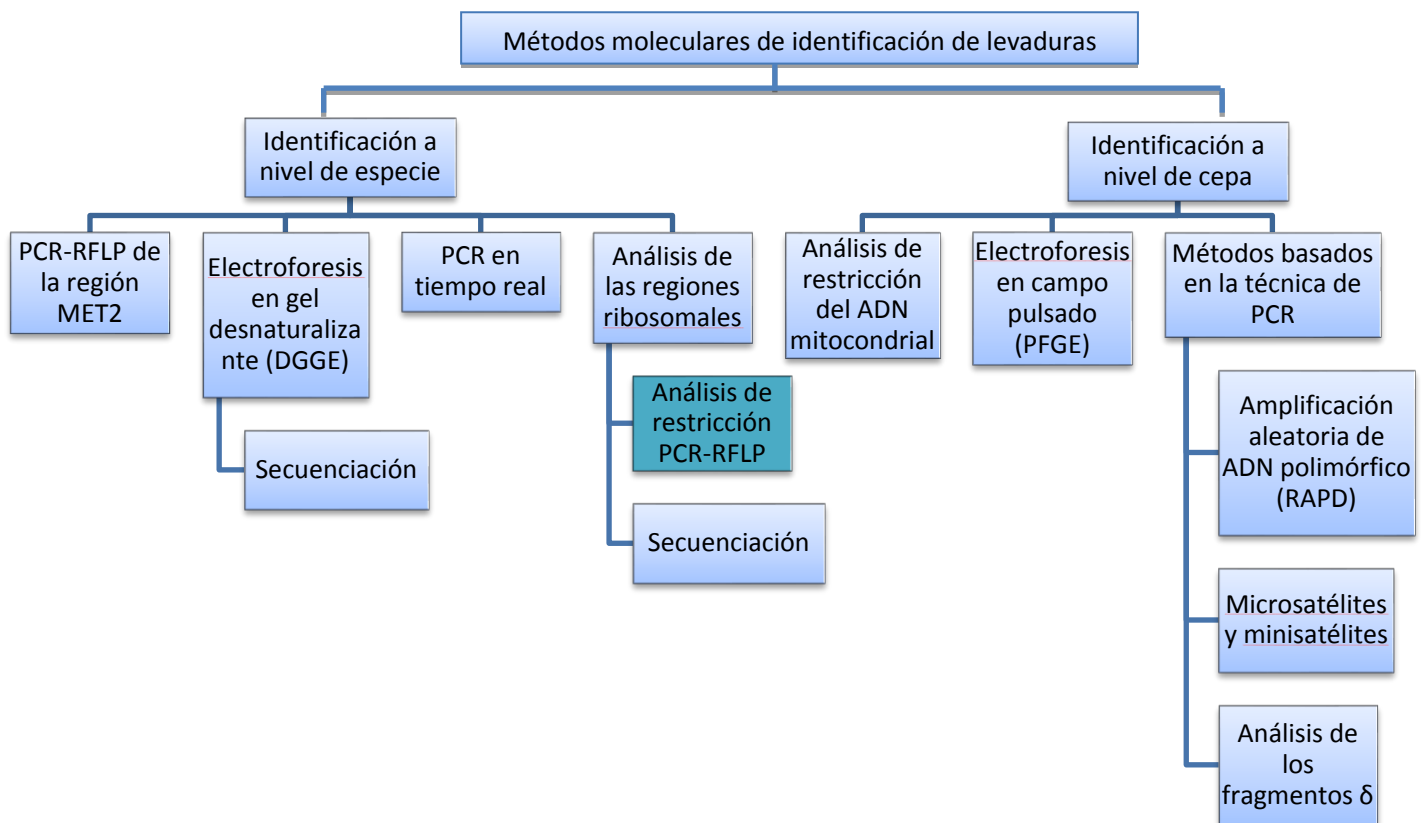
El acetato de etilo ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{-CH}_3$) es otro compuesto encontrado en el análisis de los mostos fermentados durante este proyecto. Éste es uno de los principales ésteres en el mezcal y se sintetiza a partir de reacciones entre el etanol y acetil-CoA catalizadas por alcohol acetiltransferasas. Proporciona aromas frutales al producto final. En vinos este compuesto no debe rebasar los 170mg/L debido a que le otorga aromas desagradables a esmalte.

Métodos Moleculares de Identificación de Levaduras

De manera tradicional para la identificación y clasificación de levaduras se han empleado métodos basados en sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Las pruebas morfológicas que se llevan a cabo son la verificación del aspecto de la colonia, la morfología del estado sexual y asexual, etc. Mientras que las pruebas fisiológicas y bioquímicas incluyen fermentación/asimilación de diferentes fuentes de carbono, asimilación de compuestos nitrogenados, requerimientos vitamínicos, análisis total de proteínas, resistencia a cicloheximida y termotolerancia, entre otros.

La identificación con base en las características morfológicas y fisiológicas requiere de la realización de varias pruebas, lo cual es laborioso, complejo y costoso. Estas pruebas no son siempre estables ni reproducibles, debido a que las fuentes de carbono y nitrógeno pueden metabolizarse por rutas comunes y en ocasiones su metabolismo es controlado por varios genes (Orberá, 2004).

Una opción al uso de los métodos de identificación antes mencionados son las técnicas moleculares. Éstos se basan en el estudio de la molécula de ADN dejando de lado el estado fisiológico de la levadura así como sus rasgos fenotípicos.



Esquema 1. Métodos moleculares de identificación de levaduras. La zona sombreada es el método empleado para este proyecto (Fernández-Espinar, 2006).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es empleada como punto de partida para muchos métodos moleculares. Debido a que permite obtener un número elevado de copias de una secuencia o gen en particular en poco tiempo partiendo de cantidades mínimas de ADN inicial.

Esta técnica se fundamenta en la capacidad natural de las ADN polimerasas termoestables para replicar una cadena molde partiendo de una mezcla que contiene desoxirribonucleósidos-trifosfato (dNTPs) en exceso y fragmentos de secuencia llamados primers o cebadores que son complementarios a una de las dos hebras de la secuencia de ADN elegida y que son los iniciadores de la reacción. Ésta se lleva a cabo en tres pasos fundamentales que se repiten de manera cíclica permitiendo así la multiplicación de la secuencia elegida:

1. Desnaturalización: Como primer paso se desnaturaliza el ADN; es decir, se separan las dos cadenas que lo constituyen. Para ello se eleva la temperatura a 94-98°C.
2. Alineación o unión del primer: El cebador o primer se une a su secuencia complementaria de cadena molde. En esta etapa la temperatura deberá disminuir hasta los 60-70°C.
3. Elongación de la cadena: En este paso la temperatura se mantiene dependiendo de la ADN polimerasa que se esté utilizando, de manera que ésta pueda extender la cadena iniciada por los cebadores que complementan la hebra molde a la que están asociados. La polimerasa sintetiza una nueva cadena de ADN complementaria a la cadena molde añadiendo los dNTP's complementarios en dirección 5'→3', uniendo el grupo 5'-fosfato de los dNTP's con el grupo 3'-hidroxilo del final de la hebra de ADN en extensión.

Una vez concluido el último paso se ha completado el primer ciclo de la reacción de PCR. Se vuelve a elevar la temperatura a 94-98°C para llevar a cabo una nueva reacción de desnaturalización comenzando así un nuevo ciclo de reacción. En este nuevo ciclo se amplifican tanto las moléculas originales del templado como aquellas que se acaban de formar (Figura 4).

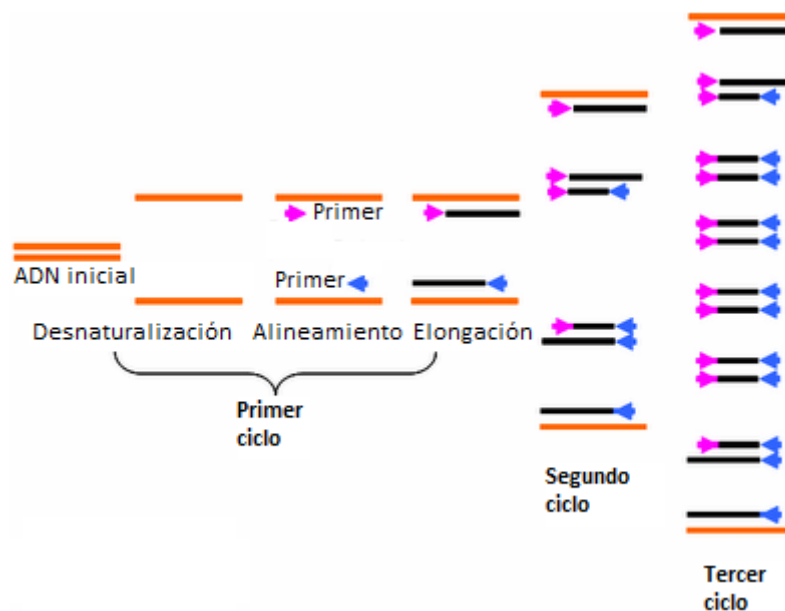


Figura 4. Representación de la reacción de PCR.

Los métodos moleculares de identificación se basan en las similitudes y diferencias que presenta el ADN al ser tratado de diversas maneras. Para poder llevar a cabo estas comparaciones que permitirán identificar a las levaduras es necesario elegir un gen que cumpla con ciertas características como son:

- Estar presente en todos los organismos que se deseen estudiar.
- Tener la misma función en todos estos.
- Ser un gen en el que sus mutaciones tengan consecuencias mortíferas para el organismo.
- Su secuencia debe cambiar con la frecuencia adecuada de manera que permita marcar la distancia evolutiva.
- Tener regiones que sean conservadas para poder alinear y comparar con otras secuencias y tener otras regiones que evolucionen con mayor rapidez de manera que se permita la identificación.
- Ser un gen al que se pueda acceder con facilidad.

(Madigan *et al.*, 1998; Dahllöf *et al.*, 2000; Prescott ,2000).

Métodos para la identificación de levaduras a nivel de especie

Análisis de las regiones ribosomales

Para la identificación de levaduras se utilizan los genes ribosomales (5S, 5.8S, 18S y 26S) que están agrupados en un tándem formado por unidades transcripcionales que se repiten de 100 a 200 veces en el genoma. En cada una de estas unidades transcripcionales se encuentran regiones espaciadoras, que son regiones que están transcritas pero no se encuentran procesadas, conformadas por espaciadores internos transcritos (ITS1, ITS2), espaciadores externos transcritos (ETS) y espaciadores no-transcritos (NTS) que separan a las unidades codificantes (Figura 5). Estos genes ribosomales así como los ITS y NTS representan herramientas poderosas para la identificación de especies (Kurtzman *et al.*, 1998).

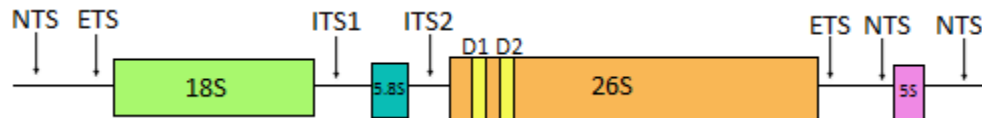


Figura 5. Estructura del ADN ribosomal nuclear (Fernández-Espinar *et al.*, 2006).

Para la identificación de levaduras se emplea el gen de la subunidad mayor 26S. Este gen es relativamente pequeño por lo que es posible obtener información del mismo sin tener muchos problemas en la secuenciación. Posee también zonas variables llamadas dominios de expansión arreglados de forma tal que el dominio D2, que es el más variable, es adyacente al D1 que es más conservado. De este modo con la amplificación de esta región es posible la identificación de especies de hongos y levaduras (Kurtzman *et al.*, 1998; Cocolin *et al.*, 2002; Inácio *et al.*, 2003; Moncalvo *et al.*, 2000). Este método consiste en determinar y comparar las secuencias de estas regiones con la secuencia de especies conocidas, para lo cual se emplean bases de datos.

Más adelante comenzó a utilizarse la región comprendida por los espaciadores internos transcritos que separan al gen ribosomal 5.8S del 18S y 26S. Debido a su menor tamaño, comparado con los dominios D1 y D2 del rARN 26S, gracias al cual el trabajo puede ser simplificado además de que 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). También se ha observado que esta región tiene más variaciones interespecie que los genes ribosomales 18S y 26S (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Fernández-Espinar *et al.*, 2000).

Secuenciación de regiones ribosomales

Este método consiste en determinar y comparar las secuencias de las regiones empleadas (gen 18S o los dominios D1 y D2 del gen 26S) con la secuencia de especies conocidas utilizando bases de datos. Existe una gran disponibilidad de las secuencias de los dominios D1 y D2 en bases de datos por lo que este método es una gran opción para la identificación de levaduras.

Análisis de restricción de regiones ribosomales

Polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción (RFLP)

El método molecular empleado para la identificación a nivel de especie de las levaduras empleadas en este estudio fue el análisis de restricción del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Este método consiste en la diferenciación de los organismos mediante el análisis de los patrones de ruptura que se generan en un sitio específico del genoma al ser cortado con enzimas de restricción, también llamadas endonucleasas de restricción. Los patrones de restricción obtenidos se comparan de modo que se establecen correlaciones entre especies y cepas.

El análisis de los patrones de restricción del genoma completo de un organismo puede ser complicado debido a la cantidad de fragmentos a analizar. Es por ello que se utiliza la reacción de PCR previo al análisis de restricción ya que permite analizar sólo una parte del genoma.

Para llevar a cabo la identificación de levaduras por PCR-RFLP se debe contar primero con las levaduras aisladas para poder realizar la extracción de su ADN. La región elegida del gen es amplificada por PCR y una vez que se tiene el producto de PCR se digiere con enzimas de restricción. En este caso la región elegida para la amplificación fue aquella comprendida por los espaciadores internos transcritos (ITS1, ITS2) y el producto de PCR fue digerido con las enzimas de restricción *HaeIII*, *HinfI* y *HhaI* que son las propuestas por Esteve-Zarzoso *et al.*, (1999) colocando la restricción a 37°C por 3 horas. Los fragmentos de restricción se separan mediante electroforesis en un gel de agarosa teñido que incluye un marcador de peso molecular adecuado. Los resultados obtenidos con la electroforesis pueden analizarse con un programa de computadora y ser comparados con una base de datos.

Análisis de restricción del gen MET2

Es un método que se emplea para identificar las levaduras del género *Saccharomyces spp.*, específicamente para diferenciar a las cepas *S. cerevisiae* y *S. bayanus* empleadas en las fermentaciones de vino que tienen una gran cercanía genética (Masneuf *et al.*, 1996).

Consiste en la amplificación por PCR del gen MET2 al cual posteriormente se le realiza un análisis con enzimas de restricción. Este gen se encuentra presente en las levaduras del género *Saccharomyces* y cuenta con un grado de polimorfismo el cual permite la diferenciación entre especies (Fernández-Espinar *et al.*, 2003; Masneuf *et al.*, 1996).

PCR-Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)

Esta técnica permite separar fragmentos de ADN de doble cadena del mismo tamaño con secuencias diferentes. El fragmento de ADN es amplificado por PCR posteriormente los fragmentos de ADN son separados por electroforesis utilizando geles de poliacrilamida con concentraciones crecientes de agentes desnaturalizantes. La diferencia en la movilidad electroforética de los fragmentos de ADN depende del punto de desnaturalización que está en función tanto de la longitud de la cadena de ADN como de la composición de nucleótidos de la secuencia. El punto de desnaturalización aumenta cuando la secuencia tiene altos contenidos de guanina y citosina (Muyzer *et al.*, 1993).

Los agentes desnaturalizantes comúnmente empleados son urea y formamida. Cuando se utiliza un gradiente lineal de temperatura como agente desnaturalizante entonces la técnica se denomina electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE).

Los patrones obtenidos proporcionan un perfil de la diversidad de poblaciones microbianas así como su abundancia relativa (Muyzer *et al.*, 1993). Los productos de PCR separados mediante esta técnica son secuenciados y comparados con bases de datos para su identificación.

PCR-Tiempo real

Se trata de una técnica variante del PCR convencional que permite amplificar y cuantificar de manera simultánea el ADN. La cuantificación se lleva a cabo mediante la detección de un marcador fluorescente que incrementa su señal de manera proporcional a la cantidad de ADN amplificado. Esta técnica tiene una alta sensibilidad y especificidad además de que no requiere de la realización de algún otro método molecular posterior para la cuantificación del ADN por lo que se reduce el tiempo de análisis.

Por otro lado es susceptible a la obtención de falsos positivos por contaminación cruzada, al igual que la técnica de PCR en punto final. Debido a ello se pone especial cuidado en el diseño de los primers y la temperatura de alineación ya que de ello depende la especificidad de la técnica (Palacios *et al.*; Fernández-Espinar *et al.*, 2006).

Métodos para la identificación de levaduras a nivel de cepa

Métodos basados en la técnica de PCR

Varias técnicas han sido desarrolladas con el propósito de la identificación de las levaduras a nivel de cepa. Algunas de éstas son variantes de la reacción básica de PCR permitiendo la detección de polimorfismos sin emplear enzimas de restricción.

RAPD (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico)

Este método de identificación fue introducido por Williams *et al.*, (1990). Ellos proponen la detección de polimorfismos mediante la amplificación al azar de secuencias de ADN empleando primers de pocos oligonucleótidos (10pb aproximadamente) que tienen una secuencia arbitraria.

Mediante el empleo de una baja temperatura de alineación durante la reacción de PCR (35-39°C) el primer se une a sitios inespecíficos de manera aleatoria en diferentes lugares del genoma permitiendo la amplificación de fragmentos polimórficos del ADN. De esta manera se obtienen productos de diferentes pesos moleculares que cuentan con un perfil característico para cada cepa y que son observados por electroforesis en geles de agarosa.

Para llevar a cabo este método no se requiere de información previa de la secuencia para el diseño de los primers y permite analizar el genoma completo, a diferencia de otros métodos que analizan sólo una región del mismo, con ello se puede detectar mayor polimorfismo que con otros métodos.

Sin embargo una desventaja de esta técnica es el tener que hacer varias repeticiones para cada muestra utilizando diferentes extracciones de ADN y

únicamente las bandas que sean comunes a todas las repeticiones son las que deben de ser tomadas en cuenta para su análisis (Fernández-Espinar *et al.*, 2006; Giraffa y Neviani, 2001).

Microsatélites y minisatélites

Este método está basado en la amplificación de secuencias cortas y repetitivas que se distribuyen a lo largo del genoma. Estas secuencias son conocidas como microsatélites, que cuentan con menos de 10pb, o minisatélites, con 10-100pb. Estas secuencias muestran una gran variabilidad por lo que son ideales para la identificación de levaduras a nivel de cepa. Entre las secuencias más utilizadas se encuentran: (GTC)₅, (GAGA)₄, Fago ADN M13, etc.

Análisis de los elementos δ

Las secuencias δ miden aproximadamente 0.3Kb y se encuentran a lado de los retrotransposones TY1, concentrados en las regiones adyacentes a los ARN de transferencia. Se pueden encontrar varias copias de los elementos δ en el genoma de las levaduras, tanto como parte de los retrotransposones o de manera aislada, asimismo el número y localización de estos elementos presentan una variabilidad intraespecífica (Fernández-Espinar *et al.*, 2006). Con base en ello primers específicos (δ 1 y δ 2) fueron diseñados por Ness *et al.*, (1993) para amplificar estas secuencias y desarrollaron una metodología que resultó ser de utilidad para diferenciar entre cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

En 2003, Legras y Karst encontraron 305 elementos δ en la secuencia de la cepa de *S. cerevisiae* S288C empleando el programa BLAST (herramienta de búsqueda de alineamientos locales). Con lo cual diseñaron nuevos primers (δ 12 y δ 21), que son más específicos y revelan un mayor número de polimorfismos. Legras y Karst proponen 11 elementos δ como suficientes para lograr la correcta diferenciación de 53 cepas comerciales de *S. cerevisiae*.

Esta técnica presenta como desventaja la dependencia de la cantidad de ADN empleada para la reacción de PCR. En 2001, Fernández-Espinar *et al.*, utilizaron distintas concentraciones de ADN (60, 250 y 2500ng) y observaron que para cada concentración se obtenían diferente número de bandas. Debido a esto es necesario estandarizar la concentración de ADN a emplear en esta técnica y por

ello se complica la comparación de resultados entre laboratorios. Otro inconveniente de esta técnica es la baja temperatura de alineación ya que genera la aparición de bandas fantasma. Ciani *et al.*, (2004), han propuesto aumentar la temperatura de alineación a 55°C con lo que se puede evitar la aparición de estas bandas aunque con ello se distinguen un menor número de bandas.

Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)

Esta técnica consiste en la amplificación selectiva de los fragmentos obtenidos de la digestión del ADN genómico empleando la reacción de PCR. El ADN es cortado con dos enzimas de restricción, se emplean una enzima de corte frecuente y otra de corte poco frecuente. Posteriormente a estos fragmentos se les unen primers, conocidos como adaptadores (18-20pb), que tienen extremos compatibles con las enzimas de restricción. Por último los fragmentos-adaptadores son amplificados mediante PCR (Vos *et al.*, 1995).

Es posible disminuir o aumentar el número de bandas amplificadas dependiendo de la complementariedad del primer con el sitio de restricción. Para la lectura de los fragmentos se emplean geles de poliacrilamida de tipo desnaturizante debido a que en una sola reacción pueden generarse numerosos fragmentos y de esta manera pueden resolverse de manera adecuada. De este modo se pueden obtener perfiles muy específicos con los cuales se puede obtener la diferenciación a nivel de cepa sin necesidad de tener conocimientos anteriores de la secuencia (Vos *et al.*, 1995). Sin embargo se requiere del uso de una computadora para analizar los patrones obtenidos debido a la complejidad de los mismos.

Análisis de restricción del ADN mitocondrial

Existe gran variabilidad en el tamaño del ADN mitocondrial (mtADN) de las levaduras. Querol *et al.*, 1992 desarrollaron una técnica para *S. cerevisiae* que permite analizar el mtADN sin necesidad de aislarlo o purificarlo de manera previa. Esta técnica está basada en las diferencias en el contenido de guanina (G) y citosina (C) del ADN mitocondrial (20%) y del ADN nuclear (40%).

Al ser expuesto, el ADN nuclear, a enzimas de restricción específicas para las regiones G-C, se producen numerosos fragmentos de ADN debido a la presencia

de mayor cantidad de regiones ricas de guanina-citosina. Por el contrario, con las mismas enzimas de restricción, del ADN mitocondrial se producirían fragmentos de mayor tamaño.

Al someter el ADN total a una digestión empleando enzimas específicas para las regiones G-C, ocurre una sobre digestión en el ADN nuclear que produce fragmentos pequeños e indistinguibles en un gel de agarosa; sin embargo, los fragmentos obtenidos del ADN mitocondrial forman un perfil específico para cada cepa (Orberá, 2004).

Esta técnica también ha sido empleada para la caracterización de otras especies de levaduras además de *S. cerevisiae*, por ejemplo: *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Dekkera/Brettanomyces*, *Kluyveromyces* y *Zygosaccharomyces* (Orberá, 2004).

Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

Esta técnica hace posible la separación de grandes moléculas de ADN en geles de agarosa mediante el uso alternado de dos campos eléctricos. Cuenta con una resolución que abarca tamaños de ADN desde 10Kb hasta 10Mb, haciendo posible el análisis de cromosomas completos de bacterias y levaduras.

En 1984, Schuartz y Cantor desarrollaron esta técnica con el objetivo de separar los cromosomas de *S. cerevisiae*. En un principio se aísla el ADN cromosomal intacto, para ello las células se colocan en bloques de agarosa de bajo punto de fusión y se ponen en moldes obteniendo insertos que contienen a las células de las levaduras completas. Estas levaduras se someten a una lisis y desproteización *in situ* con lo que se obtiene el ADN inmovilizado en la matriz de agarosa (Herschelb *et al.*, 2007).

Al alternar los dos campos eléctricos es posible la separación de los cromosomas que ocurre de la siguiente forma: al aplicarse un campo eléctrico las moléculas de ADN son elongadas y migran en la dirección del campo eléctrico a través del gel, posteriormente este campo se elimina y se aplica un segundo campo eléctrico formando un ángulo con el primer campo eléctrico, que varía entre 110°-180°; por lo que las moléculas de ADN se reorientan y comienzan a migrar en la dirección del segundo campo. Esto ocasiona que las moléculas de ADN grandes vayan

quedando atrás de las moléculas pequeñas debido a que tardan más tiempo en reorientarse.

La resolución de las bandas cromosomales depende de los siguientes parámetros: los pulsos o intervalos de variación de la fuerza del campo eléctrico, la concentración de agarosa, el ángulo entre los campos eléctricos y la temperatura (Nassonova, 2008).

Existen varios sistemas de electroforesis en gel de campo pulsado y éstos varían en cuanto a la homogeneidad, el método de reorientación de los campos eléctricos y la forma geométrica que dibujan los electrodos. Las principales diferencias entre éstos son: la velocidad de separación, la capacidad para obtener líneas rectas, el tamaño del gel que permita una buena separación y la resolución dentro de un rango específico de tamaños.

Fundamentos Analíticos

Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

La cromatografía por HPLC es una de las técnicas con mayor importancia para el análisis químico y purificación de compuestos basado en su distinta adsorción, tamaño molecular o polaridad en superficies sólidas o líquidas de distintos tipos. Se caracteriza por tener una fase móvil y una fase estacionaria. La separación consiste en un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de la mezcla son transportados por la fase móvil y retenidos selectivamente por una fase estacionaria. Ésto se encuentra relacionado a la constante de equilibrio que presentan los diferentes analitos presentes en la muestra entre estas dos fases (Anaya *et al.*, 2001).

La cromatografía de líquidos de alta resolución es la técnica de separación más ampliamente utilizada hoy en día. La popularidad de esta técnica se debe a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Algunos ejemplos de estos materiales incluyen los azúcares, aminoácidos, proteínas, ácidos orgánicos, ácidos nucleicos, hidrocarburos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos esteroides, especies organometálicas y una cierta variedad de sustancias inorgánicas (Universidad Nacional de la Plata).

Cuando la muestra y la fase móvil atraviesan la fase estacionaria se dan dos tipos de equilibrios debido a las interacciones entre cada uno de estos componentes. Estas interacciones son hidrofílicas-hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones bipolares, electrostáticas, entre otras; y son responsables del grado de afinidad de cada uno de los componentes de la muestra por la fase móvil o la fase estacionaria. Los componentes con mayor afinidad a la fase estacionaria se retienen más y tardan más tiempo en eluir mientras que aquellos compuestos más afines a la fase móvil se retienen menos y eluyen más rápido (Ramírez, 2004).

La separación analítica de los componentes de una mezcla se puede lograr con la optimización de las condiciones de elusión, el empaque de la columna y la configuración de la misma. Las variables que constituyen las condiciones de elusión son la composición de la fase móvil, el perfil de elusión (isocrático o gradiente lineal), el flujo y la temperatura. Las variables del material de empaque de la columna son la forma de separación, la fase de unión, los grupos adyacentes, tamaño de poro, tamaño de partícula, carga de carbono y superficie. Las variables de la configuración de la columna son: la longitud, diámetro interno y material de construcción (Ramírez, 2004).

Componentes básicos del sistema HPLC

Un equipo de HPLC consta esencialmente de un recipiente que contiene la fase móvil, una bomba para forzar el paso de la fase móvil a través del sistema de alta presión, un sistema de inyección para introducir la muestra en la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de colección de datos como una computadora o un registrador. Las computadoras, además de recibir y reproducir las señales enviadas por el detector, se emplean para controlar las operaciones y los parámetros cromatográficos y permiten periodos largos de operación sin necesidad de supervisión.

A continuación se detallan los componentes de un HPLC:

- Recipientes para la fase móvil: Estos deben de ser inertes, por lo general se utilizan recipientes de vidrio o acero inoxidable.
- Sistema de bombeo: Administra cantidades exactas de fase móvil de los recipientes a la columna mediante una tubería y uniones adecuadas para altas presiones. Éstas deben cumplir con las siguientes características:
 - Dejar libre de pulsos la presión de salida.
 - Generar presiones mayores a 6000psi.
 - Proporcionar velocidades de flujo de 0.1 a 10 mL/min.
 - Reproducir el flujo dentro de un valor relativo de 0.5%.
 - Ser inertes a los disolventes empleados.

- Sistema de inyección: Este sistema introduce la muestra en la fase móvil o bien la muestra puede haber sido disuelta en la fase móvil previamente. La manera más común para llevar a cabo la introducción de la muestra es empleando dispositivos en forma de bucle. Éstos pueden introducir volúmenes pequeños de la muestra (5 μ L hasta 500 μ L) a presiones de hasta 7000psi.
- Columna cromatográfica: Está constituida por un tubo angosto empacado con sólido inerte finamente dividido (empaque) cuya superficie es lo que se conoce como fase estacionaria. Las columnas cromatográficas están hechas, por lo general, de acero inoxidable y su longitud varía entre 3-30cm, tienen un diámetro interno de 1-10mm y los empaques tienen un tamaño de partícula de 3 a 10 μ m.
- Detector: Existen varios tipos de detectores y su utilización depende de la naturaleza de la muestra. Los detectores en cromatografía de líquidos son de dos tipos básicos. Los detectores basados en una propiedad de la disolución responden a una propiedad de la fase móvil, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica, o la densidad, que se modifica por la presencia de los analitos. Por contraste, los detectores basados en una propiedad del soluto responden a alguna de las propiedades del soluto, como la absorbancia UV, fluorescencia, o intensidad de difusión, que no son propias de la fase móvil.
- Registrador: Se emplea para la recolección de datos. Es la estación que recibe y almacena la señal de los detectores e imprime el cromatograma.

El sistema de inyección introduce la muestra a analizar a la parte superior de la columna y se introduce también fase móvil lo que hace que la muestra se mueva hacia dentro de la columna. Con ello comienza la partición simultánea de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Debido a que el movimiento del soluto a través de la columna sólo puede ocurrir gracias a la fase móvil, la velocidad promedio de migración del soluto depende de la fracción de tiempo que permanece en esa fase. Esta fracción de tiempo es pequeña para solutos que son afines a la fase estacionaria y es grande cuando es mayor la afinidad por la fase

móvil. Las diferencias que resultan de estas velocidades hacen que los componentes de una mezcla se separen en diferentes zonas a lo largo de la columna.

El detector al extremo de la columna junto con el registrador permiten la obtención de un gráfico de la señal en función del tiempo denominado cromatograma. Este gráfico permite llevar a cabo un análisis tanto cualitativo como cuantitativo de la muestra. La posición de los picos en el eje del tiempo se puede utilizar para identificar los componentes de la muestra mientras que el área y la altura del pico son proporcionales a la cantidad de soluto eluido (Espinosa, 2010).

Fundamentos teóricos

- Tiempo muerto: Es el tiempo necesario para que una sustancia no retenida salga de la columna.
- Tiempo de retención: Tiempo transcurrido entre la inyección de una muestra y la aparición de uno de sus componentes en el detector. El tiempo de retención está en función del largo de la columna.
- Factor de capacidad: Se refiere a la razón de la cantidad de soluto en la fase estacionaria entre la cantidad de soluto en la fase móvil en el equilibrio. Es independiente de la velocidad de flujo de la fase móvil y de las dimensiones de la columna.
- Número de platos teóricos: Cada plato teórico representa un equilibrio teórico de distribución del soluto entre las fases. El número total de platos teóricos de una columna representa el poder de separación de la columna (Romero, 2002).
- Selectividad: Se refiere a la habilidad del sistema para separar los picos, por ejemplo la distancia entre dos picos.
- Resolución: El grado de separación o resolución de dos bandas adyacentes.

Cromatografía de gases

Al igual que la cromatografía de líquidos de alta resolución la cromatografía de gases es un método de separación o análisis de muestras en el que los componentes de ésta se distribuyen entre dos fases: la fase estacionaria, de gran área superficial y la fase móvil que en la cromatografía de gases es un gas. La muestra es vaporizada, inyectada a la columna y transportada a través de la columna por la fase móvil gaseosa llamada también gas acarreador. Los componentes de la muestra inyectada son separados unos de otros basándose en su presión de vapor relativa y su afinidad por la fase estacionaria.

Componentes básicos de un cromatógrafo de gases

- Bomba de gas: Distribuye el gas acarreador en la columna. El gas acarreador debe de ser inerte.
- Puerto de inyección: Introduce la muestra en la columna.
- Horno: Mantiene la temperatura deseada, ésta puede mantenerse constante o variar dependiendo del programa de interés. La columna se encuentra dentro del horno.
- Columna: En ella ocurre la separación de los analitos de la muestra. Se elaboran generalmente de cobre, acero inoxidable, aluminio, vidrio o teflón. En esta se encuentra la fase estacionaria que puede ser un sólido o un líquido recubriendo un sólido que actúa como soporte y tiene una gran área superficial.
- Detector: Éste revela la presencia de las sustancias eluidas a la salida de la columna cromatográfica.
- Registrador: Se emplea para la recolección de datos. El registrador recibe y almacena la señal emitida por los detectores e imprime el cromatograma.

En la cromatografía de gases de manera general ocurre lo siguiente: Se introduce la muestra al inyector del cromatógrafo de gases empleando una microjeringa. La

muestra es vaporizada y transportada por un gas inerte (fase móvil) a través de la columna que contiene a la fase estacionaria ocasionando su separación. Los componentes que eluyen de la columna pasan de uno en uno por el detector. Éste genera una señal eléctrica proporcional a su concentración la cual es recibida por el registrador el cual la traduce en un cromatograma (Reyes, 2006).

La identificación de cada componente registrado se hace por medio de los tiempos de retención que muestra cada uno al atravesar la columna. Estos tiempos de retención se correlacionan con los componentes mediante la inyección de los mismos en forma pura y en las mismas condiciones que la muestra, midiendo el tiempo de retención en esas condiciones. Mientras que el análisis cuantitativo puede realizarse mediante distintos métodos tales como: normalización de área, normalización de área con factores de respuesta, estandarización externa, estandarización interna y adiciones patrón (Medina, 2008).

Hipótesis

Si las levaduras aisladas de las fermentaciones de mezcal consumen la glucosa, fructosa y sacarosa contenida en los mostos produciendo compuestos importantes para el producto destilado como el etanol, entonces las levaduras producirán más etanol estando en combinación que de manera individual.

Objetivo

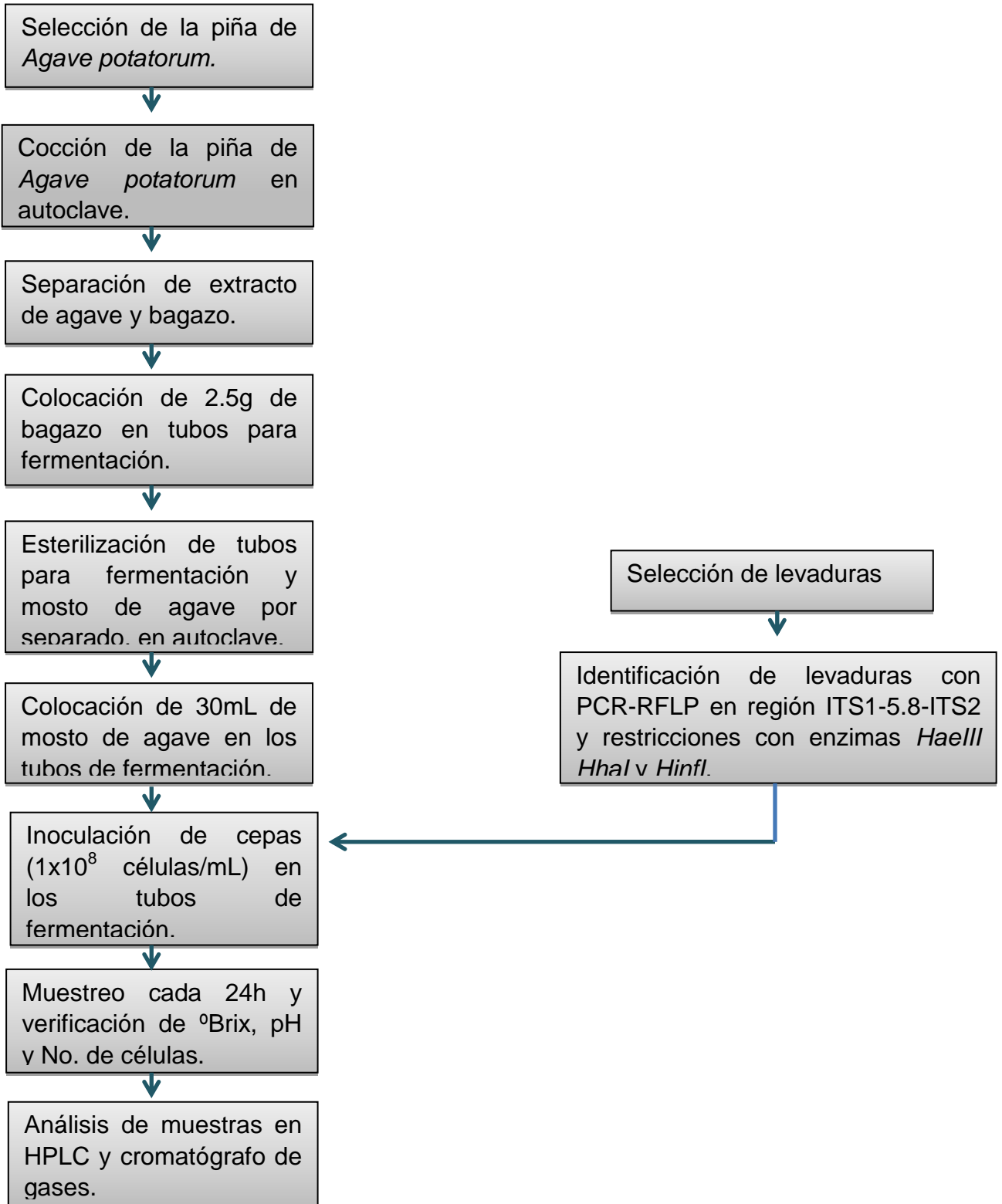
Objetivo general

Evaluar el consumo de azúcares y la producción de etanol y compuestos congénicos en mostos de *Agave potatorum* fermentados por las levaduras seleccionadas de manera individual, previamente aisladas de fermentaciones de mezcal, así como combinaciones de estas levaduras; para de este modo poder identificar qué compuestos produce cada levadura por separado en el mosto de agave y si al interactuar entre ellas producen los mismos compuestos o compuestos diferentes, en qué concentraciones y en qué tiempos.

Objetivos particulares

- Identificar a nivel de especie a tres levaduras, previamente aisladas de mostos de mezcal artesanal, empleando el método PCR-RFLP de la región 5.8S-ITS.
- Evaluar las diferencias en el consumo de azúcares en mostos de *Agave potatorum* entre las tres cepas de levaduras seleccionadas.
- Evaluar la producción de etanol y compuestos congénicos de las levaduras inoculadas de manera individual y en combinación en los mostos de *Agave potatorum*.

Metodología



Preparación de los mostos para las fermentaciones

Hidrólisis del tallo de *Agave potatorum*

Se recibió un ejemplar de *Agave potatorum* fresco proveniente del estado de Oaxaca. El agave fue cocido de la siguiente manera: Se cortó la piña del *Agave potatorum* en trozos pequeños y se colocaron en matraces de 1L, se les agregó 50mL de agua destilada para evitar que se pegaran en el fondo y se introdujeron al autoclave durante 3 horas a 121°C con el objetivo de hidrolizar los polifruktanos contenidos en la piña del Agave para hacerlos disponibles para su fermentación por las levaduras.

Preparación del mosto

Concluido este tiempo se separó el mosto del bagazo empleando un extractor de jugos (Tur Mix). Se verificó la concentración de sólidos solubles en el mosto por medio de la medición de °Brix utilizando un refractómetro (Atago, Brix 0.0 a 33.0%). Y se midió el pH del mosto con papel pH (Merck).

Se colocaron 2.5g de bagazo en cada uno de los tubos de fermentación (Falcon de 50mL). Mientras que el jugo hidrolizado procedente de la cocción de las piñas del Agave se colocó en matraces de 1L. Los tubos de fermentación con bagazo y los matraces con mosto de Agave se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15min. Posteriormente en una campana de flujo laminar se añadieron 30mL del mosto a cada tubo de fermentación que contenía 2.5g de bagazo.

Preparación de las cepas de levaduras para su inoculación en los tubos de fermentación

Procedencia de las cepas empleadas en las fermentaciones de los mostos de *Agave potatorum*

Se trabajó con tres cepas diferentes denominadas DI-14, JA-10 y JG-19 las cuales se encontraban almacenadas a -80°C en caldo YPD con 30% de glicerol como crioprotector. Estas cepas fueron previamente aisladas de fermentaciones artesanales de mezcal en el estado de Oaxaca, se habían agrupado con base en

los resultados obtenidos de los patrones de restricción del gen 26S, de las regiones D1 y D2, previamente amplificado empleando la técnica de PCR. Las cepas seleccionadas se encontraban dentro de los grupos que con mayor frecuencia se habían aislado de las fermentaciones artesanales de mezcal (Ruíz Terán, 2012).

Preparación de los inóculos para su empleo en mostos de *Agave potatorum*

Las cepas almacenadas se sembraron en agar YPD, posteriormente, tomando una colonia pura, se resembraron con la técnica de cuadrante radial en agar YPD. Se tomó una colonia aislada de cada cepa y se inocularon en medio YPD líquido por separado, pasadas 24 horas se observó el crecimiento de las levaduras en el medio, se re-inocularon en medio YPD líquido y se dejaron pasar otras 24 horas. Una vez concluido este tiempo se verificó que hubiera crecimiento en el medio y se hizo una dilución de 100µL de este medio en 900µL de agua destilada estéril, se tiñó con cristal violeta y a partir de estas muestras se realizó un conteo de levaduras en cámara de Neubauer (Boeco, deep 1/10mm). El objetivo de este conteo fue inocular un número de levaduras conocido en los tubos de fermentación. Se calculó el volumen de medio necesario para obtener el número de células/mL deseado para cada fermentación y se fue colocando 1mL a la vez en tubos Eppendorf hasta completar la cantidad deseada. Cada vez que se añadió 1mL a cada tubo se centrifugó a 14,000rpm y 24°C por 5 min (Eppendorf Centrifuge 5417R), se quitó el sobrenadante y se continuó añadiendo 1mL a la vez hasta completar la cantidad deseada. Posteriormente se re-suspendió el sedimento formado por las levaduras al fondo de cada Eppendorf con agua destilada estéril y se centrifugó con las mismas condiciones anteriores, este paso se repitió 3 veces con cada cepa en cada tubo. Una vez concluido este procedimiento se inocularon en cada tubo de fermentación las cepas contenidas en cada tubo Eppendorf.

Se llevaron a cabo en total siete fermentaciones diferentes con sus duplicados, tres con cada una de las cepas por separado, tres con combinaciones de las mismas y una con las tres cepas juntas (Figura 6). Cada tubo estaba tapado con un tapón de algodón que permitía el paso de aire manteniendo un ambiente libre

de otros microorganismos. Las fermentaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

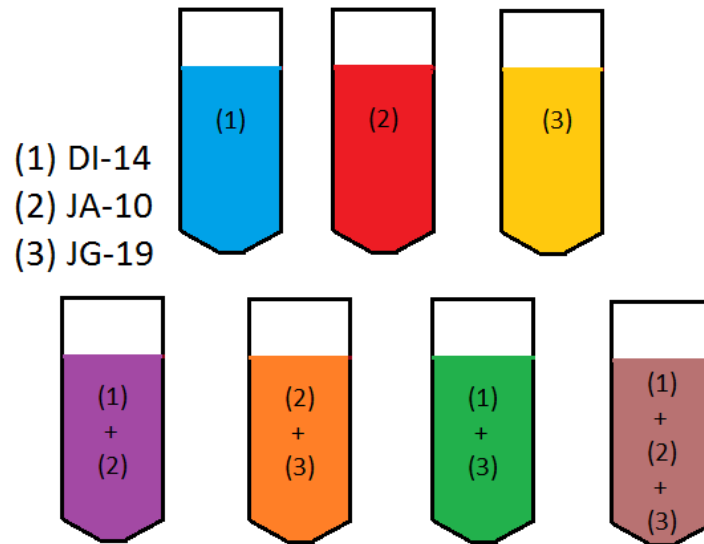


Figura 6. Representación de las siete fermentaciones llevadas a cabo con las cepas seleccionadas de manera individual en los mostos de fermentación y en combinación.

Muestreo de las fermentaciones

Se tomaron muestras cada 24 horas, en una campana de flujo laminar, previamente se mezcló el contenido de cada tubo de fermentación con la punta de la pipeta con la que se realizó cada muestreo. En tubos Eppendorf se colocaron 1.5mL de mosto fermentado de Agave y se tomaron duplicados por cada tubo de fermentación. Se realizó la determinación de pH, °Brix y conteo de células en cada muestra y se conservaron en congelación a -18°C para su posterior análisis.

Determinación de concentración de sólidos solubles (°Brix), pH y células en cada muestra

La determinación de sólidos solubles se realizó colocando unas gotas del mosto fermentado de agave de cada muestra en un refractómetro (Atago, Brix 0.0 a 33.0%). Una vez realizada cada medición se limpió el refractómetro con agua destilada y un paño húmedo.

La determinación de pH se llevó a cabo con tiras de papel pH. Se puso en contacto la parte reactiva de la tira de papel pH con el mosto fermentado y se comparó el color del papel con los colores marcados en la caja de la cual provenían.

Para la determinación de número de células se tomaron 100µL de mosto fermentado de cada muestra en un tubo Eppendorf, se diluyeron con 900µL de agua destilada estéril y se tiñeron con cristal violeta. Estas diluciones se emplearon para realizar un conteo de número de células en cámara de Neubauer con el fin de determinar la cantidad de células a lo largo de cada fermentación. Se limpió la cámara de Neubauer con una torunda de algodón limpio con etanol al 70% junto con un cubreobjetos, una vez secos se colocó el cubreobjetos encima de la cámara, se tomó un poco de la dilución con colorante con una micropipeta de 100µL y se colocó el líquido entre la superficie de la cámara y la parte inferior del cubreobjetos. Este preparado se observó al microscopio (Zeiss-Axio) empleando un objetivo de 40X y una lente 10X/20. Se contaron las células observadas dentro de cinco cuadros grandes (cuatro a los extremos y uno al centro) y se anotaron los números obtenidos para calcular posteriormente la cantidad de células empleando la siguiente ecuación:

$$\text{No. de células}/\mu\text{L} = \frac{(\text{No. de células contadas})(\text{Dilución})}{(\text{No. de cuadros contados})(0.04 * 0.1)}$$

Los valores 0.04 y 0.1 corresponden al área y la profundidad de cada cuadro respectivamente.

Determinación de azúcares y ácidos orgánicos empleando HPLC

Las muestras se retiraron del congelador y se colocaron a temperatura ambiente, al descongelarse se centrifugaron a 14,000rpm, 4°C por 20min. El sobrenadante se tomó con una jeringa y se filtró a través de una membrana de 0.22µm de diámetro de poro (Milipore). El filtrado se colocó en viales y se introdujeron al cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Fase móvil H₂SO₄, 45°C, flujo 0.6mL/min, condiciones isocráticas, Columna Bio-Rad Aminex HPX-87H [300mm x 7.8mm], Inyector Waters 2707, Bomba Waters 1525) para su análisis. En éste se analizó la concentración de glucosa, fructosa, sacarosa, ácido láctico y ácido acético con un detector IR (Waters 2414).

Determinación de etanol y compuestos congenéricos empleando el cromatógrafo de gases

El mismo filtrado se utilizó para el análisis de etanol y compuestos congenéricos en el cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6890N, Columna JW19091N-133, INNOWAX Capillary [30m x 250µm x 0.25µm] Inyección 1µL, Tanques Aga (H₂, N₂, Aire), Inlets Mode Split Gas H₂ (40°C, 80.6 psi, flujo 77.9mL/min)).

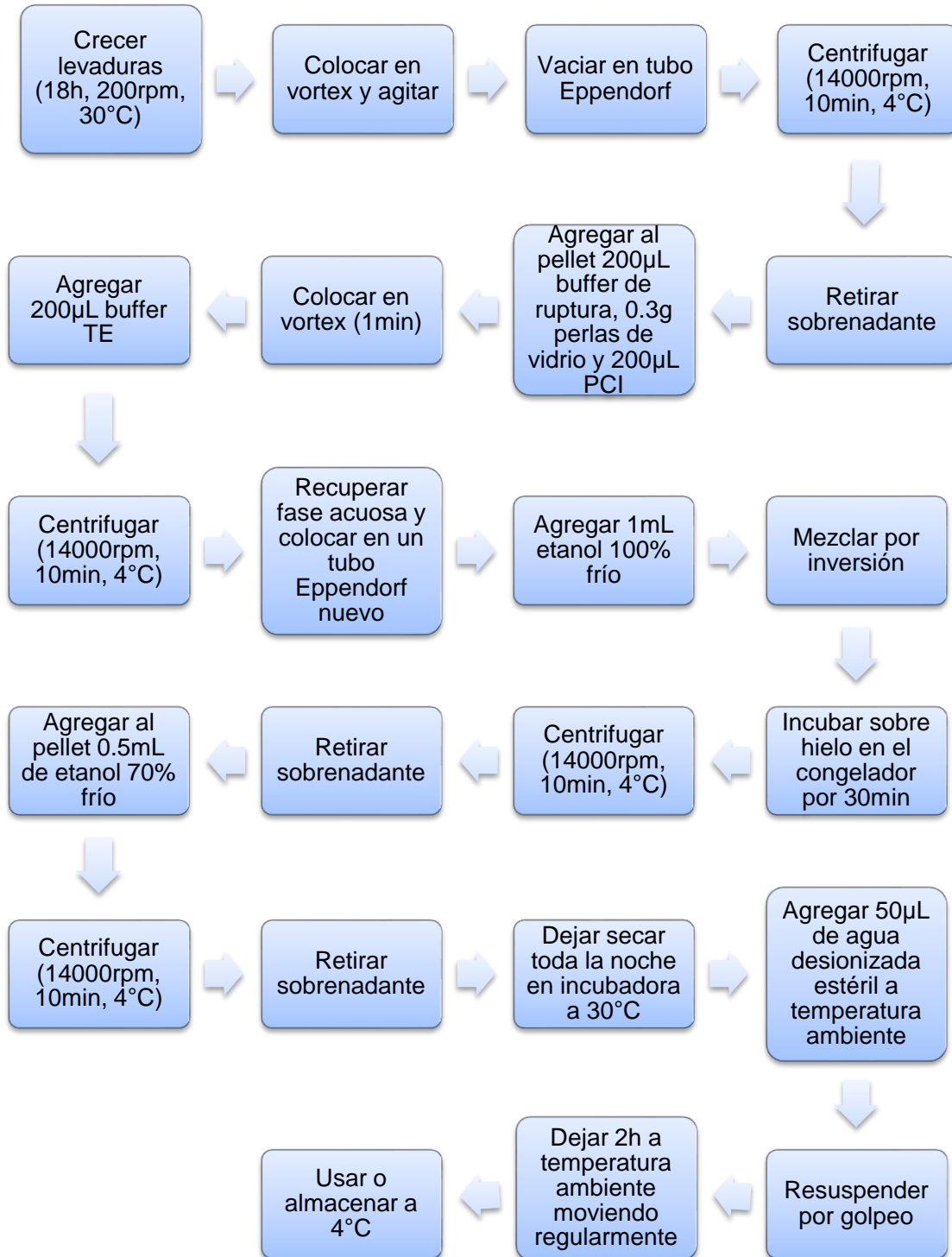
Identificación de las cepas de las levaduras aisladas

Para identificar a las cepas se utilizó el método de PCR-RFLP de las siguientes regiones:

- ITS1-5.8-ITS2 (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999)

PCR-RFLP

La extracción de ADN se llevó a cabo con el siguiente procedimiento:



Para la reacción de PCR se utilizaron los siguientes reactivos:

1) Cebadores [0.5µM]: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTAGATATGC-3'), 2) ADN templado [50ng/µL], 3) dNTPs [10µM] , 4) Taq polimerasa recombinante [1U], 5) Buffer [1X] para PCR y 6) MgCl₂ [1.5mM]. El volumen final de la reacción fue de 50µL.

El programa de temperaturas utilizado para cada par de cebador se describe a continuación:

Tabla 2. Condiciones de amplificación para la región 5.8S-ITS

Cebadores	Programa de temperaturas
ITS1 ITS4	Desnaturalización inicial de 5 min a 95°C y después 35 ciclos de: 1 min de desnaturalización a 95°C, 2 min de alineamiento a 52°C y 2 min de extensión a 72°C, seguidas por una extensión final de 10 min a 72°C.

El producto de la amplificación se separó por medio de una electroforesis en un gel de agarosa (Pharmacia Biotech GNA 100) al 1% con buffer Tris/Borato/EDTA (TBE) 0.5X a 100V durante 30 minutos, el ADN se tiñó con bromuro de etidio (0.5µg/mL) y se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb. Los resultados se visualizaron en un fotodocumentador y las imágenes fueron capturadas y analizadas utilizando el programa Kodak MI 5.0 SE.

Para el análisis de restricción se tomaron alícuotas de 10µL del producto de PCR, a las cuales se agregaron 2.5µL de buffer de restricción y 1U de la enzima de restricción, el volumen final de reacción se ajustó en 25µL; la mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 3 h. Las enzimas de restricción utilizadas fueron *HaeIII*, *HhaI*, *Hinfl* (Roche). (Cova,C., 2010).

El producto de la restricción se separó por medio de una electroforesis en un gel de agarosa (Pharmacia Biotech GNA 100) al 1.5% con buffer TBE 0.5X a 70V durante 90 minutos, el ADN se tiñó con bromuro de etidio (0.5µg/mL) y se utilizó

un marcador de peso molecular de 100pb. Los resultados se visualizaron en un fotodocumentador y las imágenes fueron capturadas y analizadas utilizando el programa Kodak MI 5.0 SE.

Los patrones de restricción obtenidos para cada cepa así como los productos de PCR fueron analizados comparándolos con una base de datos en la Universidad de Valencia la cual fue generada por el grupo de Amparo Querol.

También se llevó a cabo la secuencia de las cepas amplificando la región D1, D2 del gen ribosomal 26S. Se amplificó utilizando los primers NL y NL2 y se secuenció.

Análisis estadístico

Cada fermentación se llevó a cabo por duplicado y se tomaron muestras cada 24h aproximadamente de cada uno de los tubos de fermentación. A cada muestra se le realizaron los análisis pertinentes y con ello para cada muestra de cada fermentación se obtuvieron los datos por duplicado. A partir de éstos se calculó el promedio, desviación estándar, intervalo de tolerancia y coeficiente de variación porcentual.

Resultados y Discusión

Identificación a nivel de especie de las cepas de las levaduras aisladas

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos de la reacción de PCR con los cebadores ITS1-5.8S-ITS4 así como los resultados obtenidos de las restricciones llevadas a cabo con las enzimas *HaeIII*, *HhaI* y *HinfI*.

Tabla 3. Tamaño del amplicón de la región 5.8S-ITS y de los fragmentos de restricción obtenidos con las enzimas *HaeIII*, *HhaI* y *HinfI*.

CEPA	PCR (ITS-5.8S) (pb)	<i>HaeIII</i>				<i>HhaI</i>			<i>HinfI</i>		
DI-14	816.7	320.5	233	179	133	338.9	316.7	137.8	361.5	126.3	
JA-10	483.3	210	184			221.1	168		373.3		
JG-19	475	300	182.6			236.8			200	160.9	108.7

Los productos de PCR muestran gran variación entre especies, desde los 475pb hasta los 816pb. Los resultados obtenidos de las restricciones fueron comparados con la base de datos generada por el grupo de Amparo Querol de la Universidad de Valencia y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Los patrones de restricción obtenidos de la cepa DI-14 así como su producto de PCR muestran que se trata de *Saccharomyces cerevisiae*. Los resultados obtenidos para la cepa JA-10 indica que se trata de una cepa de *Issatchenkia spp.*, mientras que los patrones de restricción de la cepa JG-19 muestran que se trata de una cepa de *Pichia spp.*

Se llevó a cabo la secuenciación del material genético de estas tres cepas. Las secuencias fueron comparadas utilizando el programa BLAST y se consultó el banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se encontró, con un porcentaje de identificación del 97%, que la cepa DI-14 es *Saccharomyces cerevisiae*, la cepa JA-10 es *Issatchenkia orientalis*, con 99% de identificación, y la cepa JG-19 es *Pichia manshurica*, con 99% de identificación.

Estas cepas fueron aisladas de fermentaciones anteriores de mezcal de diferentes casas productoras de esta bebida en el estado de Oaxaca y fueron agrupadas con base en los resultados obtenidos del método PCR-RFLP de las regiones D1 y D2 del gen ribosomal 26S de las mismas. Se seleccionaron las cepas mencionadas para este proyecto debido a la alta frecuencia con que se les encuentra entre las cepas aisladas. Ello nos indica que estas cepas se encuentran frecuentemente durante la fermentación del mezcal y que por lo tanto contribuyen de manera importante a la producción del mismo así como a las características que definen al producto final.

Pichia manshurica es una levadura comúnmente encontrada en fermentaciones naturales, incluyendo plantas en proceso de putrefacción (Kurtzman *et al.*, 2011). Se ha identificado la presencia de *Issatchenkia orientalis* en frutas y jugos de frutas y ha sido empleada en la fermentación de mostos de uva junto con *Saccharomyces cerevisiae* con el fin de reducir el contenido de ácido málico en el vino como producto final (Kim *et al.*, 2008). Mientras que *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura de la que mayor conocimiento se posee debido a que ha sido una gran protagonista en un sinnúmero de procesos fermentativos naturales.

El análisis de la secuenciación de las regiones D1 y D2 del gen 26S llevado a cabo anteriormente para el agrupamiento de las cepas aisladas de las fermentaciones de mezcal fue de gran utilidad para la clasificación de las mismas. De acuerdo con Kurtzman *et al.*, 1998, la mayor parte de las levaduras ascomicetes conocidas pueden ser identificadas por las secuencias únicas de sus regiones D1 y D2. Consecuentemente el uso de una base de datos tiene el potencial de incrementar de manera notoria la precisión de la identificación de levaduras y el esfuerzo requerido para ello es menor al que se necesita para la preparación de pruebas estándar de asimilación y fermentación que son menos confiables.

Análisis del consumo y producción de compuestos durante las fermentaciones

Los resultados obtenidos del conteo de células, pH, °Brix y concentración de sacarosa, glucosa, fructosa, ácido láctico, ácido acético, etanol y acetato de etilo en los mostos fermentados con las diferentes levaduras a lo largo del tiempo de fermentación se muestran en las siguientes gráficas.

El desarrollo de los ensayos de fermentación en el laboratorio se llevó a cabo midiendo los cambios en los sólidos solubles (°Brix), cuenta de células y el pH. Una vez concluidas las fermentaciones se analizaron las concentraciones de sacarosa, glucosa, fructosa, ácido láctico, ácido acético, etanol y acetato de etilo en las diferentes muestras tomadas en distintos tiempos de cada fermentación. Los resultados se presentan en el promedio obtenido de las dos repeticiones realizadas con cada cepa y las combinaciones de estas mientras que la desviación estándar obtenida de ambos datos se muestra en las barras de error en cada punto de las gráficas.

Fermentación realizada con la cepa DI-14 (*Saccharomyces cerevisiae*)

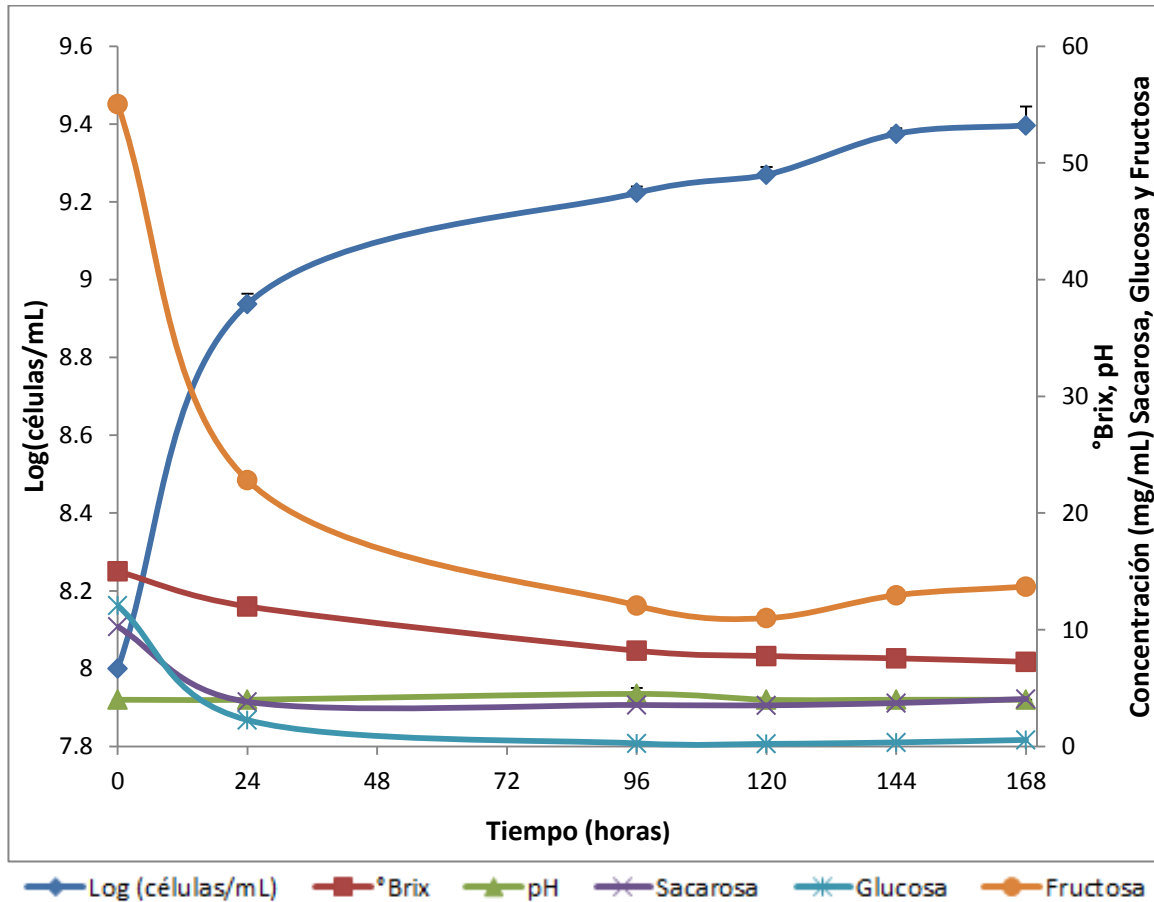


Figura 7. Número de células (células/mL), porcentaje de concentración de los sólidos solubles en el mosto (°Brix), pH y concentración (mg/mL) de sacarosa, glucosa y fructosa de la fermentación llevada a cabo con la cepa DI-14 con respecto al tiempo.

En la Figura 7 se observa que la cepa DI-14 tiene un crecimiento acelerado hasta las 96 horas de inicio de la fermentación, a partir de este tiempo el crecimiento comienza a ser más lento.

La concentración de los sólidos solubles contenidos en el mosto, que fue medido con el refractómetro, comienza en 15°Bx y a partir de esta concentración se observa que disminuye a lo largo del tiempo de fermentación hasta llegar a un valor mínimo de 7°Bx al final del proceso de fermentación. Se observa una disminución importante de sólidos solubles en el mosto hacia las 96 horas coincidiendo con la información presentada por la curva de crecimiento. El valor

mínimo de sólidos solubles junto con el hecho de que ya no se observaba producción de gas en los tubos de fermentación fueron indicativos de que ésta ya había concluido.

A lo largo de la fermentación se observa un pH prácticamente constante de 4. En la Figura 8 se observa una baja producción de ácido láctico y ácido acético.

En la Figura 7 se observa que la concentración de sacarosa inicial es de 10mg/mL aproximadamente y que a partir de ahí esta concentración disminuye a 3mg/mL aproximadamente manteniéndose en valores similares a lo largo del resto de la fermentación. En cuanto a la glucosa se observa que su concentración inicial es cercana a la de la sacarosa y que también disminuye a lo largo de la fermentación hasta llegar a valores próximos a 0mg/mL. La fructosa presenta desde el inicio concentraciones mucho mayores a las de los otros hidratos de carbono mencionados y también disminuye con el tiempo hasta una concentración de 13mg/mL. El agave tiene un alto contenido de fructanos y al ser cocinado los fructanos contenidos en el mismo se hidrolizan en azúcares simples, principalmente fructosa (Verdugo *et al.*, 2011) por ello se esperaba que en el mosto hubiera un mayor contenido de fructosa que de glucosa y sacarosa. Estos carbohidratos son empleados por las levaduras para llevar a cabo la fermentación convirtiéndolos en etanol, CO₂, ácidos orgánicos y otros compuestos congénéricos que le otorgan al mezcal sus sabores y aromas característicos.

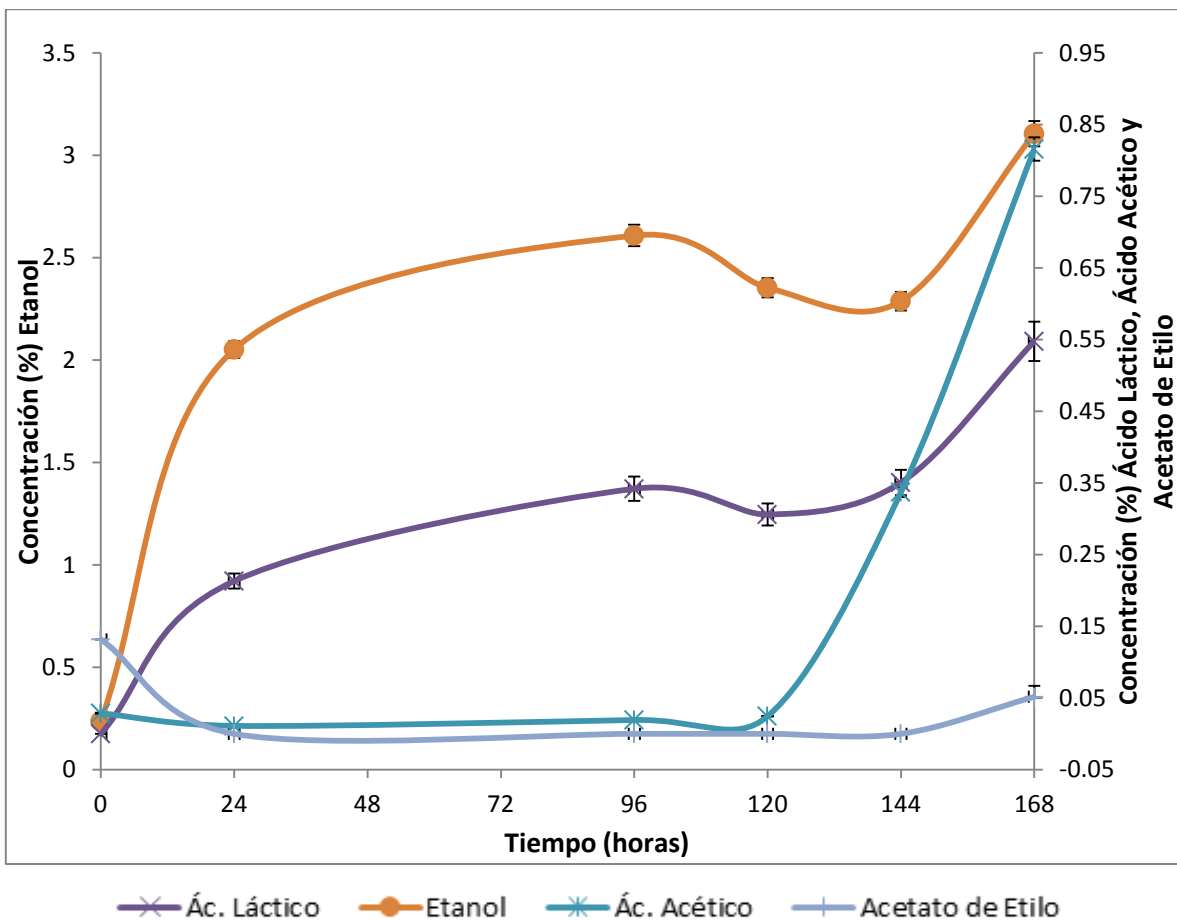


Figura 8. Concentración (% v/v) de ácido láctico, ácido acético, etanol y acetato de etilo de la fermentación llevada a cabo con la cepa DI-14 con respecto al tiempo.

En la Figura 8 se observa que hay una producción importante de etanol hacia las 96 horas de fermentación tras lo cual los valores de concentración de este alcohol disminuyen para volver a aumentar al final de la fermentación llegando arriba de 3%. La disminución de la concentración de etanol puede deberse a la evaporación del mismo durante la fermentación ya que éste es un compuesto volátil a temperatura ambiente. Sin embargo se observa que la producción del mismo se encuentra estrechamente relacionado con la curva de crecimiento que se da durante esta fermentación (Figura 7). Ya que ésta nos muestra que las levaduras se encuentran en su fase exponencial de crecimiento hasta las 96 horas de fermentación para entrar posteriormente en su fase estacionaria de crecimiento. Durante la fase exponencial se observa una mayor producción de etanol al igual que un mayor consumo de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) en el mosto y

al llegar a la fase estacionaria se observa una disminución en el consumo de estos carbohidratos así como en la producción de etanol.

De acuerdo con la identificación a nivel especie realizada con esta levadura se encontró que se trata de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. De esta especie de levadura se sabe que es tolerante al etanol; sin embargo, concentraciones relativamente altas de este compuesto pueden inhibir su crecimiento y viabilidad, limitando la productividad de la fermentación y bajando la producción de etanol (Stanley *et al.*, 2010).

La producción de acetato de etilo durante la fermentación no fue detectada por el cromatógrafo de gases.

Se observa en la Figura 8 que durante la fermentación hay una producción muy baja de ácido láctico y ácido acético. Para ambos la concentración no excede 1% a lo largo de toda la fermentación. Por lo que se puede decir que la levadura utilizada no tiene al ácido láctico ni al ácido acético como productos principales de sus vías metabólicas de fermentación y con ello se puede explicar la poca variación que hay en el pH del mosto a lo largo de la fermentación. Sin embargo se observa un aumento en la producción de ácido acético a partir de la hora 120 y hacia el final de la fermentación (Figura 8). Este aumento puede deberse a la formación de este compuesto a partir de acetaldehído, éste último se forma inmediatamente antes del etanol y se transforma directamente por oxidación en ácido acético (Hidalgo, 2010), pudiendo deberse a ello la disminución en la concentración de etanol a las 120 y 144 horas.

Se llevó a cabo el cálculo del rendimiento en cuanto al consumo de glucosa, fructosa y sacarosa en el mosto y la producción de etanol y ácido láctico en el mismo. Se encontró que el 41.53% de los azúcares consumidos durante la fermentación fue transformado a etanol y el 11.23% a ácido láctico.

Fermentación realizada con la cepa JA-10 (*Issatchenkia orientalis*)

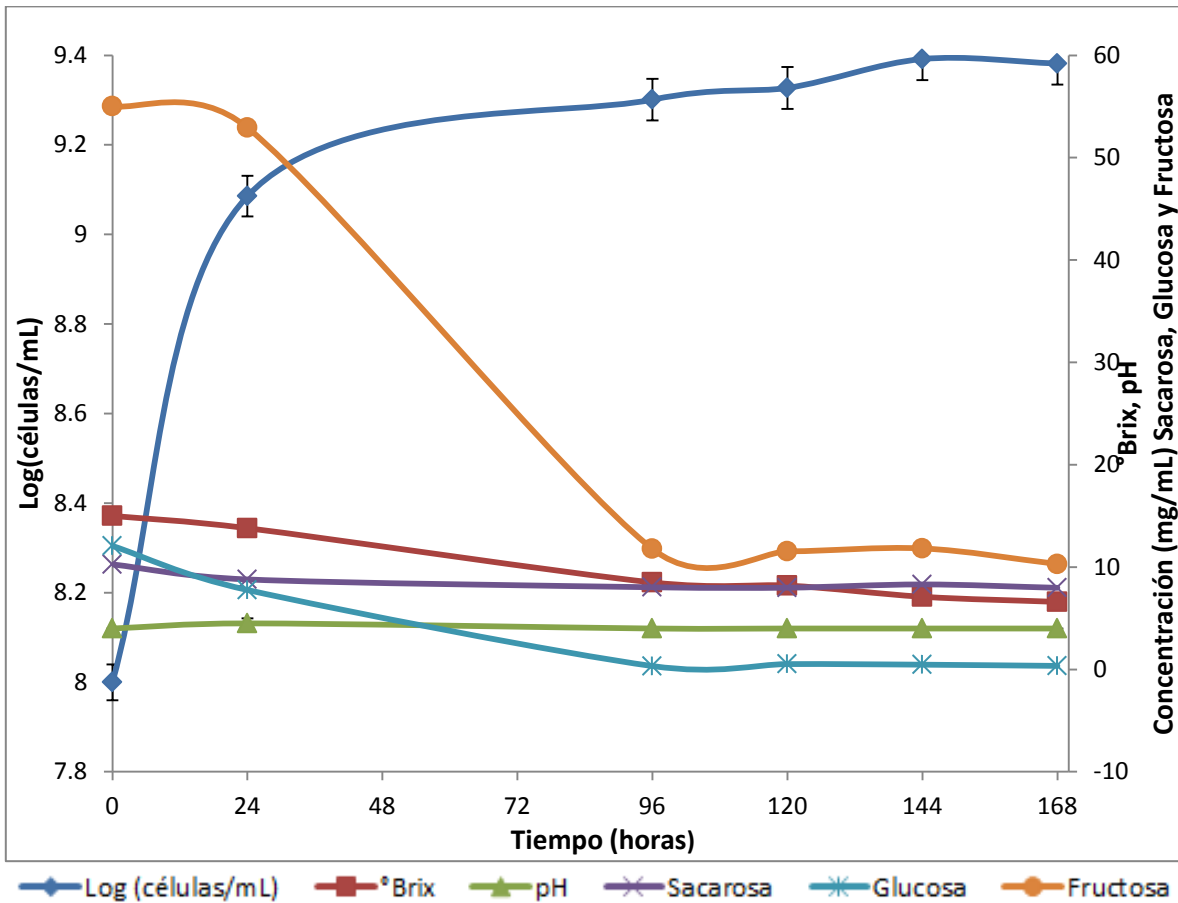


Figura 9. Número de células (células/mL), porcentaje de concentración de los sólidos solubles en el mosto (°Brix), pH y concentración (mg/mL) de sacarosa, glucosa y fructosa de la fermentación llevada a cabo con la cepa JA-10 con respecto al tiempo.

La curva de crecimiento logarítmica, en la Figura 9, muestra que las levaduras de la cepa JA-10 alcanzan su punto máximo de crecimiento a las 96 horas de fermentación. Posteriormente este número se mantiene casi constante hacia el final de la fermentación.

La concentración de solutos en el mosto es de 15°Bx inicialmente y ésta disminuye hasta llegar a una concentración de 7°Bx aproximadamente. Se observa que la concentración de solutos solubles en el mosto disminuye de manera importante hacia las 96 horas de fermentación y a partir de este momento continúa disminuyendo pero de manera lenta (Figura 9). Analizando estos datos

junto con los proporcionados por la curva de crecimiento logarítmico se observa que a las 96 horas de inicio de la fermentación es el momento en que las levaduras alcanzan su fase estacionaria de crecimiento. Debido a ello al inicio de la fermentación, mientras las levaduras se encuentran en fase exponencial de crecimiento, hay una disminución muy marcada de los solutos contenidos en el mosto, que son sustrato para las levaduras. Después de 96 horas la presencia de estos solutos disminuye por lo que las levaduras entran en su fase estacionaria de crecimiento.

En la Figura 9 se observa que el pH a lo largo de la fermentación permanece prácticamente constante. Mientras que en la Figura 10 se puede apreciar que hay una producción baja tanto de ácido acético como de ácido láctico.

La concentración de sacarosa muestra un descenso de aproximadamente 2mg/mL a las 24 horas del inicio de la fermentación y posteriormente se observa que permanece en concentraciones cercanas a 8mg/mL a lo largo del resto de la fermentación. La glucosa presenta un decremento importante hacia las 96 horas de fermentación y a partir de este punto permanece con valores casi constantes cercanos a 0mg/mL. La fructosa tiene concentraciones mucho mayores a la de la sacarosa y la glucosa, al igual que en la fermentación con la cepa DI-14, y su concentración disminuye constantemente hasta las 96 horas del tiempo de fermentación y se muestra constante hasta el final de la misma. Estos valores concuerdan con la curva de crecimiento logarítmico de la levadura JA-10 (Figura 9) en la que se muestra que la fase exponencial de crecimiento dura hasta las 96 horas de fermentación. Durante esta fase de crecimiento las células se replican a gran velocidad y consumen los nutrientes presentes en el mosto con rapidez hasta que éstos comienzan a agotarse y las levaduras entran en la fase estacionaria de crecimiento en la que la replicación de las células se ralentiza considerablemente. Esta fase aparentemente ocurre después de las 96 horas de acuerdo con la curva de crecimiento y en concordancia también con las concentraciones de sacarosa, glucosa y fructosa en el mosto.

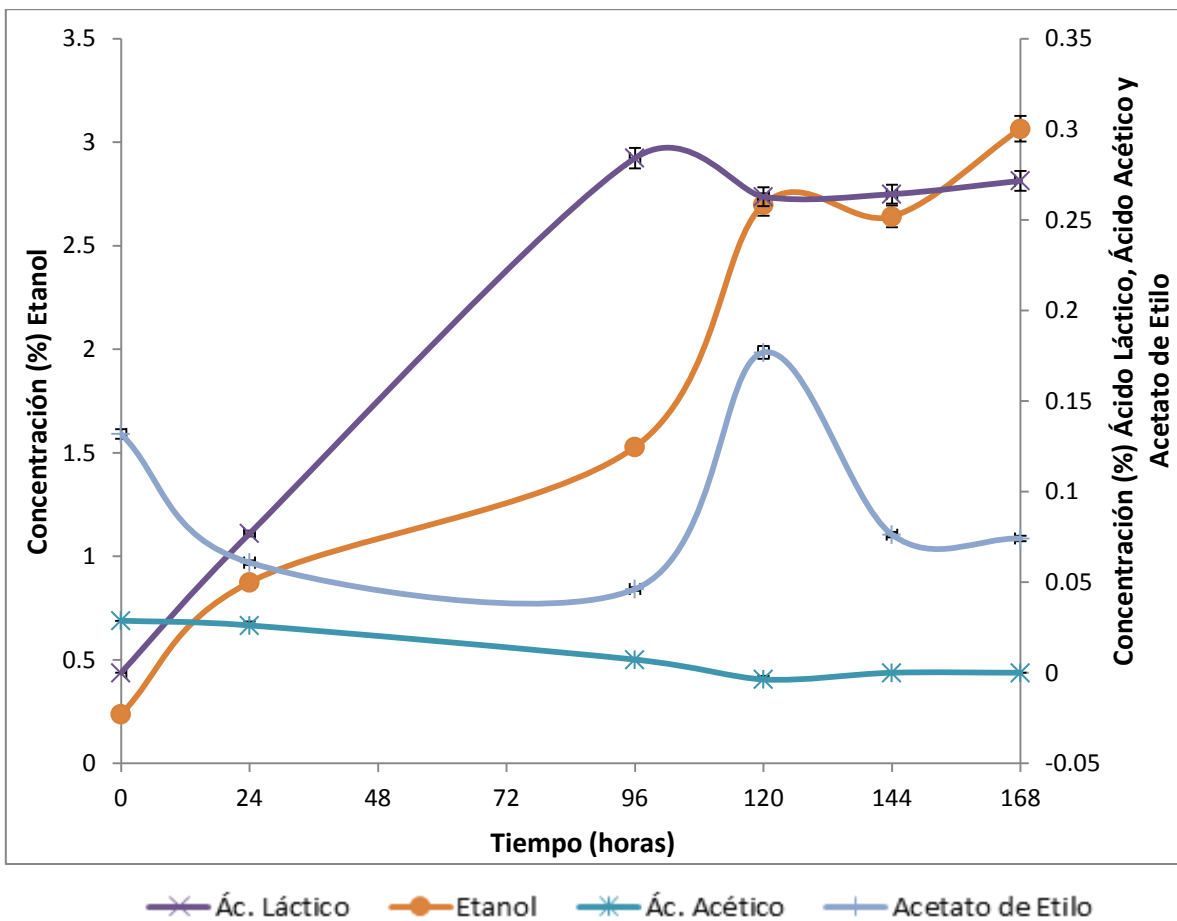


Figura 10. Concentración (% v/v) de ácido láctico, ácido acético, etanol y acetato de etilo de la fermentación llevada a cabo con la cepa JA-10 con respecto al tiempo.

A lo largo de la fermentación se observa una producción de etanol continua y que aparentemente no se encuentra relacionada con la curva de crecimiento de la levadura. La máxima concentración de etanol detectada en la fermentación es mayor a 3% al final de la misma. En cuanto al acetato de etilo se observa que alcanza su máxima concentración a las 120 horas de fermentación y ésta disminuye posteriormente (Figura 10).

La concentración de ácido láctico en el mosto aumenta hasta llegar a 0.3% aproximadamente hacia las 96 horas de fermentación y posteriormente disminuye ligeramente hasta su valor final de 0.27%. En cambio la concentración de ácido acético inicial en el mosto tiene valores aproximados de 0.028% y ésta disminuye hacia las 96 horas de fermentación para permanecer con valores cercanos a 0%

durante el resto de la fermentación. El ácido acético en combinación con el etanol estando en un medio ácido forman acetato de etilo. A esta reacción se le conoce como esterificación de Fischer-Speier en la que se forma un éster por reflujo de un ácido carboxílico y un alcohol en presencia de un catalizador ácido (Griffin, 1981) y podría explicar la disminución de ácido acético en el mosto. Sin embargo, debido a la identificación a nivel de especie llevada a cabo con esta cepa, se sabe que la cepa analizada se trata de *Issatchenkia orientalis*, la cual está indicada como una levadura que no tiene al ácido acético como producto de sus vías metabólicas de fermentación (CBS-KNAW, 2012).

Debido a la baja producción de ácido láctico y ácido acético se puede explicar la baja variación de pH en el mosto fermentado.

El rendimiento de la producción de etanol y ácido láctico con base en el consumo de azúcares en el mosto, sacarosa, glucosa y fructosa, para esta fermentación fue de 41.09% para el etanol y 5.74% para el ácido láctico.

Fermentación realizada con la cepa JG-19 (*Pichia manshurica*)

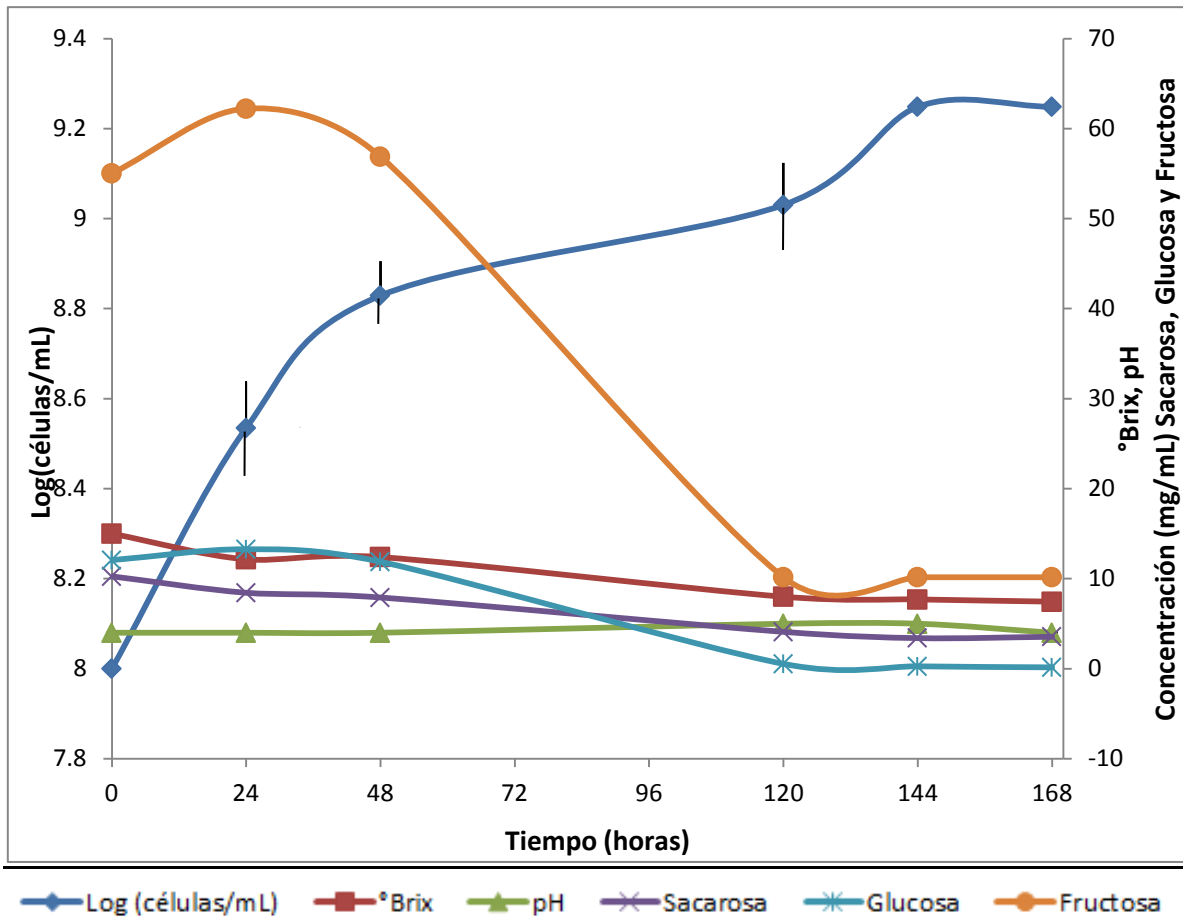


Figura 11. Número de células (células/mL), porcentaje de concentración de los sólidos solubles en el mosto (°Brix), pH y concentración (mg/mL) de sacarosa, glucosa y fructosa de la fermentación llevada a cabo con la cepa JG-19 con respecto al tiempo.

La curva de crecimiento logarítmico de la cepa JG-19 muestra que las levaduras entran en su fase estacionaria de crecimiento hacia las 144 horas de inicio de la fermentación (Figura 11).

La concentración de solutos en el mosto es de 15°Bx inicialmente tras lo cual se observa una disminución de esta concentración a las 120 horas llegando a valores de 8°Bx y posteriormente la concentración permanece con valores similares hasta el final de la fermentación.

El pH en el mosto permanece constante a lo largo de la fermentación. Esto puede deberse a la baja producción de ácido acético y ácido láctico.

La Figura 11 muestra que la sacarosa presenta un descenso importante en su concentración a las 120 horas de iniciada la fermentación y a partir de este tiempo permanece prácticamente constante hasta el final de la fermentación. La glucosa en el mosto muestra un aumento hacia las 24 horas de fermentación y posteriormente una disminución constante hasta las 120 horas llegando a valores cercanos a 0mg/mL para permanecer de este modo hasta el final del tiempo de fermentación.

La fructosa nuevamente presenta valores mucho mayores a los de la sacarosa y glucosa (55mg/mL) y presenta, al igual que la glucosa, un aumento en su concentración a las 24 horas de iniciada la fermentación para después disminuir a 10mg/mL a las 120 horas de fermentación. Posteriormente muestra valores casi constantes hasta el final (Figura 11).

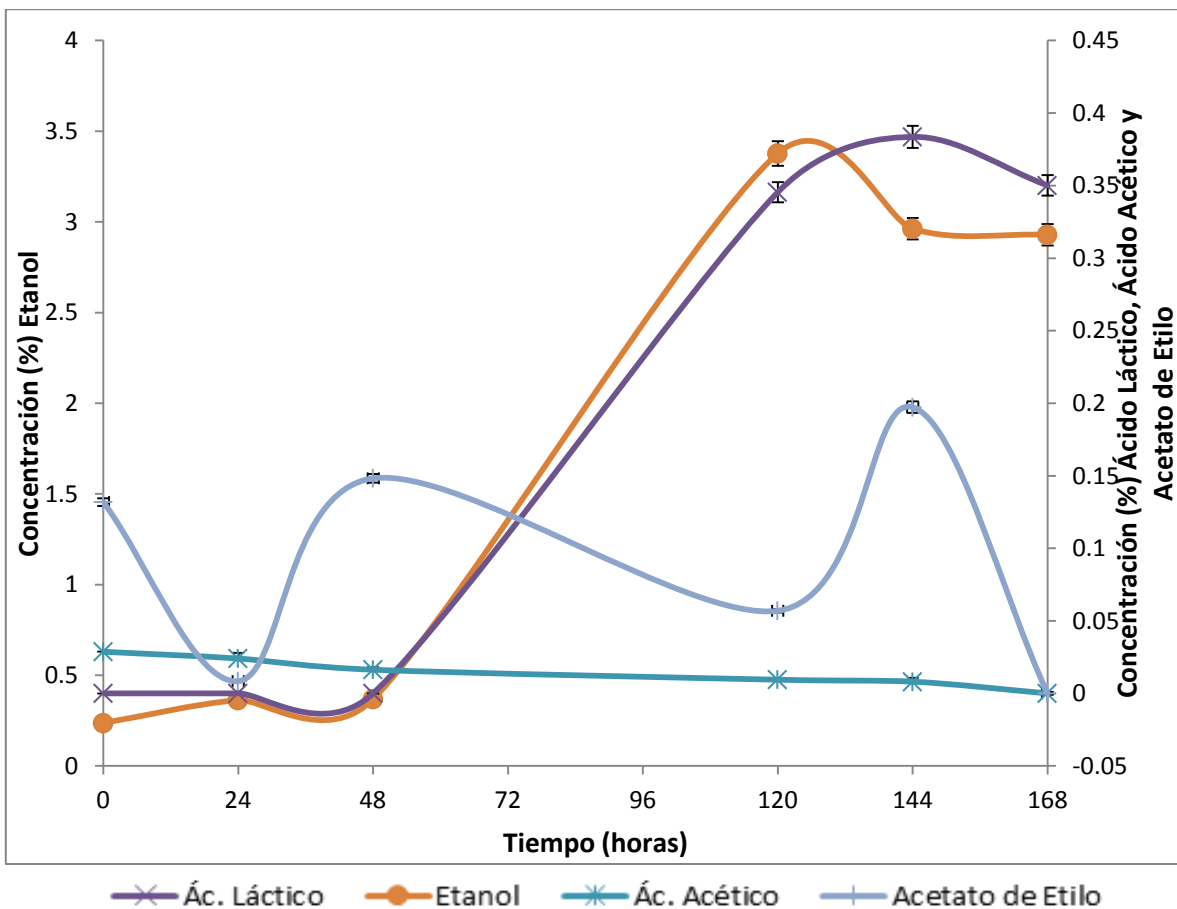


Figura 12. Concentración (% v/v) de ácido láctico, ácido acético, etanol y acetato de etilo de la fermentación llevada a cabo con la cepa JG-19 con respecto al tiempo.

La concentración de etanol en el mosto muestra un aumento considerable de las 48 horas a las 120 horas de fermentación, posteriormente disminuye un poco hasta llegar a una concentración final de 2.9% (Figura 12).

La producción de ácido láctico llega a su valor máximo de 0.4% aproximadamente a las 144 horas de fermentación para disminuir hacia el final a 0.35%. El ácido acético permanece en concentraciones cercanas a cero a lo largo de la fermentación. Mientras que el acetato de etilo llega a una concentración máxima de 0.2% a las 144 horas de fermentación para disminuir nuevamente hacia el final de la misma llegando a 0.04%. El acetato de etilo es un compuesto volátil a temperatura ambiente. La identificación a nivel de especie llevada a cabo para la cepa JG-19 nos indica que se trata de una cepa de *Pichia manshurica*. Se ha

encontrado que esta especie no tiene al ácido acético como producto de sus vías metabólicas fermentativas (CBS-KNAW, 2012).

El rendimiento de la producción de etanol y ácido láctico con respecto al consumo de glucosa, fructosa y sacarosa para esta fermentación fue de 41.38% para el etanol y 7.13% para el ácido láctico.

Mediante el análisis de las fermentaciones llevadas a cabo con las tres cepas (DI-14, JA-10 y JG-19) por separado se observa que todas las cepas muestran una preferencia por el consumo de fructosa, luego de glucosa y por último de sacarosa. La cepa DI-14 (*S. cerevisiae*) fue la que mostró una mayor producción tanto de ácido láctico como de ácido acético. La cepa JA-10 (*I. orientalis*) produjo más ácido acético que la cepa JG-19 (*P. manshurica*) mientras que los resultados de las fermentaciones llevadas a cabo por esta última muestran mayor concentración de ácido láctico que la cepa JA-10. Sin embargo el ácido acético en presencia de etanol y un medio ácido forman acetato de etilo por lo que parte de la producción de este ácido pudo haber sido transformada a este compuesto.

Todas las cepas presentaron una producción similar de etanol. Presentando concentraciones finales de este compuesto cercanas al 3%. La cepa DI-14 tuvo una producción de acetato de etilo prácticamente nula mientras que las cepas JA-10 y JG-19 mostraron concentraciones máximas de acetato de etilo cercanas a 0.2%. Esto se debió probablemente a que las levaduras *Saccharomyces* sintetizan menos acetato de etilo que las *no-Saccharomyces* (Plata *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 2001). Este compuesto en bajas concentraciones, menores a 50mg/L, puede ser positivo en cuanto a las características sensoriales y aportar complejidad al aroma del mezcal; sin embargo, en concentraciones por encima de 150mg/L puede aportar olor a vinagre a la bebida (Amerine *et al.*, 1983).

El consumo de hidratos de carbono en los mostos de fermentación en general corresponde a las gráficas obtenidas con sus curvas de crecimiento durante estas fermentaciones; es decir, durante la fase exponencial de crecimiento de las levaduras se observa un mayor consumo de azúcares en el mosto el cual se

ralentiza cuando las células alcanzan la fase estacionaria en la curva de crecimiento logarítmico.

Fermentación realizada con las cepas DI-14 y JG-19 (*Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia manshurica*)

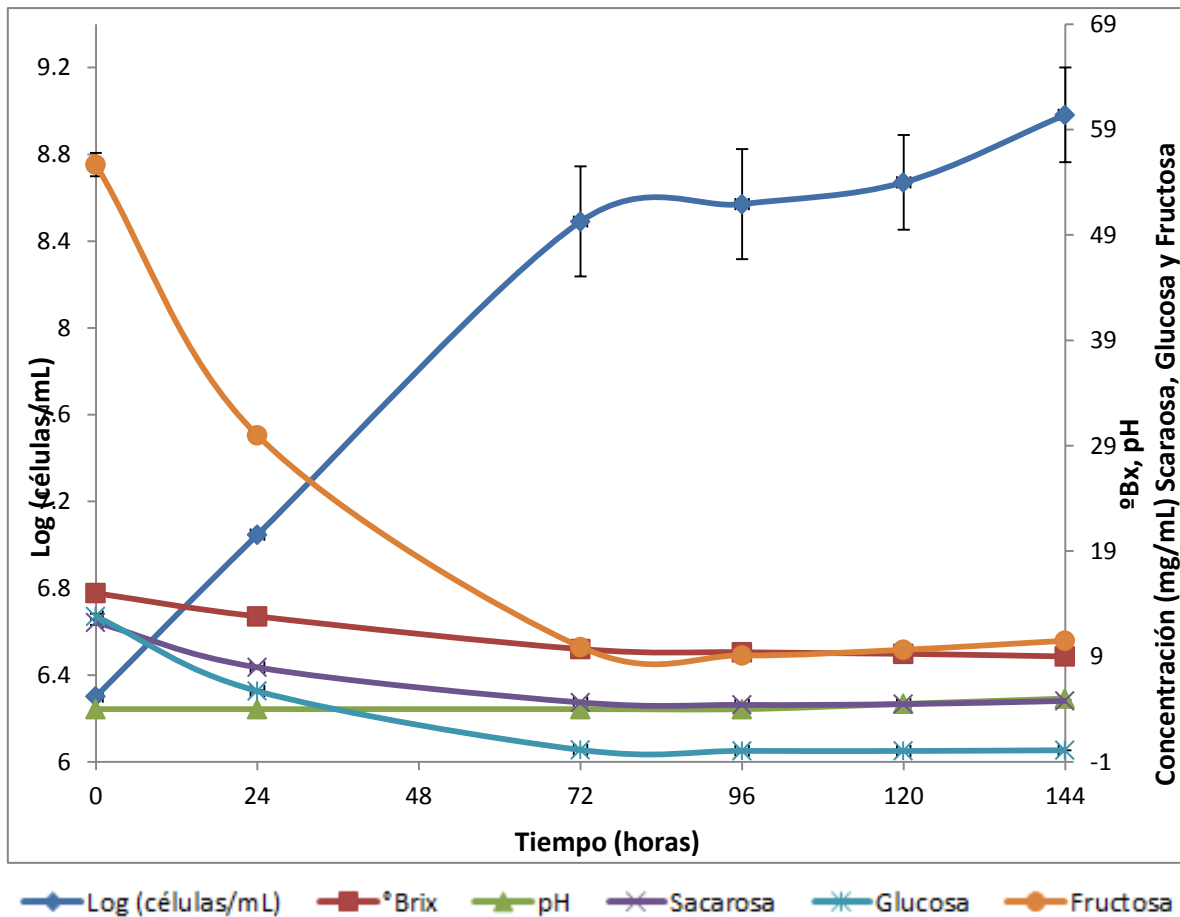


Figura 13. Número de células (células/mL), porcentaje de concentración de los sólidos solubles en el mosto (°Brix), pH y concentración (mg/mL) de sacarosa, glucosa y fructosa de la fermentación llevada a cabo con las cepas combinadas DI-14/JG-19 con respecto al tiempo.

La curva de crecimiento logarítmico de ambas cepas muestra que la fase exponencial ocurre a lo largo de las primeras 72 horas de fermentación y después de este tiempo las levaduras llegan a la fase estacionaria de su crecimiento (Figura 13).

Se observa en la Figura 13 que la concentración de solutos en la fermentación disminuye a lo largo del tiempo, en un inicio el descenso en la concentración es mucho mayor hasta las primeras 72 horas y a partir de esto el descenso es en menor grado. Este hecho se encuentra estrechamente relacionado con la curva de crecimiento logarítmica de las levaduras ya que durante la fase exponencial de crecimiento consumen los nutrimentos del mosto rápidamente y al llegar a la fase estacionaria lo hacen más lentamente.

El pH se muestra casi constante a lo largo de la fermentación. Sin embargo se observa un aumento en este a partir de las 120 horas y hasta el final de fermentación. Mientras que en la Figura 14 se observa que la producción de ácido acético y ácido láctico es baja.

En la Figura 13 se observa que tanto la concentración de sacarosa como la de glucosa descienden drásticamente a las 72 horas de fermentación después de lo cual presentan valores casi constantes hasta el final de la misma. Sin embargo la concentración final de glucosa es menor que la concentración final de sacarosa. La concentración de fructosa es más alta que la de la sacarosa y glucosa y desciende durante las primeras 72 horas de fermentación, después de este tiempo se muestra con valores casi constantes. Esto corresponde, junto con el comportamiento de los otros azúcares analizados, a la curva de crecimiento logarítmico de estas cepas en esta fermentación.

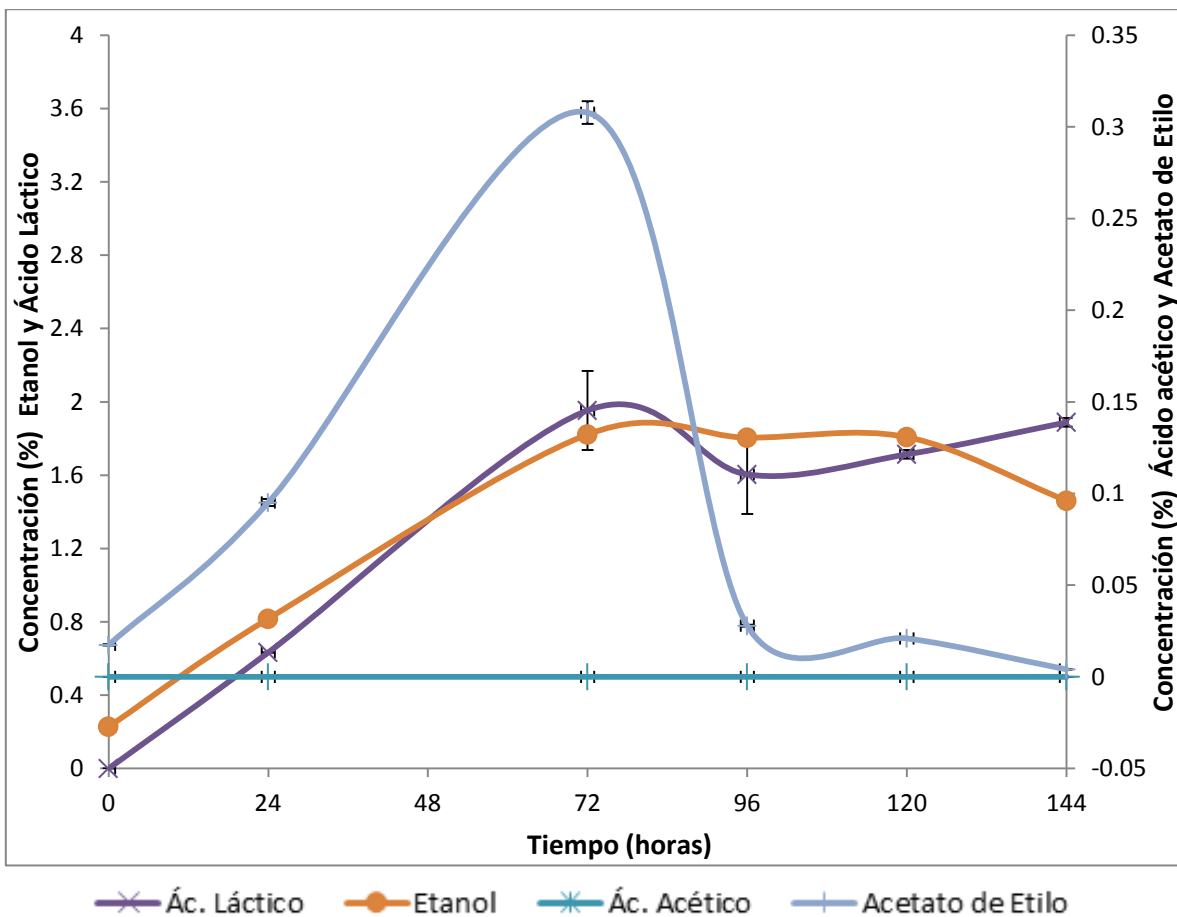


Figura 14. Concentración (% v/v) de ácido láctico, ácido acético, etanol y acetato de etilo de la fermentación llevada a cabo con las cepas en combinación DI-14/JG-19 con respecto al tiempo.

La concentración de etanol presenta un incremento importante a las 72 horas de fermentación para disminuir posteriormente. Esta disminución puede deberse a la evaporación del analito durante la fermentación ya que es un compuesto volátil a temperatura ambiente. Sin embargo se alcanza una concentración máxima de 1.8%. La producción de acetato de etilo llega a una concentración máxima de 0.31% a las 72 horas de fermentación (Figura 14).

El ácido láctico muestra valores de concentración máximos de 1.9% aproximadamente. Anteriormente ambas cepas, DI-14 y JG-19, en las fermentaciones que se realizaron con cada cepa de manera individual, muestran producción de ácido láctico que alcanza concentraciones máximas de 0.4%

aproximadamente. Por lo que en esta fermentación se puede ver que estando juntas esta producción se ve aumentada de manera considerable.

Por separado la cepa DI-14 produjo una concentración máxima de 0.8% de ácido acético mientras que las fermentaciones llevadas a cabo por la cepa JG-19 tuvieron concentraciones de este compuesto cercanas a 0%. En combinación se observa que no hay producción de ácido acético. Lo cual corresponde con la información encontrada de ambas cepas que indica que tanto *Saccharomyces cerevisiae* como *Pichia manshurica* no tienen al ácido acético como producto de su metabolismo fermentativo.

El rendimiento calculado de la producción de etanol y ácido láctico en la fermentación con base en el consumo de azúcares del mosto es de 22.25% para el etanol y 35.27% para el ácido láctico.

Fermentación realizada con las cepas DI-14 y JA-10 (*Saccharomyces cerevisiae* y *Issatchenkia orientalis*)

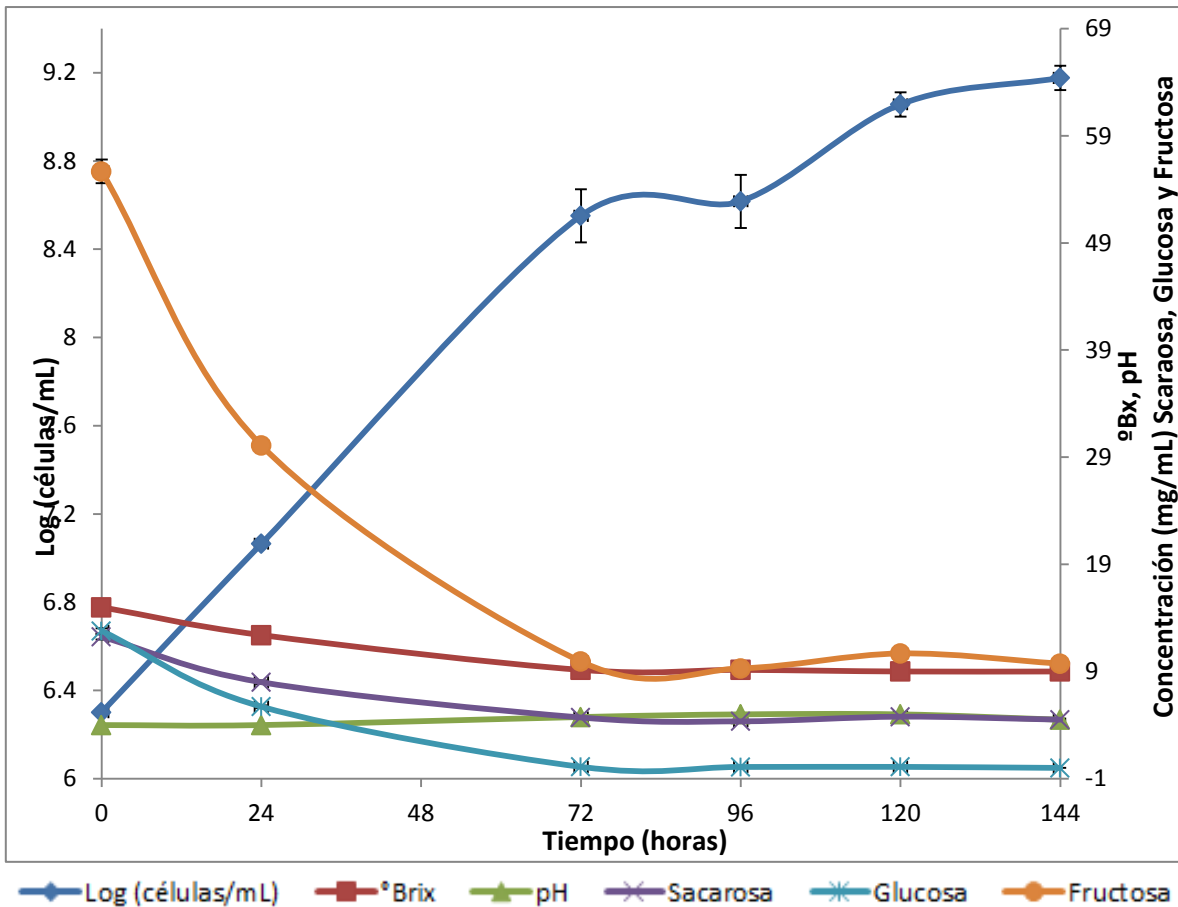


Figura 15. Número de células (células/mL), porcentaje de concentración de los sólidos solubles en el mosto (°Brix), pH y concentración (mg/mL) de sacarosa, glucosa y fructosa de la fermentación llevada a cabo con las cepas combinadas DI-14/JA-10 con respecto al tiempo.

La curva de crecimiento logarítmica presentada en la Figura 15 muestra que la fase de crecimiento exponencial dura 72 horas y a partir de este tiempo las levaduras entran en la fase estacionaria de crecimiento.

La concentración de solutos en el mosto disminuye por más de 5°Bx a partir del inicio de la fermentación y hasta 72 horas después. Una vez pasado este tiempo el descenso en la concentración de solutos se muestra lento o con valores casi constantes.

El pH muestra un aumento de las 72 horas y hasta las 120 horas de fermentación y a las 144 horas se observa una disminución al valor que tenía inicialmente. La poca variación en el pH puede deberse a la baja concentración de ácido láctico y ácido acético en el mosto fermentado y a la generación de compuestos con pH mayor al de estos ácidos orgánicos.

La sacarosa en el mosto presenta un descenso en su concentración considerable hasta las 72 horas de fermentación. Después de este tiempo la concentración de ésta permanece prácticamente constante. Una vez más la concentración de glucosa en el mosto sigue un comportamiento similar al de la sacarosa a lo largo de la fermentación concluyendo con una concentración menor a la de la sacarosa. La concentración de fructosa disminuye también hasta las 72 horas y posteriormente se mantiene casi constante a lo largo del resto de la fermentación (Figura 15). Estos valores corresponden a la curva de crecimiento de las cepas empleadas en la fermentación ya que la fase exponencial concluye después de las 72 horas de fermentación reduciendo el consumo de los nutrimentos presentes en el mosto a partir de este tiempo.

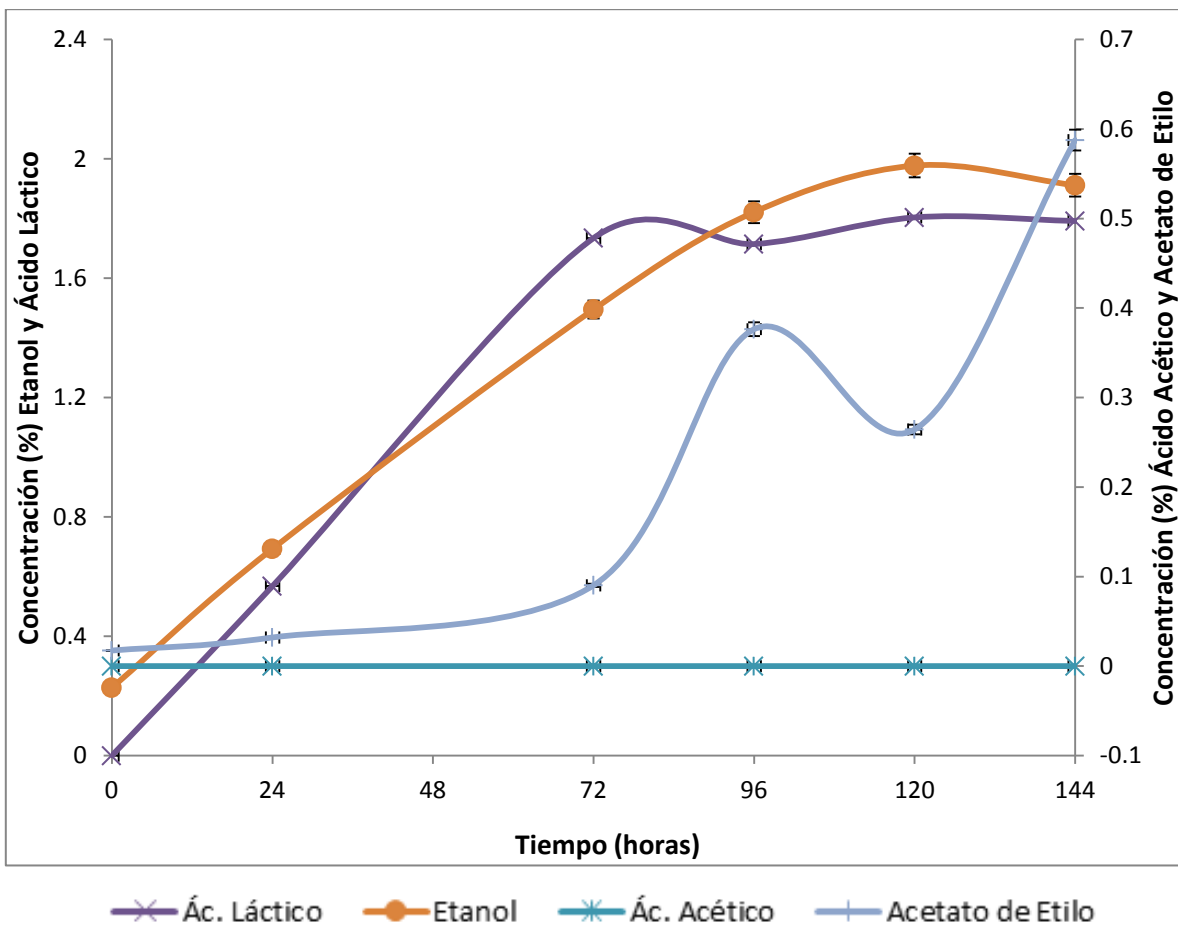


Figura 16. Concentración (% v/v) de ácido láctico, ácido acético, etanol y acetato de etilo de la fermentación llevada a cabo con las cepas en combinación DI-14/JA-10 con respecto al tiempo.

El etanol en el mosto aumenta su concentración hasta llegar a 2% hacia las 120 horas de fermentación tras lo cual disminuye quedando en concentraciones cercanas a 1.9% (Figura 16). En las fermentaciones realizadas por separado con cada cepa el etanol tuvo concentraciones finales de 3% aproximadamente. En esta fermentación, por tener las dos cepas en combinación, se esperaría tener una producción combinada de etanol; sin embargo, se tiene una concentración de etanol por debajo de los valores obtenidos en las fermentaciones por separado. Siendo posible que las cepas de levaduras al estar juntas en el mismo mosto compitan por el sustrato y por adquirir biomasa teniendo una baja producción de este metabolito. La concentración de acetato de etilo aumenta hasta llegar a los

0.6% al final de la fermentación (Figura 16). Las cepas por separado mostraron una producción de acetato de etilo prácticamente nula.

La concentración de ácido láctico alcanza su valor mayor a las 72 horas y después de este tiempo su concentración permanece constante en el resto de la fermentación. En la fermentación realizada únicamente con la cepa DI-14 la producción de ácido láctico es menor a 0.4% a lo largo del tiempo en que esta se llevó a cabo. Mientras que la fermentación realizada con la cepa JA-10 arrojó valores cercanos a 0.3% de ácido láctico. En la fermentación presente se puede ver que se combina la producción de este compuesto por parte de las dos cepas empleadas y se puede ver un aumento considerable obteniendo una concentración de 1.7% aproximadamente (Figura 16).

El ácido acético en esta fermentación presenta valores cercanos o iguales a cero por ciento. Sin embargo la cepa DI-14, en las fermentaciones llevadas a cabo por separado, mostró una producción de ácido acético cercana a 0.8%. Mientras que la cepa JA-10 presentó concentraciones cercanas a 0% de este ácido. Estando en combinación ambas cepas no hay producción considerable de ácido acético.

En general la producción de etanol y ácido acético disminuyó con respecto a las concentraciones obtenidas en la fermentaciones llevadas a cabo con las cepas DI-14 y JA-10 de manera individual mientras que la producción de acetato de etilo aumentó. El etanol junto con el ácido acético producen acetato de etilo estando en un medio ácido.

Se calculó el rendimiento de la producción de etanol y ácido láctico con respecto al consumo de azúcares, fructosa, glucosa y sacarosa en el mosto obteniendo un valor de 23.35% para el etanol y 32.6% para el ácido láctico.

Fermentación realizada con las cepas JA-10 y JG-19 (*Issatchenkia orientalis* y *Pichia manshurica*)

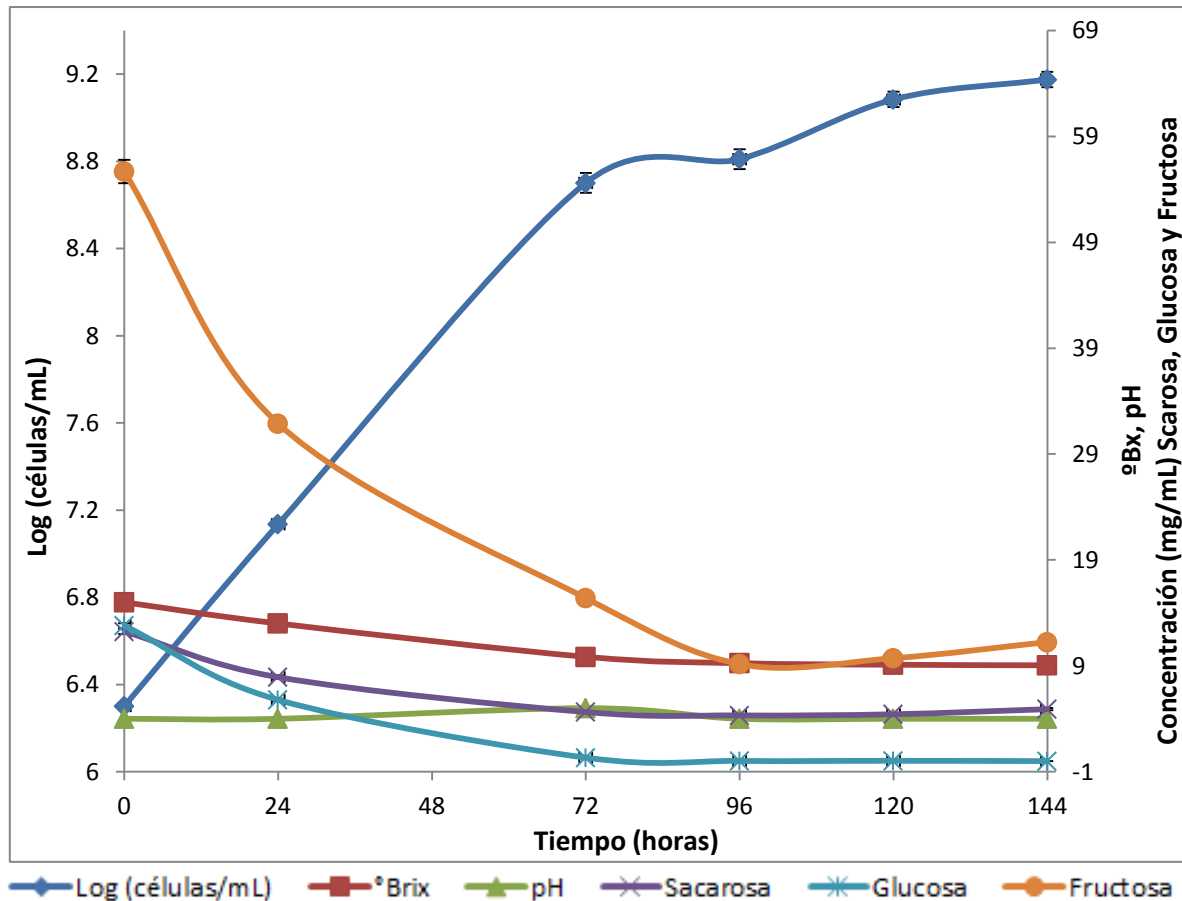


Figura 17. Número de células (células/mL), porcentaje de concentración de los sólidos solubles en el mosto (°Brix), pH y concentración (mg/mL) de sacarosa, glucosa y fructosa de la fermentación llevada a cabo con las cepas combinadas JA-10/JG-19 con respecto al tiempo.

En la Figura 17 se observa por la curva de crecimiento logarítmica que la fase de crecimiento exponencial ocurre hasta las 72 horas de fermentación y después las levaduras pasan a la fase estacionaria de crecimiento.

Se observa una disminución en la concentración de solutos importante hasta las 72 horas de fermentación después de lo cual continúa descendiendo la concentración hasta el final de la fermentación pero de manera más gradual.

El pH aumenta su valor a las 72 horas, vuelve a disminuir al valor inicial después de esto y permanece constante hasta el final de la fermentación. Del mismo modo la producción de ácido láctico aumenta hasta las 72 horas de fermentación tras lo cual permanece prácticamente constante (Figura 18).

La sacarosa y la glucosa en el mosto presentan una disminución considerable a las 72 horas y posteriormente permanecen con concentraciones casi constantes hacia el final de la fermentación. La fructosa muestra una disminución importante en su concentración a las 72 horas, después de esto la concentración vuelve a aumentar en 2% aproximadamente hacia el final de la fermentación. En la curva de crecimiento logarítmico de las levaduras (Figura 17) se observa que la fase exponencial concluye a las 72 horas de fermentación. Sin embargo a las 96 horas también se observa crecimiento considerable aunque no tan acelerado como antes de las 72 horas lo cual podría explicar que haya un descenso en la concentración de fructosa tan importante a las 96 horas.

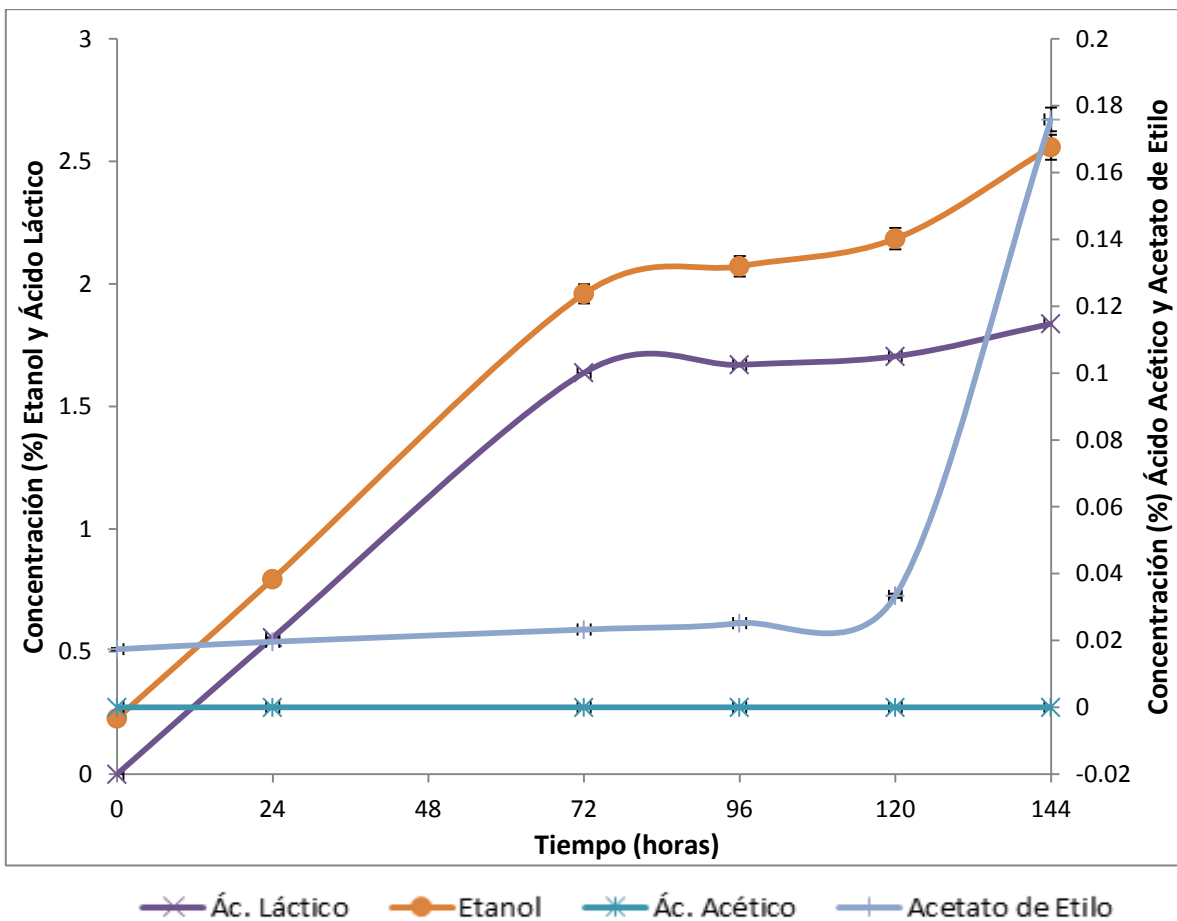


Figura 18. Concentración (% v/v) de ácido láctico, ácido acético, etanol y acetato de etilo de la fermentación llevada a cabo con las cepas en combinación JA-10/JG-19 con respecto al tiempo.

El etanol en el mosto llega a concentraciones aproximadas de 2.5%. En fermentaciones por separado, ambas cepas, produjeron 3% de etanol. Por lo que se esperaría una mayor producción de etanol en esta fermentación que cuenta con ambas cepas. El acetato de etilo permaneció en concentraciones bajas hasta las 120 horas de fermentación tras lo cual aumentó su concentración hasta casi 0.18% (Figura 18).

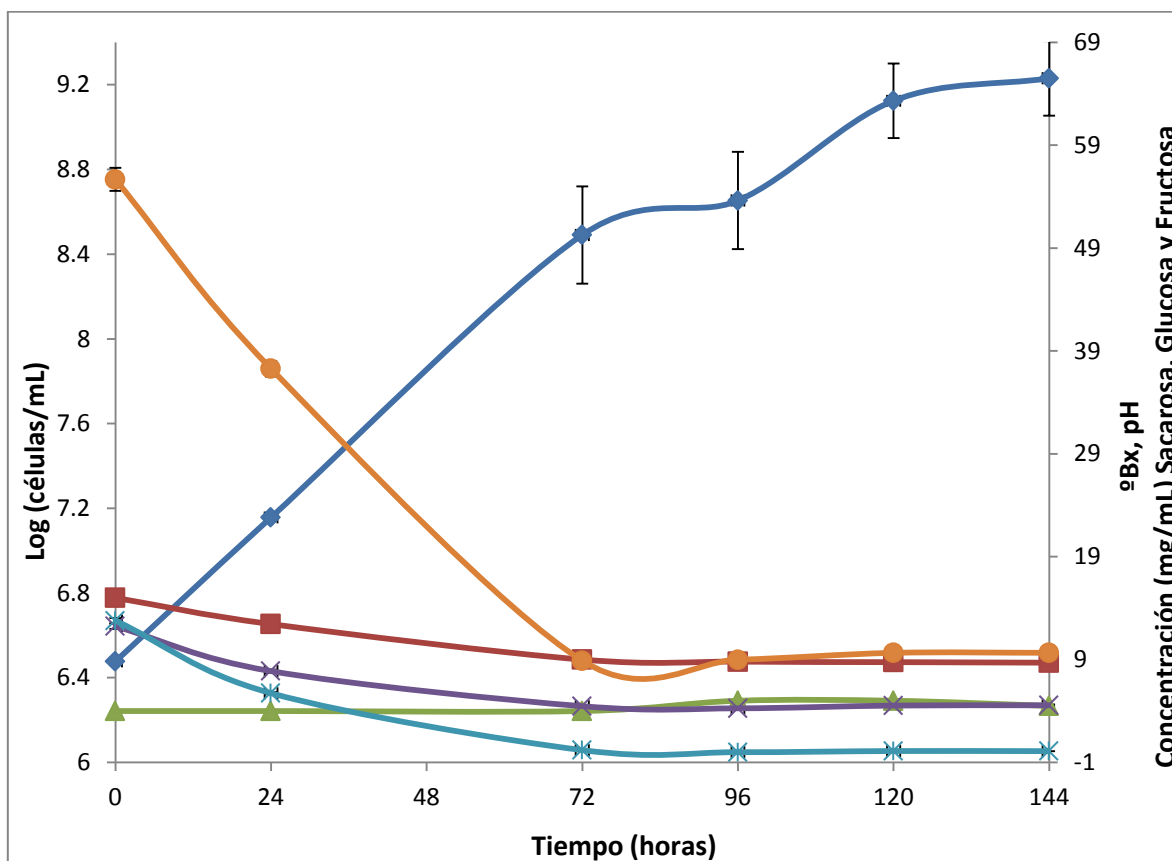
El ácido láctico presenta valores de 2% aproximadamente al llegar a las 72 horas de fermentación (Figura 18). Por las fermentaciones realizadas con las cepas por separado sabemos que ambas producen concentraciones de ácido láctico cercanas a 0.3% por lo que la producción de ácido láctico en esta fermentación

muestra un aumento con relación a lo que se esperaría de ambas cepas, basándose en los datos anteriores.

Al igual que en la otras fermentaciones realizadas se observa que en ésta no hay producción considerable de ácido acético en el mosto fermentado en ninguno de los tiempos de fermentación evaluados.

La producción de etanol y ácido láctico en la fermentación con base en el consumo de azúcares tuvo un rendimiento de 30.86% para el etanol y 33.85% para el ácido láctico.

Fermentación realizada con las cepas DI-14, JA-10 y JG-19 (*Saccharomyces cerevisiae*, *Issatchenkia orientalis* y *Pichia manshurica*)



◆ Log (células/mL) ■ °Brix ▲ pH ✕ Sacarosa * Glucosa ● Fructosa

Figura 19. Número de células (células/mL), porcentaje de concentración de los sólidos solubles en el mosto (°Brix), pH y concentración (mg/mL) de sacarosa, glucosa y fructosa de la fermentación llevada a cabo con las cepas combinadas DI-14/JA-10/JG-19 con respecto al tiempo.

En la Figura 19 se observa que la fase exponencial de las tres cepas inoculadas para llevar a cabo esta fermentación ocurre hasta las 72 horas y después pasa a la fase estacionaria con un crecimiento celular casi constante hasta el final de la fermentación.

Los solutos contenidos en el mosto muestran un descenso en su concentración de 5°Bx aproximadamente con respecto a la concentración inicial a las 72 horas, después de este tiempo la concentración de solutos se vuelve casi constante.

El pH muestra un aumento a las 96 horas y permanece así hasta las 120 horas para volver a descender al final de la fermentación.

Los valores de concentración de sacarosa y de glucosa en el mosto, mostrados en la Figura 19, presentan un descenso a las 72 horas de fermentación y posteriormente permanecen prácticamente constantes con la glucosa en menor concentración que la sacarosa. La fructosa presenta un valor inicial mayor al de la glucosa y sacarosa y una disminución en su concentración principalmente a las 72 horas de fermentación para después permanecer casi constante hacia el final de la misma. Esto concuerda con los datos obtenidos en la curva de crecimiento de las cepas inoculadas para esta fermentación (Figura 19) en la que se muestra una fase exponencial que dura las primeras 72 horas de fermentación. Tiempo en el cual hay un mayor consumo de azúcares en el mosto después del cual ocurre la fase estacionaria en la que el decremento en las concentraciones de glucosa, sacarosa y fructosa en el mosto es menor debido a la baja velocidad de crecimiento de las levaduras.

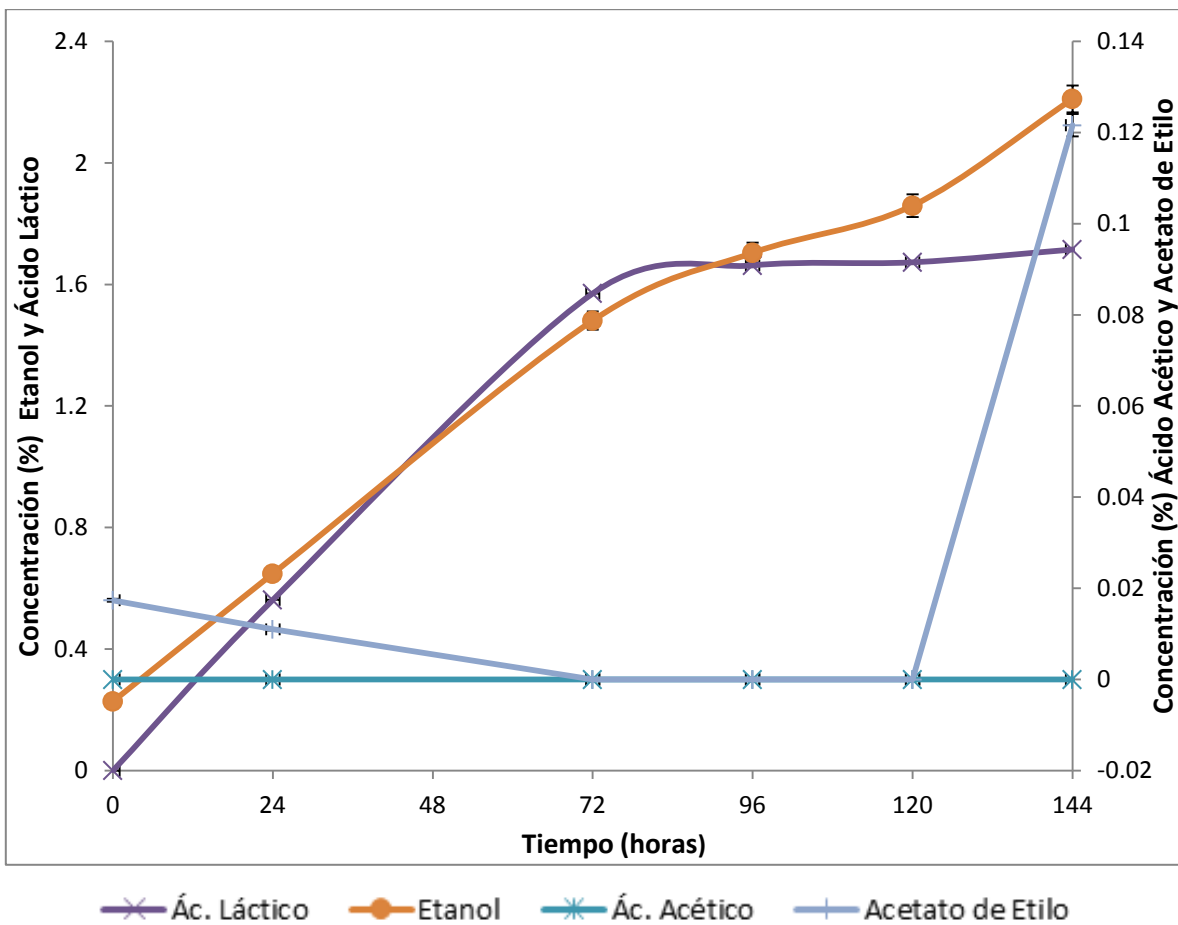


Figura 20. Concentración (% v/v) de ácido láctico, ácido acético, etanol y acetato de etilo de la fermentación llevada a cabo con las cepas en combinación DI-14/ JA-10/JG-19 con respecto al tiempo.

En la Figura 20 se observa que la concentración de etanol en el mosto aumenta desde el inicio de la fermentación hasta el final de manera casi continua. Llega a una concentración final de 2.2% la cual se encuentra por debajo de la concentración final obtenida en las fermentaciones con cepas individuales y la fermentación combinada con las cepas JA-10 y JG-19. Y se encuentra por encima de las concentraciones finales de etanol observadas en las fermentaciones combinadas con las cepas DI-14/JA-10 y DI-14/JG-19.

La producción de acetato de etilo en esta fermentación tiene un valor máximo de 0.12% (Figura 20). En las otras fermentaciones llevadas a cabo con las cepas en combinación se encontraron concentraciones variadas de este compuesto: en la fermentación realizada con las cepas DI-14/JG-19 se obtuvo concentraciones

cercanas a 0.3% de acetato de etilo, en aquella llevada a cabo con las cepas DI-14/JA-10 su concentración final fue de 0.58%, mientras que en la fermentación en la que participaban las cepas JA-10/JG-19 la concentración máxima de este compuesto fue de 0.17%. En las fermentaciones con sólo una cepa se obtuvieron para aquellas realizadas con las cepas JA-10 y JG-19 valores aproximados de 0.18% y para la cepa DI-14 una concentración cercana a 0.05% durante la fermentación. Muchas de las variaciones en la concentración de este compuesto pueden deberse a la evaporación del mismo a lo largo de las fermentaciones ya que se trata de un compuesto volátil a temperatura ambiente.

En la Figura 20 se observa un producción de ácido láctico de aproximadamente 1.6%. Debido a los datos obtenidos en las fermentaciones realizadas con las tres cepas por separado en las que las cepas JA-10 y JG-19 produjeron 0.3% de ácido láctico aproximadamente y la cepa DI-14 valores aproximados de 0.5%. Y sabiendo que en las fermentaciones que se llevaron a cabo con las cepas en conjunto se observó un incremento en la producción de ácido láctico en comparación con las fermentaciones realizadas con las cepas de manera individual se esperaría que en esta fermentación, que contiene las tres cepas empleadas anteriormente, hubiera una mayor producción de ácido láctico debido a la combinación de la producción de las tres cepas en conjunto. Sin embargo éste presenta su mayor concentración con un valor aproximado de 1.7% el cual es menor a los valores observados en las fermentaciones con las cepas en combinaciones de dos.

El ácido acético presenta valores cercanos a cero a lo largo de la fermentación al igual que en las otras fermentaciones llevadas a cabo con las cepas por separado y con las cepas en combinaciones de dos.

El rendimiento de la producción de etanol durante la fermentación con base en el consumo de glucosa, fructosa y sacarosa en el mosto fue de 26.11%. Mientras que el rendimiento de la producción de ácido láctico con respecto al consumo de estos tres carbohidratos en el mosto fue de 30.88%.

Tabla 4. Rendimientos de la producción de etanol y ácido láctico en las fermentaciones realizadas.

	Etanol (%)	Ácido Láctico (%)
DI-14 (<i>S. cerevisiae</i>)	41.53	11.23
JA-10 (<i>I. orientalis</i>)	41.09	5.74
JG-19 (<i>P. manshurica</i>)	41.38	7.13
DI-14/JG-19 (<i>S. cerevisiae/P. manshurica</i>)	22.24	35.27
DI-14/JA-10 (<i>S. cerevisiae/I. orientalis</i>)	23.34	32.60
JA-10/JG-19 (<i>I. orientalis/P. manshurica</i>)	30.85	33.84
DI-14/JA-10/JG-19 (<i>S. cerevisiae/I. orientalis/P. manshurica</i>)	26.11	30.88

Las cepas al estar en conjunto en los mostos de *Agave potatorum* se comportan de distinta forma que cuando se encuentran de manera individual en éstos. En todos los mostos se muestra un consumo similar de glucosa, sacarosa y fructosa. Sin embargo en la Tabla 4 se observa que la producción de ácido láctico en los mostos con cepas individuales es mucho menor que en los mostos con cepas en combinación. Mientras que la producción de etanol disminuye en las fermentaciones combinadas con respecto a aquellas llevadas a cabo por cepas individuales (Tabla 4). La producción de ácido acético muestra valores cercanos o iguales a cero en todas las fermentaciones. Y el acetato de etilo se muestra en concentraciones variadas en cada fermentación. Asimismo estos valores coinciden con las curvas de crecimiento logarítmico obtenidas a partir de las cepas contenidas en los mostos durante las fermentaciones. Se observa un mayor consumo de los azúcares evaluados contenidos en el mosto durante la fase exponencial de crecimiento de las células, mientras que este consumo se disminuye durante su fase estacionaria de crecimiento.

Conclusiones

- Las cepas empleadas en las fermentaciones pertenecen a distintos géneros de levaduras. La cepa DI-14 es *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que la cepa JA-10 es *Issatchenkia orientalis* y la cepa JG-19 se trata de *Pichia manshurica*.
- Las levaduras producen etanol y ácido láctico al encontrarse de manera individual y en combinación en los mostos de *Agave potatorum*, pero lo hacen en concentraciones y tiempos diferentes.
 - Las tres cepas, en fermentaciones por separado, produjeron cantidades similares de etanol, mientras que estando en combinaciones la producción de este compuesto disminuyó con respecto a las concentraciones obtenidas en las fermentaciones con cepas individuales.
 - La producción de ácido láctico aumentó en las fermentaciones con cepas en combinación con respecto a aquellas con cepas individuales.
 - Las cepas de *Issatchenkia orientalis* y *Pichia manshurica* empleadas en las fermentaciones de manera individual producen aproximadamente la misma cantidad de ácido láctico durante la fermentación de los mostos de agave. Mientras que la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* produce una cantidad mayor con respecto a la que producen las otras dos cepas.
 - Las tres cepas, de manera individual, presentan curvas de crecimiento con fases exponenciales que concluyen hacia las 120-144 horas de fermentación. En cambio las curvas de crecimiento de las levaduras al estar en combinación en los mostos presentan fases exponenciales más cortas. Para ambos casos las curvas de crecimiento corresponden al consumo de glucosa, fructosa y sacarosa en los mostos así como a la producción de etanol y ácido láctico.
- La producción de acetato de etilo en el mosto puede atribuirse tanto al metabolismo fermentativo de las levaduras como a la reacción de esterificación de Fischer en la cual participan el ácido acético y el etanol estando en un medio ácido.
- La hidrólisis de los azúcares en el *Agave potatorum* genera principalmente fructosa debido a la degradación de los fructanos contenidos en la planta.

Bibliografía

- Amerine, M.A.; Roessler, E.B. **Wines. Their Sensory Evaluation**. Freeman: New York. 1983.
- Anaya, A; Espinosa-García, F; Cruz-Ortega, R. (2001). **Relaciones Químicas entre Organismos: Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación**. Ed. Plaza y Valdés. México. P 186.
- Ancasi, EG. **Manual de Microbiología de Alimentos**. Levaduras. Capítulo 4. Pp 40-45.
- Andrade, O. (2006). **Identificación de levaduras por medio de PCR-RFLP de la región RNAr 5.8-ITS Aisladas durante la fermentación de mezcal en la región de Sola de Vega Oaxaca**. Tesis de maestría. México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.
- Arcos, D. (2011). **Estudio bioquímico del efecto de la modificación simultánea de la demanda de ATP y de la inhibición de la hexocinasa (Hxk2) sobre la velocidad de producción de etanol en Saccharomyces cerevisiae**. Tesis de licenciatura. México D.F. UNAM. Facultad de Química.
- Beuchat, L. **Food and Beverage Microbiology**. AVI Book. EEUU 1987.
- Castillo, F; Roldán, M. Blasco, R; Huertas, M. Caballero, F; Moreno, C; Martínez, M. (2005). **Biotecnología Ambiental. Fermentación**. Ed. Tébar. Pp 79-81.
- CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre (2012). **Issatchenkia orientalis**. [En línea] Disponible en: <http://www.cbs.knaw.nl/collections/BioloMICS.aspx?Table=Yeasts%20species&Name=Issatchenkia%20orientalis&Fields=All&ExactMatch=T>. [Recuperado el 20 de diciembre de 2012].
- CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre (2012). **Pichia membranifaciens**. [En línea] Disponible en: <http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioloMICS.aspx?Table=Yeasts%20species&Rec=594&Fields=All> [Recuperado el 20 de diciembre de 2012].

- CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre (2012). ***Saccharomyces cerevisiae***. [En línea] Disponible en: <http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioloMICS.aspx?Table=Yeast%20species&Rec=705&Fields=All> [Recuperado el 20 de diciembre de 2012].
- Ciani, M., Mannazzu, I., Marinangeli, P., Clementi, F., Martini, A. (2004). Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. ***Antonie Van Leeuwenhoek***. **85**: 159-164.
- Cocolin, L; Aggio, D; Manzano, M; Cantoni, C; Comi, G. (2002). An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. ***International Dairy Journal*** 12. Pp. 407-411.
- Côté, L; Tardivel, L; Vaugeois, D. (2003). ***La generosidad del Indígena. Dones de las Américas al mundo. Tequila***. Fondo de Cultura Económica. México. Pp. 241.
- Cova, C. (2010). **Caracterización molecular de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, aisladas de la fermentación de mezcal, pulque y tequila**. Tesis de licenciatura. México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.
- Dahllöf, I; Baillie, H; Kjelleberg. (2000). rpoB Microbia Community Analysis Avoids Limitations Inherent in 16S rRNA Gene Intraspecies Heterogeneity. ***Applied and Environmental Microbiology***, 66. Pp 3376-3380.
- Egli, C., Henick-King, T. (2001). Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on Polymorphism in the rRNA Internal Transcribed Spacer Region. ***American Journal of Enology and Viticulture***. **53**: 241-247.
- Espinosa, X. 2010. **Desarrollo y Validación de un Método Analítico para cuantificar Clorhidrato de L-lisina por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución**. Facultad de Química, UNAM. México D.F.
- Esteve-Zarzoso, B; Manzanares, P; Ramón, D; Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Intl. ***Journal of Syst. Bacteriol.*** 49. Pp329-337.

- Fernández-Espinar, M; Esteve-Zarzoso, B; Querol, A; Barrio, E. (2000). RFLP analysis of the ribosomal internal Transcribe Spacers and the 5.8S rRNA gene región of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of floor yeasts. ***Antonie van Leeuwenhoek*** 78. Pp. 87-97.
- Fernández-Espinar, M., López, V., Ramón, D., Bartra, E., Querol, A. (2001). Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. ***International Journal of Food Microbiology***. 70: 1-10.
- Fernández-Espinar, M., Barrio, E., Querol, A. (2003). Analysis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu strict* complex. ***Yeast***, 20: 1213-1226.
- Fernández-Espinar, M; Martorell, P; de Llanos, R; Querol, A. (2006). Molecular Methods to Identify and Characterize Yeasts in Foods and Beverages. Departamento de Biotecnología. ***Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos***.
- Fleet, G. (2008). Wine yeasts for the future. ***FEMS Yeast Research***. 8: 979-995.
- Flores, E. ***La Vida en la Tierra. Pozol: una bebida fermentada tradicional de México***. [En línea]. Disponible en: http://www.cienciorama.ccadet.unam.mx/articulos_extensos/177_extenso.pdf. [Recuperado el 12 de abril de 2012].
- Fraizer, W. (1978). ***Food Microbiology***. Mc Graw Hill. EEUU.
- Garde, T; Arias, M; Ancín, C. (2005). ***Contribución de las levaduras indígenas a la composición volátil del vino blanco en fermentaciones inoculadas***. Federación Española de Asociaciones de Enólogos. Departamento de Química Aplicada. Universidad Pública de Navarra.
- Giraffa, G., Nevian, E.I. (2001). DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. ***International Journal of Food Microbiology***. 67: 19-34.

- García-Mendoza, A. (2007). Los agaves de México. Jardín Botánico. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. **Ciencias**. **87**. Julio-Septiembre.
- Griffin, R. (1981). **Química Orgánica Moderna. Preparación de Esteres. Esterificación de Fischer**. Editorial Reverté. Pp 380-382.
- Hernández, A., Alfaro, I., Arrieta, R., (2003) **Microbiología Industrial**. EUNED. 1º Edición. pp 111, 112.
- Herrera, T. (2007). **Los Hongos en la Cultura Mexicana: Bebidas y Alimentos Tradicionales Fermentados, Hongos Alucinógenos**. Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Herrera, C. Pozo, M. (2010). Nectar yeasts warm the flowers of a winter-blooming plant. **Proceedings of the Royal Society Biological 277 (1689):** 1827-1834.
- Hetschelb, J., Ananiev, G., Schwartz, D. (2007). Pulsed-field gel electrophoresis. **Nature Protocols**. **2**: 677-684.
- Hidalgo, J. (2010). **Tratado de enología. Transformaciones microbianas. Levaduras, bacterias y virus**. Pág 545-. 661. Ediciones Mundi Prensa.
- Illsley, C. Larson, J. (2012). Panorama de las bebidas de agave y sus similares. Mezcal, tequila, bacanora, pulque y sotol. Suplemento "La Jornada del campo". **La Jornada**, No. 53, p. 5.
- Inácio, J. (2000). *In situ* Accessibility of *Saccharomyces cerevisiae* 26S rRNA to Cy3-Labeled Oligonucleotides Probes Comprising the D1 and D2 domains. **Applied and Environmental Microbiology**, 66. Pp 3376-3380.
- Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (2003). **Modificación a la Declaración General de Protección de la Denominación de Origen Mezcal**. [En línea]. [http://Www.Impi.Gob.Mx/Wb/IMPI/Modificacion A La Declaracion General De Proteccion](http://Www.Impi.Gob.Mx/Wb/IMPI/Modificacion_A_La_Declaracion_General_De_Proteccion) [Recuperado el 12 de abril de 2012].
- Kim, D., Hong, Y., Park, H. (2008). Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces de malic acid content in wine. **Biotechnology Letters**.**30-9**: 1633-1638.

- Klein, D., Lansing, M., Harley, J., (2006). **Microbiology**. McGraw-Hill. 6^o Ed.
- Kurtzman, C; Robnett, C. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek** 73. Pp 331-371.
- Kurtzman CP, Piskur, J. (2006). Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts (in Comparative Genomics: Using Fungi as Models. Berlin. **Springer**. Pp 29-46.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (2011). **The Yeasts. A Taxonomic Study**. Descriptions of Teleomorphic Ascomycetous Genera and Species. Parte IV B. 5^o Edición. Volumen 1. Pp. 689. EEUU.
- Lappe, P., Moreno, R., Arrizón, J., Herrera, T., García, A., Gschaedler, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondestilled and destilled Agave beverages. **FEMS Yeast Research**.. 8. Pp. 1037-1052.
- Legras, J., and F. Karst. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strains characterization. **FEMS Microbiology Letters**. 221: 249-255.
- Madigan, M; Martin, J.M.; Parker, J. (2001). **Brock Biology of Microorganisms**. 8^o Edición. Prentice Hall. EEUU.
- Mancilla-Margalli N & Lopez M (2006) Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyliirion* species. **Journal Agricultural and Food Chemistry** 54: 7832–7839.
- Manjarrez, A; Llama, M. (1969). Cuantificación de los componentes volátiles en tequilas y mezcales por cromatografía de fase vapor. **Revista de la Sociedad Química de México XIII**. Pp 1A-4A.
- Margarida, M., Couto, B., Eijsma, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H.J., van der Vossen, J.M.B.M. (1996). Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, 62: 41–46.
- Masneuf, I., Aigle, M., Dubordieu, D. (1996). Development of a polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism method for

Saccharomyces cerevisiae and *Saccharomyces bayanus* identification in enology. **FEMS Microbiology Letters**. **16**: 239-244.

- Medina, M. (2008). **Cuantificación de Alcoholes y Aldehídos en Mezcal por Cromatografía de gases y Microextracción en Fase Sólida seguido de Cromatografía de Gases**. Facultad de Química, UNAM. México D.F.
- Moncalvo, J; Lutzoni, F. (2000). Phylogenetic Relationship of Agaric Fungi Based on Nuclear Large Subunit Ribosomal DNA Sequences. **Syst. Biol.** **49**. Pp 303-305.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA". **Applied and Environmental Microbiology**. **59**: 695-700.
- Narváez, J., Rojas, R., Rodríguez, I., Larralde, C. (2010). Culture-Independent Analysis of Lactic Acid Bacteria Diversity. Springer Science + Business Media. **Curr Microbiol** **61**:444–450. DOI 10.1007/s00284-010-9636-z. pp 444-450.
- Nasonova, E.S. (2008). Pulsed Field Gel Electrophoresis: Theory, instruments and application. **Cell and Tissue Biology**. **2**: 557-565.
- Neiman A. (2005). Ascospore Formation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** **69 (4)**: 565-584.
- Ness, F., Lavallée, F., Dubordieu, D., Aigle, M., Dulau, L. (1993). Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. **62**: 89-94.
- Norma Oficial Mexicana. (1994). **NOM-070-SCFI-1994. Bebidas Alcohólicas. Mezcal. Especificaciones.** [En línea]. <http://www.colpos.mx/bancodenormas/noficiales/NOM-070-SCFI-1994.PDF>. [Último acceso el 2 de abril de 2012].
- Orberá, T. (2004). Métodos moleculares de identificación de levaduras. **Revista Iberoamericana de Micológia**, **21**. Pp 15-19.
- Oyeka, C. Ugwu, L. (2002). Fungal flora of human toe webs. **Mycoses** **45 (11-12)**: 488-491.

- Palacios, A., Carrillo, D., Iruzubieta, J., Boutou, S., Fleury, A., Labadie, D., Chatonnet, P. Las eficaces técnicas moleculares de identificación y cuantificación de las levaduras enológicas. **Publicaciones vino-enología**. Laboratorios Excell. (Citado el 4 de mayo de 2010).
- Pelczar, M; Chan, E; Kreig, N. (1982). **Microbiology**. 4° Edición. Mc Graw Hill. EEUU.
- Pérez, C. (2007). Mezcales tradicionales de los pueblos de México, herencia cultural y biodiversidad. **Revista Ciencias de la UNAM**. Número 87. Publicación julio-septiembre.
- Plata, C.; Millán, C.; Mauricio, J. C.; Ortega, J. M. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. **International Journal of Food Microbiology**. 20, 217-224. 2003.
- Port, G. (1990). **Yeast**. 3° Edición. Press Pergamon. Michigan. EEUU. Pp 510.
- Prescott, L; Harley, J. Klein, D. (2000). **Microbiology**. 5° Edición. Mc Graw Hill. EEUU.
- Rames, M., Barragán, M., **La Industria del mezcal y la Economía Oaxaqueña**. Observatorio de la Economía Latinoamericana. Fundación Universitaria Andaluza Inca Garcilaso. Universidad de Málaga.
- Ramírez Hernández Adriana. **Validación de la técnica de cromatografía de líquidos de alta presión (CLAP) para la cuantificación de vitamina a. tesis licenciatura**. Facultad de química, UNAM, México D.F. 2004.
- Reyes, D., (2006). **Determinación de los principales compuestos orgánicos del mezcal por cromatografía de gases capilar-espectrometría de masas**. México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.
- Rodríguez, A., Escalante, P., Barba de la Rosa, A., Blaschek, H., (2007). *Optimization of fermentation conditions for the production of the mezcal from Agave salmiana using response surface methodology*. Chemical Engineering and Processing. Process Intensification. **Elsevier**. 47. Pp 76-82.
- Rojas, V.; Gil, J. V.; Piñaga, F.; Manzanares, P. Studies on acetate ester production by non-Saccharomyces wine

- yeasts. *International Journal of Food Microbiology*. 70, 283-289. 2001.
- Romero, A. (2002). **Cromatografía. Curso de Métodos**. Instituto de Biotecnología, UNAM. México D.F. [En línea]. Disponible en: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Cromatografia.pdf> [Recuperado el 18 de agosto de 2012].
 - Sánchez-Marroquín A & Hope PH (1953) Agave juice fermentation and chemical composition studies of some species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1: 246–249.
 - Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2005). **Fortalecimiento de Cadenas Productivas. Diagnóstico. Sistema Producto Maguey-Mezcal Guerrero**. México. [En línea]. Disponible en: http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Publicaciones/SistemaProducto/Lists/Agave%20Mezcalero/Attachments/2/pr_gro.pdf [Recuperado el 2 de septiembre de 2012].
 - Secretaría de Economía. (2010). **Oaxaca produce el mezcal de mayor calidad y el 65% del volumen nacional**. México. [En línea]. Disponible en: <http://www.economia.gob.mx/delegaciones-de-la-se/estatales/oaxaca/162-delegaciones-de-la-se/estatales/oaxaca/6724-oaxaca1> [Recuperado el 2 de septiembre de 2012].
 - Segura, S. (2010). **Selección de cepas de Saccharomyces cerevisiae con mayor eficiencia de fermentación de fructosa en mostos con mezclas de azúcares**. Tesis de maestría. México D.F. UNAM. Facultad de Química.
 - Scheinvar, E. (2088). **Genética de poblaciones silvestres y cultivadas de dos especies mezcaleras: Agave cupreata y Agave potatorum**. Tesis de maestría. Instituto de Ecología, UNAM. México D.F.
 - Schwartz, D., Cantor, C., (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed fields gradient gel electrophoresis. *Cell*. 37: 67-75.
 - Sláviková, E. Vadkertiova, R. (2003). The diversity of yeasts in the agricultural soil. *Journal of Basic Microbiology* 43 (5): 430-436

- Soji, I., Ogury, T., Okozumini, K. (2005). Genetic Diversity of the internal transcribed space (ITS) and 5.8S rRNA among the clinical isolates of *Candida parapsilosis* in Brazil and Japan. ***Journal of Japanese Medical Mycology***. **46**: 133-137.
- Stanley, D. Bandara, A. Fraser, S. Chambers, P.J. Stanley, G.A. (2010). The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. ***Journal of Applied Microbiology***.
- Universidad Nacional de la Plata. ***Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución*** Departamento de Química. Departamento de Química Analítica. [En línea]. Disponible en: <http://catedras.quimica.unlp.edu.ar/qa3/guias/2008-TP-12-HPLC.pdf> [Recuperado el 2 de septiembre de 2012].
- Vera, A., Santiago, P., López, M. (2009). *Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de mezcal de Agave angustifolia y Agave potatorum*. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. ***Revista Fitotecnia Mexicana***, Vol. 32, Núm. 4. Pp. 273-279.
- Verdugo, A., Segura, L., Kirchmayr, M., Ramírez, P., González, A., Coria, R., Gschaedler, A. (2011). *Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from Agave salmiana*. Springer Science + Business Media. ***Antonie van Leeuwenhoek*** DOI 10.1007/s10482-011-9605-y. pp 1-10.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Z, Marc. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprintings. ***Nucleic Acids Research***. **23**: 4407-4414
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. ***Nucleic Acids Research***. **18**: 6531-6535.
- Yeong, F. (2005). Severing all ties between mother and daughter: cell separation in budding yeast. ***Molecular Microbiology*** **55(5)**: 1325-1331.