



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

COMPARACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE
LEVADURAS ENTRE UNA FERMENTACIÓN
NATURAL Y UNA INOCULADA EN MOSTOS DE
AGAVE 100% PARA LA PRODUCCIÓN DE TEQUILA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

ALICIA RIVERA NORIEGA

TUTOR: DR. FRANCISCO RUIZ TERÁN

MÉXICO D.F.

2007





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

México D.F. a 12 de Septiembre de 2007

“COMPARACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE LEVADURAS
ENTRE UNA FERMENTACIÓN NATURAL Y UNA INOCULADA
EN MOSTOS DE AGAVE 100% PARA LA PRODUCCIÓN DE TEQUILA”

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Francisco Ruíz Terán en el laboratorio 321 del Departamento de Alimentos y Biotecnología en el Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

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

| | |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| Dr. Antonio Peña Díaz | Instituto de Fisiología Celular, UNAM |
| Dra. Maricarmen Quirasco Baruch | Facultad de Química, UNAM |
| Dr. Francisco Ruiz Terán | Facultad de Química, UNAM |

Se reconoce la colaboración del Dra. Carmen Wachter Rodarte, del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la UNAM , en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de DGGE

Se reconoce la asesoría técnica de la M en C. Sandra Bolaños Nuñez y de la M en C. Gabriela López Velázquez en los experimentos para montar la técnica de DGGE

Se reconoce la asesoría de la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch, del Dr. Antonio Peña

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

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

| | | |
|------------|-------------------------------------|---|
| PRESIDENTE | Dr. Antonio Peña Díaz | Instituto de Fisiología Celular, UNAM |
| VOCAL | Dr. Enrique Merino Pérez | Instituto de Biotecnología, UNAM |
| SECRETARIO | Dra. Gloria Soberón Chávez | Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM |
| SUPLENTE | Dra. Amelia Farrés González-Saravia | Facultad de Química, UNAM |
| SUPLENTE | Dra. Maricarmen Quirasco Baruch | Facultad de Química, UNAM |

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme seguir aquí.

A mi esposo Jorge Ríos. Por que en todo momento has estado conmigo, por que siempre me has impulsado para alcanzar mis sueños, por tu amor.

A mis padres y hermanos. Por todo su apoyo, su comprensión, su paciencia y su amor

A mis sobrinos. Por que a su lado revivo mi infancia.

A mis amigas del 324. Carmen, Gloria, Tere, Sandriux, Gaby, Mariana. Por ayudarme y escucharme en los momentos difíciles y compartir también momentos agradables.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 321 y 324. Por hacer agradable la estancia en el laboratorio.

A mis amigos de la Carrera: Gaby Nieto, Andreita, Nelly, Marcos, Ale Barrios, Juanito, Paty, Elizabeth y Agustín Reyó. Porque seguimos compartiendo vivencias.

A mis amigas de la infancia: Anabel Olmedo, por estos 16 años juntas.

Irasema, siempre estás presente en mis pensamientos. Gracias a tu familia porque a pesar de tu ausencia me permiten seguir contigo...

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al Dr. Francisco Ruíz. Por confiar en mi para realizar este proyecto.

A la Dra. Carmen Wachter. Por su apoyo, consejos y por su amistad.

A los miembros de mi Comité tutorial. Dr Antonio Peña y Dra Maricarmen Quirasco. Por sus observaciones y comentarios.

Al Jurado asignado para el exámen de grado. Por sus observaciones y correcciones para la mejora de este trabajo.

A la UNAM por ser la mejor Institución educativa del país.

INDICE

Índice de figuras

Índice de tablas

Resumen

1 Introducción

2. Antecedentes

2.1 Definición de tequila

2.2 Agave para producción de tequila

2.3 Proceso de elaboración de tequila

2.3.1 Cocción

2.3.2 Molienda

2.3.3 Fermentación

2.3.4 Destilación

2.3.5 Maduración

2.4 Microorganismos involucrados en la fermentación natural
del tequila

2.5 Microorganismos en fermentaciones de uva

2.5.1 Persistencia (resistencia) de levaduras durante fermentaciones
vinícolas

2.6 Métodos moleculares aplicados para la identificación de
microorganismos

2.6.1 Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE)17

2.6.2 Identificación de levaduras por métodos moleculares

2.7 Aplicación del DGGE para la determinación de levaduras
en alimentos

3. Objetivos

3.1 Objetivos generales

3.2 Objetivos específicos

4. Hipótesis

5. Estrategia experimental

6. Materiales y Métodos

- 6.1 Aislamiento e Identificación de levaduras por métodos tradicionales dependientes de cultivo
 - 6.1.1 Aislamiento de levaduras a partir de mostos fermentados
 - 6.1.2 Purificación de levaduras
 - 6.1.3 Identificación bioquímica de levaduras
- 6.2 Identificación de levaduras por medio de secuenciación del gen ribosomal 26 S
 - 6.2.1 Preparación del paquete celular de levaduras
 - 6.2.2 Extracción de ADN de cepas puras de levaduras
 - 6.2.3 Amplificación de ADN del fragmento del gen ribosomal 26S
 - 6.2.4 Identificación de levaduras por medio de secuenciación del gen ribosomal 26 S
- 6.3 Fermentaciones controladas de mostos de agave
 - 6.3.1 Fermentación natural de mostos 100% de agave
 - 6.3.2 Preparación del preinóculo
 - 6.3.3 Fermentación natural de los mostos
 - 6.3.4 Conteo en placa de levaduras
 - 6.3.5 Preparación del preinóculo para la fermentación no natural (inoculada)
 - 6.3.6 Fermentación inoculada con el cultivo iniciador de la cepa *S. cerevisiae* en mostos 100% agave
- 6.4 Determinación de la diversidad de levaduras durante la fermentación natural e inoculada en mostos 100% de agave por el método de DGGE
 - 6.4.1 Obtención del pellet celular de levaduras presentes en mostos fermentados
 - 6.4.2 Extracción enzimática de ADN de levaduras obtenido a partir de los mostos fermentados
 - 6.4.3 Amplificación de ADN de levaduras
 - 6.4.4 Gel perpendicular de DGGE de los amplicones de ADN de cepas puras de levaduras
 - 6.4.5 Gel paralelo de DGGE de los amplicones de ADN de levaduras extraído de las fermentaciones controladas natural

e inoculada de mostos 100% de agave

6.5 Determinación de amplificación preferencial durante la reacción de PCR

6.6 Cuantificación de azúcares y etanol

7. Resultados y Discusión

7.1 Aislamiento y selección de levaduras a partir de mostos fermentados de agave

7.2 Diversidad de levaduras en mostos fermentados

7.2.1 Amplificación de ADN de cepas puras de levaduras correspondiente al extremo 5' del gen 26S de ARNr

7.3 Extracción de ADN de levaduras a partir de mostos fermentados

7.4 Amplificación de la región 26S de ARNr a partir del ADN extraído directamente de los mostos fermentados

7.5 Fermentaciones controladas (natural e inoculada) de mostos de agave para producción de tequila

7.5.1 Dinámica de levaduras durante la fermentación natural determinada por el método tradicional de cuenta en placa

7.5.2 Dinámica de levaduras durante la fermentación inoculada determinada por el método tradicional de cuenta en placa

7.6 Diversidad de levaduras en fermentaciones controladas de mostos de agave fermentados determinada por el método independiente de cultivo DGGE

7.6.1 Gel perpendicular de DGGE

7.6.2 Gel paralelo de DGGE con ADN de cepas puras de levaduras

7.6.3 Gel paralelo de DGGE con ADN de levaduras extraído directamente de los mostos de agave

7.6.4 Verificación de la presencia de amplificación preferencial en la reacción de PCR de cepas puras de levaduras

8. Conclusiones

9. Perspectivas

10. Bibliografía

11. Anexos

Índice de Figuras

Figura 1 Migración de fragmentos de ADN de diferentes microorganismos en un gel paralelo de DGGE

Figura 2 Gel perpendicular de DGGE

Figura 3 Gel paralelo de DGGE de cepas de levaduras encontradas en leche

Figura 4 Purificación e identificación de levaduras a partir de mostos fermentados

Figura 5 Preparación de la técnica de PCR-DGGE de levaduras aisladas de mostos de agave

Figura 6 Fermentaciones controladas de mostos de agave

Figura 7 PCR de cepas puras de levaduras aisladas de mostos de agave

Figura 8 DNA de levaduras extraído a partir de fermentaciones mixtas controladas

Figura 9 Electroforesis en gel de agarosa del ADN extraído con el kit Qiagen®

Figura 10 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos a partir de diferentes templados de ADN

Figura 11 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados con albúmina bovina sérica

Figura 12 Dinámica de la fermentación natural determinada por métodos dependientes de cultivo

Figura 13 Dinámica de la fermentación inoculada determinada por método independiente de cultivo (DGGE)

Figura 14 Gel perpendicular de DGGE de la mezcla de productos de PCR De cepas puras aisladas de los mostos fermentados

Figura 15 Gel paralelo de DGGE con cepas puras aisladas de mostos Fermentados

Figura 16 Gel paralelo de DGGE con ADN extraído de las fermentaciones controladas

Figura 17 Gel DGGE de amplificación preferencial entre cepas puras

de levaduras

Figura 18 Patrón de bandas obtenido para diferentes levaduras *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de mosto no inoculado de agave 100% para producción de tequila, con los primers $\delta 1$ y $\delta 2$

Índice de tablas

Tabla 1 Comunidades de levaduras identificadas en la fermentación del tequila y habitats relacionados

Tabla 2 Combinaciones de ADN de cepas puras de levaduras en una reacción de PCR para determinar la posible presencia de amplificación preferencial entre ellas

Tabla 3 Identificación de levaduras por el Sistema API 20 C AUX (bioMérieux).

Tabla 4 Identificación de levaduras por amplificación y secuenciación de nucleótidos del gen 26 S del ARNr.

Tabla 5 Comparación de los parámetros de rendimiento y productividad de las fermentaciones natural e inoculada

RESUMEN

La producción de tequila esta basada en la fermentación del polímero hidrolizado de inulina, obtenido a partir de *Agave tequilana Weber*. En las fermentaciones de tequila se han encontrado cultivos mixtos de levaduras *Saccharomyces* y no *Saccharomyces*. Estas levaduras se han aislado a partir de diferentes etapas del proceso de fermentación industrial. En tales fermentaciones, las cepas de levaduras están presentes aún antes de que el cultivo iniciador sea adicionado. La cantidad de levaduras no *Saccharomyces* encontradas antes de la fermentación y la del inóculo de *S. cerevisiae* varía de acuerdo a la planta productora de tequila.

En el presente trabajo se llevó a cabo un análisis mediante una electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) de dos fermentaciones controladas (una natural y otra inoculada) de mostos de agave. Las levaduras utilizadas en ambas fermentaciones fueron aisladas de mostos fermentados industriales: *Kluyveromyces marxianus*, *Candida glabrata*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Saccharomyces cerevisiae* (diferente del cultivo iniciador).

En la fermentación natural la cantidad inicial de cada cepa de *Saccharomyces* y no *Saccharomyces* fue de 1×10^4 ufc/ml. La fermentación fue mantenida a 30° C sin agitación.

En la fermentación inoculada se utilizó una cantidad de 1×10^6 ufc/ml de *S. cerevisiae* como cultivo iniciador además de un inóculo de 1×10^4 ufc/ml de las levaduras empleadas en la fermentación natural. El mosto fue mantenido a 30° C sin agitación. En ambas fermentaciones se tomaron muestras antes de inocular los mostos y a lo largo de la fermentación (0, 4, 8, 20, 24 y 32 horas). Se monitoreo también la cuenta total de levaduras, el porcentaje de etanol producido, el consumo de azúcares y se realizó un análisis con DGGE utilizando el primer NL1 con grapa de guanina-citosina. No se observó amplificación preferencial entre algunas de las cepas utilizadas en las fermentaciones (*Kluyveromyces marxianus*, *Candida glabrata* y *Saccharomyces cerevisiae*).

En el caso de la fermentación natural, la cantidad de etanol producida no inhibió el crecimiento de las levaduras no *Saccharomyces* (6.64 %). A las 32 horas de fermentación se encontró el 2 % de azúcares remanentes. En los geles de DGGE se identificó la amplificación de las bandas de cada levadura a lo largo de la fermentación natural excepto la banda correspondiente a *Z. bailii*.

En la fermentación inoculada la cantidad de etanol alcanzada fue similar al obtenido en la fermentación natural (6.81 %). En esta fermentación no se detectó la cepa de *Z. bailii* en las cuentas en placa ni en análisis con DGGE, en cultivos en placa se observó un rápido crecimiento de *S. cerevisiae*. La población de levaduras no se inhibió con la concentración de etanol producida. Aunque algunas levaduras no *Saccharomyces* permanecieron remanentes en el mosto durante la fermentación inoculada, se observó la predominancia de *S. cerevisiae* debido a la concentración inicial de inóculo.

1. INTRODUCCIÓN

En México existen diversas bebidas fermentadas elaboradas a partir de agave, como tequila, mezcal, sotol, pulque; algunas otras a base de maíz o piña como el tepache y otras a partir de muchos otros frutos o sustratos, en la mayoría de estos productos fermentados se desconoce la diversidad de microorganismos presentes. El conocimiento de la microbiota de dichos productos ayudaría a mejorar su calidad y aceptación, debido a que la identificación de los microorganismos permitiría profundizar en el estudio sobre el papel que desempeñan, en relación a las características sensoriales, nutrimentales o funcionales del producto final.

Uno de los productos cuya microbiología de la fermentación no ha sido completamente estudiada es el tequila. En un estudio llevado a cabo en una planta productora de tequila, en la cual no se adiciona un microorganismo como cultivo iniciador, sino que se lleva a cabo una fermentación con la microbiota inicial existente en los recipientes y materia prima con la que se elabora el mismo, Lachance (1995), identificó por métodos tradicionales (dependientes de cultivo), diferentes levaduras durante la fermentación de tequila. Este autor observó que en las etapas iniciales se encontraban levaduras tales como *Torulaspota delbruekii*, *Hanseniaspora* sp., *Bretanomyces* sp. y *Saccharomyces cerevisiae*. Además, reportó que conforme progresaba la fermentación la diversidad de las especies iba reduciéndose considerablemente, hasta que la especie de *S. cerevisiae* era predominante al final de la fermentación.

Los avances en el conocimiento de la ecología molecular microbiana han permitido el desarrollo de técnicas para la identificación de microorganismos en su propio hábitat sin necesidad del aislamiento de los mismos en medios de cultivo (Head et al. 1998.) Gracias a estas técnicas, se puede conocer la dinámica de crecimiento y diversidad de los microorganismos durante el proceso de elaboración de alimentos. La ventaja en la identificación de microorganismos por medio de métodos independientes de cultivo es que se puede tener una visión más completa de la diversidad microbiana presente en un hábitat específico, comparada con los métodos dependientes de cultivo en los que la identificación de microorganismos depende de un aislamiento previo en medios definidos que en ocasiones no son suficientes para recuperar a todos los microorganismos que están presentes en la fermentación.

El presente trabajo propone el estudio de las poblaciones de levaduras presentes en la fermentación de tequila, para conocer por medio de métodos moleculares independientes de cultivo, la diversidad de levaduras, así como establecer la diferencia entre una fermentación inoculada y una fermentación natural de mostos 100% agave.

2. ANTECEDENTES

2.1 DEFINICIÓN DE TEQUILA

La norma oficial mexicana NOM-006-SCFI-1994 establece que el tequila es una bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos, que se preparan a partir de la molienda de las cabezas maduras de agave de la especie *Agave tequilana* Weber, variedad *azul*, previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas, cultivados en las entidades federativas y municipios señalados por la denominación de origen. El jugo de agave (mosto) obtenido puede ser enriquecido con otros azúcares hasta en una proporción no mayor al 49%. El mosto se somete a fermentación alcohólica con levaduras, las cuales pueden ser inoculadas o no. Este mosto es destilado para obtener finalmente el producto. El tequila es un líquido que, de acuerdo a su tipo, es incoloro o amarillento cuando es madurado en recipientes de madera de roble o encino.

De acuerdo con el porcentaje de los azúcares provenientes del agave que se utilizan en la elaboración del tequila, éste se puede clasificar en una de las siguientes categorías:

-Tequila 100% de agave o tequila 100% puro de agave.

Es la bebida que se obtiene de la fermentación del mosto, destilación y rectificación del destilado. El mosto proviene de la molienda de las cabezas maduras de agave, previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas, sometidos a fermentación alcohólica con levaduras, inoculadas o no.

-Tequila

Bebida obtenida por destilación de mostos y rectificación del destilado, en cuya formulación se ha adicionado hasta una proporción no mayor al 49%, azúcares distintos a los derivados de la molienda de las cabezas maduras de agave, sometidos a fermentación alcohólica con levaduras, inoculadas o no.

Tipos de tequila.

De acuerdo con las características adquiridas en procesos posteriores a la destilación y rectificación el tequila se clasifica en cuatro tipos:

-Tequila Blanco: Producto cuya graduación alcohólica comercial debe, en su caso ajustarse con agua de dilución.

-Tequila joven u oro: Producto susceptible de ser abocado, cuya graduación alcohólica comercial debe en su caso, ajustarse con agua para su dilución. Este tipo de tequila es el resultado de la mezcla de tequila blanco con tequilas reposados y/o añejos.

-Tequila reposado: Producto susceptible de ser abocado, que se deja por lo menos dos meses en recipientes de madera de roble o encino, cuya graduación alcohólica debe en su caso, ajustarse con agua de dilución. En mezclas de diferentes tequilas reposados, la edad para el tequila resultante es el ponderado de las edades y volúmenes de sus componentes.

-Tequila añejo: Producto susceptible de ser abocado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos un año en recipientes de madera de roble o encino, cuya graduación alcohólica debe en su caso, ajustarse con agua de dilución. En mezclas de diferentes tequilas añejos, la edad para el tequila resultante es el ponderado de las edades y volúmenes de sus componentes.

2.2 AGAVE PARA PRODUCCIÓN DE TEQUILA

Las plantas de agave (las cuales frecuentemente son confundidas con cactus) pertenecen a la familia *Agavaceae*. Estas plantas son de hojas largas, alrededor de un metro de longitud para las plantas maduras, fibrosas, de forma lanceolada de color verde azulado, cuya parte aprovechable para la elaboración de tequila es la piña o cabeza. La única especie de agave admitida por los efectos de la NOM para la elaboración de tequila es *Agave tequilana* Weber, variedad *azul*, que haya sido cultivada dentro de la zona señalada en la denominación de origen (algunas regiones de los estados de Guanajuato, Michoacán, Nayarit, Tamaulipas y todo el estado de Jalisco).

2.3 PROCESO DE ELABORACIÓN DE TEQUILA

El proceso de elaboración de tequila comienza con la cosecha de las piñas del agave, durante la cosecha las hojas o pencas se eliminan del tallo de agave. Esta actividad se conoce como “jima” y se realiza en las primeras horas de la mañana por trabajadores capacitados conocidos como “jimadores”.

2.3.1 Cocción. La cocción del mosto puede realizarse de diferentes formas. Algunas destilerías utilizan hornos de ladrillo, donde inyectan vapor de agua obteniendo temperaturas de 100° C. La cocción puede prolongarse hasta por 48 horas. El propósito de la cocción es conseguir la solubilidad e hidrolizar los carbohidratos, principalmente inulina, la cual puede ser hidrolizada a azúcares fermentables, mayoritariamente fructosa (Sánchez-Marroquin y P.H. Hope 1953). Otras destilerías han reemplazado los hornos por autoclaves de acero. En una típica operación de cocción con autoclave se inyecta vapor durante una hora, este se condensa y “lava” el agave, se descarta el jugo obtenido y se vuelve a inyectar vapor por 6 horas para obtener condiciones de presión de 1.2 Kg/cm² y una temperatura de 121° C. Se deja reposar el agave en autoclave durante otras 6 horas sin adicionar vapor para obtener una cocción completa con el calor remanente. Durante esta cocción se obtiene un jugo que contiene una alta concentración de azúcares (más de 10% de azúcar), el cual es utilizado posteriormente para formulación del mosto. El agave está listo entonces para realizar la molienda (Cedeño y Álvarez, 1995)

2.3.2 Molienda. Se divide en varias etapas y tiene como propósito extraer los azúcares que se encuentran en la fibra de agave. La etapa de molienda se inicia con el desgarramiento de las piñas, el cual consiste en pasar el agave cocido (en algunas plantas productoras de tequila se desgarran las piñas antes de la cocción) por una máquina que se encarga de desmenuzarlo para, posteriormente, llevarlo a una sección en donde se utilizan prensas de tipo cañero para extraer el jugo. Una vez exprimido este material fibroso pasa por una sección donde se aplica agua para la máxima extracción de los azúcares. Como resultado de este proceso se obtiene un jugo de agave que contiene un 12% de azúcares. Con esta materia prima se formula el caldo o mosto para la fermentación.

2.3.3 Fermentación. Preparado el mosto para la fermentación éste se puede inocular con cultivos iniciadores o fermentar con la microbiota natural.

Los cultivos iniciadores pueden ser levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* o de alguna otra especie. Cuando la planta productora utiliza un cultivo iniciador, éste es obtenido a partir de un cultivo puro de una cepa de *S. cerevisiae* que se mantiene en conservación por liofilización o congelación en nitrógeno líquido. La propagación del cultivo iniciador se lleva a cabo bajo condiciones asépticas, utilizando un medio formulado con los mismos ingredientes que en la fermentación normal pero enriquecidos para promover el crecimiento celular. Cuando se alcanza un crecimiento celular de 10^8 células por mililitro, se inoculan los tanques donde se llevará a cabo la fermentación, con un 5 o 10% (volumen) de un cultivo previo de *S. cerevisiae* (el cultivo iniciador en los fermentadores tiene una población aproximada de 10^6 células/ml.)

Algunas compañías productoras, prefieren una fermentación más compleja en términos de la diversidad microbiana, por lo que no inoculan con un cultivo iniciador, permitiendo que la fermentación se lleve a cabo de forma natural (Cedeño y Álvarez, 1995).

La fermentación se realiza en tanques de acero inoxidable de volumen variable y en muchos casos abiertos. Cuando la fermentación se lleva a cabo con un cultivo iniciador el proceso fermentativo puede durar entre 20 y 32 horas, dependiendo del contenido de azúcar en el mosto y del grado de alcohol deseado, que puede ser de 6% para tequila y 4.5% para tequila 100% (PROY-NOM-006-SCFI-2004.) Si no se adiciona inóculo la fermentación podría durar hasta 7 días (Cedeño y Álvarez, 1995)

La producción de alcohol etílico por las levaduras está asociada con la producción de muchos otros compuestos producidos durante la fermentación, los cuales contribuyen al sabor final del tequila.

Las condiciones no asépticas empleadas en la fermentación pueden provocar que el crecimiento bacteriano incremente. La concentración de bacterias durante la fermentación depende de diferentes factores, algunos de ellos es la ausencia de bacterias durante la propagación de levaduras (en el caso de una fermentación con cultivo iniciador), la abundancia de levaduras en el material crudo y las condiciones de higiene en la planta productora.

Esta etapa del proceso de elaboración de tequila ha sido muy poco estudiada, sin embargo, es un paso muy importante para la obtención del producto ya que en esta fase se obtiene el alcohol y otros compuestos químicos que le dan sabor característico.

2.3.4 Destilación. La destilación involucra la separación y concentración del alcohol partir del mosto fermentado. Además del etanol y otros compuestos secundarios deseables, el mosto fermentado contiene partículas sólidas de agave que consisten principalmente en celulosa y pectina, levaduras, proteínas, sales minerales y algunos ácidos orgánicos.

Existen dos formas de realizar la destilación: mediante la utilización de alambiques o en columnas de rectificación, siendo el primero más usual. En el primer caso regularmente se utiliza un tándem de dos alambiques de cobre, material que ayuda a eliminar compuestos sulfurados indeseables. En el primer alambique el mosto muerto (mosto fermentado) se calienta con vapor y se destila hasta tener un producto intermedio ordinario con una concentración entre el 25-30 % de etanol, al cual se le han removido los sólidos, parte del agua, las cabezas y colas de la fermentación. Las cabezas contienen componentes volátiles de bajo punto de ebullición que destilan antes que el etanol, debajo de los 80° C, como metanol, isopropanol, acetaldehído, acetato de etilo, y las colas las cuales contienen alcoholes menos volátiles de alto punto de ebullición como alcohol isoamílico, ácido acético, etilactato y algunos ésteres (NOM-006-SCFI-1994).

En el segundo alambique, el ordinario se destila nuevamente para enriquecer el contenido alcohólico hasta el 55%, además de refinar considerablemente el producto. Este tequila al 55 % se considera un producto final, ya que de hecho es el que se comercializará a granel. Antes de envasarse, este destilado se diluye con agua potable destilada o desionizada, para lograr productos finales de 38 a 43% de etanol.

2.3.5 Maduración. Una vez destilado, el producto final se concentra en tinajas de paso donde se diluye para transferirlo a las barricas donde se añejara si el objetivo es obtener tequila añejado. Esta última etapa se realiza en barricas de roble o encino blanco, maderas que confieren al producto final aromas, colores y sabores muy peculiares los cuales dependen de diversos factores como la edad, grosor de la duela, graduación alcohólica y condiciones de reposo o añejamiento.

Por último, antes de embotellar se eliminan algunos sólidos conferidos por la madera, esto se realiza a través de filtración con celulosa o carbón activado (NOM-006-SCFI-1994)

2.4 MICROORGANISMOS INVOLUCRADOS EN LA FERMENTACIÓN NATURAL DEL TEQUILA

En un estudio realizado en una planta productora de tequila en la cual se lleva a cabo la fermentación de forma natural sin la adición de un cultivo iniciador, Lachance (1995) reportó la presencia de diferentes especies de levaduras en la fermentación (Tabla 1). Este autor encontró en piñas de agave levaduras como *Clavispora lusitaniae*, *Metschnikowia agaveae*, *Kluyveromyces marxianus*; en las moscas de la fruta que volaban en el área del proceso encontró las levaduras *Pichia kluyveri*, *Hanseniaspora guilliermondii*, en las melazas de agave *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces marxianus*. En el equipo de molienda y desgarramiento de piñas, *Torulaspora delbrueckii*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*. También aisló e identificó diferentes levaduras durante la fermentación. En las etapas iniciales de la fermentación Lachance aisló e identificó *Torulaspora delbrueckii*, especies de *Hanseniaspora*, especies de *Bretanomyces* y *Saccharomyces cerevisiae*. Conforme la fermentación progresaba, la diversidad de las especies iba reduciéndose considerablemente, hasta que la especie *Saccharomyces cerevisiae* predominó.

Lachance (1995) encontró también que en las muestras fermentadas había concentraciones relativamente altas de bacterias productoras de ácido, de las cuales sólo se caracterizaron algunas de las encontradas en etapas tempranas de la fermentación, siendo las predominantes *Leuconostoc* spp. y *Lactobacillus* spp.

En este trabajo donde la identificación de las levaduras se realizó con técnicas dependientes de cultivo de acuerdo a van der Walt & Yarrow (1984), Lachance reporta un total de 10 especies de levaduras durante la fermentación, sin embargo, no hay datos suficientes en cuanto a la diversidad de las poblaciones de levaduras en función del tiempo.

Tabla 1 Comunidades de levaduras identificadas en la fermentación del tequila y habitat relacionados (Lachance, 1995).

| Habitat | Levaduras dominantes | Levaduras secundarias |
|---|--|---|
| Agave fresco | <i>Clavispora lusitaniae</i> <i>Metschnikowia. agaveae</i> | <i>Pichia membranaefaciens</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> |
| <i>Drosophila</i> | <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> | <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Pichia kluyveri</i> <i>Pichia membranaefaciens</i> <i>Candida krusei</i> <i>Hanseniaspora vineae</i> |
| Melazas de agave | <i>Schizosaccharomyces pombe</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> | |
| Agave cocido, mosto, equipo de desgarre | <i>Torulaspota delbrueckii</i> | <i>Candida sp (pulcherrimin)</i> <i>Pichia membranaefaciens</i> <i>Candida intermedia</i> |
| Fermentación | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Zygosaccharomyces bailii</i> <i>Candida milleri</i> <i>Brettanomyces. anomalus</i> | <i>Brettanomyces bruxellensis</i> <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> <i>Hanseniaspora vineae</i> <i>Picchia memebranaefaciens</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> |

Por otro lado Cedeño y Álvarez (1995) reportan que la concentración de la población bacteriana en los mostos fermentados alcanza ocasionalmente una concentración de 10^6 células por mililitro, en tal caso estas bacterias utilizan los azúcares, disminuyen el rendimiento del etanol y algunas veces excretan compuestos indeseables como ácido acético o láctico (Cedeño y Álvarez 1995). Las bacterias más comunes reportadas como contaminantes por estos autores son *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, aunque también mencionan que *Acetobacter* se puede encontrar en los mostos fermentados que se dejan inactivos por períodos de tiempos largos antes de la fermentación.

2.5 MICROORGANISMOS EN FERMENTACIONES DE UVA.

Debido a que no existe mucha información acerca de la dinámica de microorganismos durante la fermentación del tequila una gran parte de la investigación bibliográfica de este estudio está basada en uno de los productos fermentados el cual ha sido muy estudiado en cuanto a la diversidad y dinámica de microorganismos presentes durante la fermentación: el vino. Las fermentaciones vinícolas son llevadas a cabo típicamente por una compleja diversidad de microorganismos que involucran levaduras y bacterias. Diversos estudios han reportado que ocurre una sucesión de levaduras y bacterias durante la fermentación de mostos no estériles. En general, las levaduras son las que predominan durante la fermentación alcohólica en la que el bajo pH y el contenido nutricional de los jugos son factores de selección para el crecimiento de éstas (Cocolin *et al.*, 2000.) En las etapas tempranas de muchas fermentaciones vinícolas se han reportado poblaciones de levaduras pertenecientes a los géneros *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Candida* y *Hanseniaspora*, las cuales presentan baja actividad fermentativa. Las levaduras no *Saccharomyces* crecen típicamente por varios días antes de que la fermentación sea dominada por una o más cepas de *S. cerevisiae*, lo cual ocurre cuando hay un incremento en la concentración de etanol. La predominancia de *S. cerevisiae* en la fermentación, es el resultado de su alta tolerancia al etanol, comparada con otras levaduras presentes en un ambiente vinícola. (Fleet y Heard 1993).

2.5.1 Persistencia (resistencia) de levaduras durante fermentaciones vinícolas

En trabajos realizados para estudiar la dinámica y diversidad de levaduras en fermentaciones vinícolas los investigadores se han enfocado en elucidar el porqué de la persistencia de ciertos géneros de levaduras en estos productos. Piña *et al.* (2004) reportan que, la persistencia de las levaduras no *Saccharomyces* puede depender de diversos factores, tales como la temperatura de fermentación, disponibilidad de nutrientes, cantidad del inóculo de *Saccharomyces* y también presencia de otros microorganismos diferentes de levaduras en la fermentación. Sin embargo, la desaparición progresiva de las levaduras en las fermentaciones se atribuye generalmente a la baja tolerancia (6% v/v) de estos microorganismos a concentraciones altas de etanol. Para levaduras del género *Saccharomyces* existen también diversos factores que les permiten predominar en las fermentaciones, uno de ellos es la temperatura de crecimiento durante la fermentación (30°C aproximadamente) (Mills *et al.* 2002), sin embargo se le da mayor importancia a la tolerancia que presentan a concentraciones de etanol de hasta 12% (Lachance 1995). Para algunas levaduras comunes en la descomposición del vino como *Brettanomyces* y *Zigossacharomyces*, se reporta que son tan tolerantes a etanol como las especies de *Saccharomyces* (Boulton *et al.*, 1995.)

Por otro lado, se sabe que la acumulación de etanol en un ambiente microbiano representa una forma de estrés químico, el cual va dirigido principalmente a la membrana (Piña *et al.* 2004.) La tolerancia de las levaduras al etanol se ha correlacionado con la capacidad de las células de modificar la composición lipídica de su membrana para responder al efecto de desorganización o ruptura de la membrana provocada por el etanol. Thomas *et al.* (1979) reportan que al adicionar esteroides y ácidos grasos insaturados en las fermentaciones vinícolas se obtiene un incremento en la tolerancia al etanol por parte de *S. cerevisiae* como resultado de la incorporación de algunos de estos compuestos en sus membranas. Piña *et al.* (2004) observaron que un ambiente aerobio un cultivo no estresado de *S. cerevisiae* es capaz de sintetizar ácidos grasos saturados e insaturados, pero en un ambiente anaerobio como el existente en la fermentación del mosto de uva, la síntesis de ácidos grasos insaturados y esteroides no fue detectado. Piña *et al.* (2004) estudiaron el efecto de la adición de ergosterol y ácido oleico en cultivos anaerobios de levaduras, observaron la

incorporación de estos lípidos por la células, incrementando así la tolerancia al etanol de *S. cerevisie* y *H. guilliermondii*.

Así mismo, con la finalidad de explicar la dinámica y persistencia de algunas levaduras sobre otras durante la fermentación vinícola, se ha propuesto que cuando la concentración de azúcar en el mosto incrementa de 12 a 18 % ocurre una disminución en el crecimiento de las levaduras (Bafnacová *et al.*, 1999). Thomas *et al* (1996) estudiaron la regulación de rutas anabólicas y catabólicas bajo estrés osmótico, para entender su efecto en el metabolismo celular. Estos autores establecieron la evidencia de que la síntesis de enzimas glicolíticas, así como la síntesis de hexosa monofosfato están reguladas por la concentración de azúcares y limitación de nitrógeno. Thomas *et al.* (1996) observaron que la fermentación enológica se llevaba a cabo de forma tardía o lenta cuando la concentración de azúcares era alta (18 %). Este fenómeno estaba relacionado con una inhibición del metabolismo fermentativo. Ingledew y Kunkee (1985) demostraron que la adición de una adecuada fuente de nitrógeno eliminaba ese efecto de fermentaciones tardías. Al respecto, Mauricio y Salmon (1992), Salmon *et al.* (1993) reportan que el principal factor limitante en el metabolismo fermentativo es la inhibición de transportadores de azúcares. Dicha inhibición se puede dar de dos formas, por represión catabólica o por limitación de síntesis de proteínas en bajas concentraciones de una fuente de nitrógeno, ya que al inhibirse dicha síntesis se inactiva el sistema transportador de azúcares al interior de la célula que favorece o no el crecimiento de las levaduras durante la fermentación.

En fermentaciones vinícolas es bien sabido que una limitante en la síntesis de proteínas es la disponibilidad de nitrógeno en el medio, lo cual produce en estos mostos problemas en la fermentación (Arrizon y Gschaedler, 2002).

2.6 MÉTODOS MOLECULARES APLICADOS EN LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Las técnicas tradicionales para la identificación de levaduras requieren en la mayoría de los casos, enriquecimiento y aislamiento para la caracterización de las cepas. Sin embargo, algunas veces el aislamiento de los microorganismos de su hábitat no siempre es fácil, debido a que no siempre se logran recrear en medios de cultivo las condiciones nutrimentales y fisiológicas necesarias para su crecimiento, estos problemas de recuperación

de microorganismos generan fallas para caracterizar a dichos microorganismos. Con las técnicas tradicionales de cultivo sólo un pequeño porcentaje de microorganismos ha sido identificado, debido a que no todas las especies pueden ser recuperadas, ya que tienen requerimientos nutricionales específicos. Esto puede ocurrir por ejemplo en ambientes tales como suelos, ríos, alimentos fermentados y en ambientes extremos y de gran diversidad microbiana. Por otro lado, se ha visto que la estrategia de describir una comunidad microbiana únicamente por técnicas dependientes de cultivo podría cubrir solo una pequeña fracción de las especies involucradas en dicho hábitat (Ercolini 2004)

Lopandic *et al.* (2006) utilizaron 60 pruebas diferentes para la identificación fenotípica de levaduras asociadas con productos lácteos. Estas pruebas incluyeron fermentación y asimilación de diferentes fuentes de carbono, asimilación de varios compuestos de nitrógeno, requerimientos de vitaminas, resistencia a ciclohexamida, hidrólisis de urea, osmotolerancia, resistencia a diferentes temperaturas, entre otros. Finalmente estos autores compararon los resultados de la identificación fenotípica con la secuenciación parcial del gen 26S de RNAr, encontrando que solo el 46% de las cepas identificadas fenotípicamente coincidía con los resultados de identificación utilizando la secuenciación del gen. Lopandic *et al.* mencionan que el hecho de que las pruebas fenotípicas y bioquímicas sean de limitado potencial, indica que esta caracterización no es suficiente para una identificación no-ambigua de levaduras en la microbiología de alimentos debidos a la difícil interpretación morfológica, bioquímica y fisiológica de las pruebas. Sin embargo mencionan también que la información de la actividad bioquímica y las propiedades fisiológicas tienen un valor en la caracterización de levaduras de importancia biotecnológica, especialmente en la diferenciación de cepas las cuales están involucradas en los procesos de fermentación y maduración.

Lopandic *et al.* concluyen finalmente que el dominio D1/D2 del ADNr 26S ha emergido como una de las más importantes regiones en la identificación de levaduras.

Avances en la ecología microbiana molecular han permitido el desarrollo de diversas herramientas para acceder a la diversidad microbiana presente en hábitats naturales sin la necesidad de aislamiento y enriquecimiento previo de las cepas (Head *et al.*, 1998). Se han desarrollado una gran diversidad de métodos que no requieren el cultivo de microorganismos con el fin de estudiar la diversidad microbiana. Tal es el caso del FISH (fluorescencia por

hibridación *in situ*), DGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturizante), TGGE (electroforesis en gel con gradiente de temperatura), entre otros.

Una paso común de estas técnicas para la identificación de microorganismos, es aislar el ADN o el ARN de una comunidad microbiana mixta y utilizarla como templado para evaluar a la comunidad en total y / o a los organismos individuales (Hugenholtz, *et al.*, 1996). El ADN extraído de los microorganismos es sujeto a una amplificación por PCR usando cebadores universales o cebadores diseñados para amplificar genes como los de ARN ribosomal (ARNr).

Debido a la ubicuidad de las moléculas de ARNr en todas las formas de vida celular, el análisis comparativo de sus secuencias puede ser aplicado para identificación de microorganismos. Las moléculas de ARNr comprenden secuencias dominio altamente conservadas, las cuales contienen regiones variables esparcidas (Head *et al.*, 1998), lo que permite identificar microorganismos del mismo género. Asimismo, el ARNr presenta secuencias específicas u oligonucleótidos cortos que son únicos para cierto grupo de organismos.

En algunos alimentos fermentados en los cuales se han estudiado comunidades eucariotas, existen reportes que sugieren el análisis de genes ribosomales como el 18S y 26S, así como el uso de secuencias heterogéneas de espacios internos transcritos (ITS).

El dominio D1-D2 del gen 26S de ADNr ha emergido como uno de los más importantes en la identificación de levaduras. Las secuencias de la región D1-D2 de todas las levaduras conocidas están accesibles en las bases de datos de NCBI, EMBL o DDBJ (Lopandic *et al.*, 2006). Trabajos de investigación en los últimos 15 años han demostrado que el dominio D1-D2 exhibe suficiente diferencia entre las levaduras, lo cual permite que estas secuencias sean usadas en la predicción de relaciones intra e inter especies (Kurtzman and Robnett, 1997, 1998; Fell *et al.*, 2000).

2.6.1 Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE).

El DGGE (electroforesis en gel de gradiente desnaturizante) es un método mediante el cual los fragmentos de ADN con una misma longitud pero diferente secuencia, pueden ser separados por electroforesis (Fig. 1). Esto ocurre gracias a que los fragmentos de ADN

tienen un perfil diferencial de desnaturalización.

En un gel de DGGE, las condiciones desnaturalizantes están dadas por soluciones de urea y formamida. Una solución de 100% de desnaturalizante químico esta constituida por urea 7 M y formamida 40% en agua. Se preparan soluciones con concentraciones alta y baja (100% y 0 %) del desnaturalizante, se mezclan con la solución de acrilamida y se vierten en un molde, en el cual se genera un gradiente lineal desnaturalizante. En el gel con gradiente desnaturalizante se lleva a cabo la separación de los fragmentos de ADN amplificados. La electroforesis se lleva a cabo a una temperatura constante que oscila entre 55 y 65° C (Ercolini, 2004).

Los fragmentos de ADN de doble cadena amplificados previamente por PCR, que se analizan en un gel de DGGE, se someten a un incremento de gradiente desnaturalizante, obtenido aumentando la concentración de agentes como la urea y formamida, lo cual provoca una desnaturalización parcial de regiones discretas llamadas “dominios de desnaturalización”. La temperatura de desnaturalización (T_m) de estos dominios depende de la secuencia específica. Los gradientes de fusión o desnaturalización de estos dominios dependen de las variaciones en sus secuencias de bases, por lo que los fragmentos correspondientes a microorganismos diferentes tendrán diferentes posiciones en el gel de DGGE (Muyzer y Smalla, 1998). Una vez que se alcanza la T_m del dominio de desnaturalización menor, esa parte del fragmento de ADN se desnaturaliza parcialmente provocando la separación de hebras de ADN. Esta característica reduce la movilidad del ADN en el gel de acrilamida por lo cual el ADN no migra más.

Este método permite la separación de una mezcla heterogénea de un gen amplificado por PCR en un gel de acrilamida (Head *et al.* 1998)

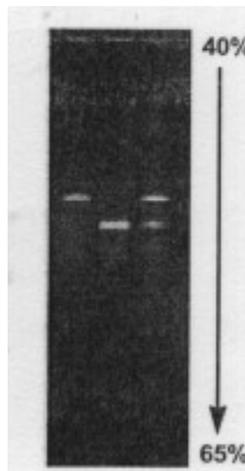


Fig. 1. Migración de fragmentos de ADN de diferentes microorganismos en un gel paralelo de DGGE de acuerdo a su composición de nucleótidos. El gradiente desnaturante utilizado en el gel va de 40-60% de urea-formamida(Bio-Rad 170-9080).

El gradiente desnaturante se puede formar tanto perpendicular como paralelo a la dirección de la electroforesis. Un gel perpendicular de gradiente desnaturante es aquel en el cual el gradiente desnaturante es perpendicular al campo eléctrico (Fig. 2). En los gels de DGGE usualmente se utiliza un gradiente desnaturante de 0 a 100% ó de 20 a 70%. En un gel de gradiente perpendicular se puede cargar una sola muestra o una mezcla de amplicones para detectar el intervalo óptimo desnaturante y obtener la separación de los fragmentos del ADN (Ercolini, 2004). Para evitar la disociación completa del fragmento de ADN de doble cadena que corre por el gel y obtener así una mejor resolución del ADN, se debe colocar en uno de los extremos del cebador una secuencia de aproximadamente 40 nucleótidos de G+C (grapa de GC) (Fromin, *et al.* 2002). Finalmente el patrón de bandas obtenido en un gel de DGGE puede ser revelado tiñéndolo en una solución de bromuro de etidio, o para una mejor resolución de las bandas se recomienda una tinción con plata (Ercolini, 2004.)

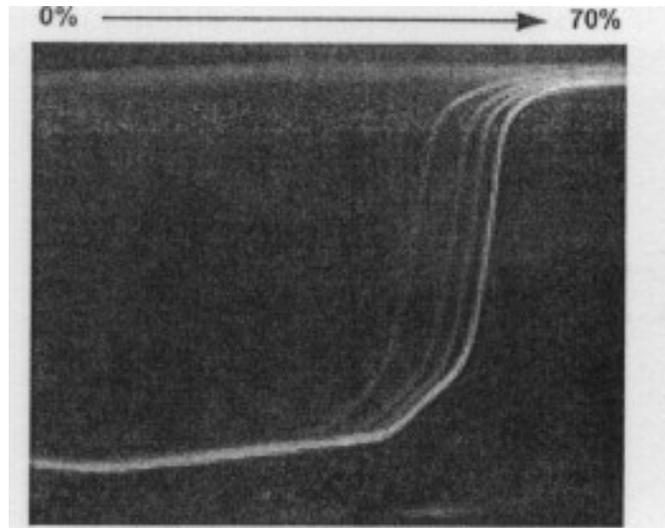


Fig 2. Gel perpendicular de DGGE. Las condiciones desnaturalizantes óptimas son aquellas donde se observa la separación de curvas sigmoideas. En este ejemplo las condiciones desnaturalizantes van de 40 a 70% de solución de urea/formamida (Bio-Rad 170-9080).

El patrón de bandas generado en el análisis de DGGE es considerado como una huella de la comunidad microbiana (Ercolini 2004), donde cada una de las bandas representa un organismo diferente en la comunidad (Fig. 3). Se ha reportado que algunos genes ribosomales presentan varias copias, como en el caso del gen 16S. La presencia de varias copias de un gen podría generar varias bandas por especie, lo cual sería visualizado por múltiples bandas en el gel de DGGE. Las bandas individuales en un gel de DGGE, pueden ser cortadas, reamplificadas y secuenciadas para dar un indicativo de la composición y diversidad de una comunidad microbiana. El método es particularmente útil cuando se examinan poblaciones dinámicas (Head *et al.* 1998).

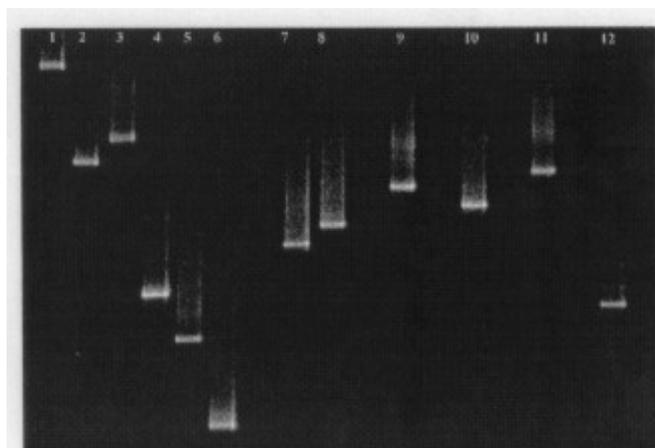


Fig. 3. DGGE paralelo de cepas de levaduras encontradas en leche (Cocolin et al., 2002). Cada banda representa un microorganismo diferente.

2.6.2 Identificación de levaduras por métodos moleculares

Las técnicas tradicionales para la identificación de levaduras se basan en la morfología celular y en el resultado de las reacciones características en una serie de pruebas estandarizadas de asimilación y fermentación de sustratos. Estas pruebas son laboriosas y algunas veces ambiguas debido a la variabilidad de las cepas. Estas dificultades han conducido al uso de comparaciones moleculares, como es el caso de la utilización de comparación de secuencia del gen ribosomal 26S, estrategia que ha incrementado su uso para la identificación de levaduras. Kurtzman y Robnett (1998) proponen la secuenciación como una herramienta para la comparación de cepas, ya que puede ser fácilmente realizada, con la selección de los genes apropiados. Estos autores compararon la secuencia de aproximadamente 600 nucleótidos del dominio D1/D2 del extremo 5' de la subunidad mayor (LSU) del ARNr de alrededor de 500 especies de levaduras, concluyendo que la mayoría de las especies de levaduras pueden ser identificadas a partir de la secuencia del dominio divergente D1-D2, mostraron también que 55 especies ya aceptadas eran sinónimos o especies hermanas de especies descritas previamente.

Algunas otras técnicas basadas en la utilización de ADN para la caracterización e identificación de levaduras incluyen hibridación ADN-ADN, cariotipificación electroforética, RFLPs de ADN cromosomal y mitocondrial así como la ya mencionada secuenciación de ADN ribosomal. De estas técnicas moleculares, los métodos basados en PCR han permitido tanto la diferenciación intraespecies como la identificación de especies de levaduras.

Otro método útil para la identificación de levaduras es el análisis de restricción de diferentes regiones de genes de ARN ribosomal. La técnica consiste en dos pasos: El primero es amplificar una región de ARN ribosomal y posteriormente digerir esos productos de PCR. Esta técnica se basa en amplificar varias secuencias repetitivas del genoma de las levaduras tales como los microsatélites, elementos delta del transposon T y O los espacios transcritos internos (ITS.)

Existen otras secuencias repetitivas tales como las extragénicas palindrómicas repetitivas (REP) y consenso intergénico repetitivo enterobacteriano (ERIC) las cuales han sido descritas en bacterias. Dichas secuencias han sido utilizadas por varios autores (N. Hierro *et al.* 2004) para caracterizar cepas de levaduras de referencia e identificar cepas de levaduras aisladas a partir de fermentaciones de vino. El trabajo de N. Hierro *et al.* (2004), consistió en utilizar oligonucleótidos como cebadores los cuales eran complementarios a: sitios intrones de splicing (Barros *et al.* 1996) sitios REP y elementos ERIC, para producir por PCR huellas digitales que generaran patrones específicos entre las diferentes especies de levaduras. Estos autores lograron obtener patrones de bandas especie-específicos amplificando por separado las tres diferentes regiones antes mencionadas, obteniendo diferentes grados de diferenciación intraespecífica dependiendo del método. Este trabajo se considera uno de los pioneros en diseñar cebadores para amplificar elementos repetitivos en bacterias utilizados exitosamente para la identificación de levaduras (N. Hierro *et al.* 2004).

2.7 APLICACIÓN DEL DGGE PARA LA DETERMINACIÓN DE LEVADURAS EN ALIMENTOS

El DGGE se ha utilizado en los últimos años para diferenciar genes de ARNr directamente purificado de comunidades microbianas complejas (Muyzer *et al.*, 1993). El PCR-DGGE se ha empleado con mayor frecuencia para examinar la diversidad bacteriana (menos frecuentemente la diversidad de hongos) en varios hábitat naturales (Muyzer *et al.*, 1998).

Van Beek (2002) estudió mediante PCR-DGGE de RNAr 16S, el desarrollo de poblaciones de bacterias lácticas durante la fermentación del whisky. Se reporta también la utilización de esta técnica para la evaluación de la diversidad microbiana presente en varios tipos de queso Mozzarella (Coppola *et al.*, 2001).

Cocolin *et al.* (2002) utiliza la misma técnica para el análisis del perfil de poblaciones de

levaduras en leche cruda, y el perfil de levaduras en fermentaciones vinícolas (Cocolin, 2000).

Manzano *et al.*, (2004) realizó una diferenciación por medio de PCR-DGGE de cepas de *Saccharomyces sensu stricto* (especies de *Saccharomyces* relacionadas con fermentaciones alcohólicas: *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus*) utilizando los amplicones de regiones intergénicas (ITS) para el gel con gradiente desnaturizante (DGGE).

La utilización de la metodología del DGGE para el análisis de la diversidad de comunidades microbianas en diferentes bebidas y alimentos fermentados (vino, whisky, pozol, cocoa, entre otros) ha ido en aumento, así mismo se han realizado modificaciones de la técnica para lograr dichos objetivos, como es el caso de la técnica llamada electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE). En esta metodología se forma un gradiente de temperatura para lograr la desnaturización del ADN previamente amplificado, a diferencia del gradiente desnaturizante de urea formamida empleada en el DGGE. Esta metodología del TGGE fue utilizada por S. Hernán-Gómez *et al.* (2000) para caracterizar levaduras involucradas en la fermentación de la uva. Dichos autores utilizaron fragmentos de genes ribosomales 18S en el gel de TGGE con un gradiente de temperatura de 62 a 65 ° C, encontrando 74 cepas de levaduras diferentes. En este trabajo se demostró también la formación de heteroduplex al mezclar fragmentos de ADN de dos levaduras para su amplificación. La formación de heteroduplex durante la amplificación se demostró por la presencia de dos bandas en los geles de DGGE, comparado con la presencia de una sola banda al tener el ADN amplificado de una sola cepa.

En un trabajo realizado para estudiar la diversidad de levaduras involucradas en la fermentación de *Coffea arabica* en el este de África, Wafa *et al.* (2004), compararon una técnica genotípica de identificación (amplificación de la región ITS-1, ITS-4 del gen ribosomal 5.8 S) y la técnica directa por DGGE, dichos autores aislaron 110 levaduras, las cuales se dividían en 8 grupos (identificados por el tamaño de la banda de los fragmentos ITS amplificados), tres de estos 8 grupos predominaron, los cuales correspondían a las levaduras: *Pichia kluyveri*, *Pichia anomala* y *Hanseniaspora ovarum*. En los geles de DGGE se detectó la presencia de *H. ovarum* en todas las muestras, así como *P. kluyveri*, lo cual demuestra que en las dos metodologías empleadas para la identificación de levaduras

durante la fermentación del producto se obtienen resultados similares.

Debido a la diversidad de levaduras involucradas en la fermentación de los mostos para producción de tequila y a la complejidad que implica aislar y caracterizar cada una de ellas, en el presente estudio se realizó un análisis de dicha diversidad, trabajando con fermentaciones controladas de mostos de agave. Se utilizó para tal fin, cultivos puros de levaduras *Saccharomyces* y no *Saccharomyces* aisladas a partir de mostos fermentados. El análisis de la diversidad se realizó por medio de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE). La diferencia entre una fermentación natural y una inoculada, en cuanto a las levaduras presentes en cada una de ellas, sirvió para concluir que las levaduras no *Saccharomyces* son capaces de desarrollarse a lo largo de toda la fermentación. Las levaduras no *Saccharomyces* se han reportado como no tolerantes a altas concentraciones de etanol y por tanto su presencia se espera sólo en las primeras etapas de la fermentación, cuando la concentración de etanol es baja (Fleet y Heard, 1993).

No obstante, en este trabajo se demostró que levaduras no *Saccharomyces* persisten durante toda la fermentación, tanto natural, como inoculada de mostos para producción de tequila.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar los cambios en la diversidad de levaduras en mostos 100% de *Agave tequilana* *Weber* variedad *azul* durante la fermentación para obtención de tequila.

3.2 Objetivos específicos

-Determinar los cambios en la diversidad de levaduras por medio de la técnica de PCR-DGGE en un modelo de fermentación inoculada de mosto 100% agave.

-Determinar los cambios en la diversidad de levaduras por PCR-DGGE en un modelo de fermentación natural de mostos 100 % de agave

-Establecer la diferencia entre los modelos de fermentación inoculada y fermentación natural en cuanto a la diversidad de levaduras

4 HIPÓTESIS

En una fermentación natural de mostos de agave, donde las levaduras *Saccharomyces* y no *Saccharomyces* se encuentran a la misma proporción, se observará el desarrollo de ambas permitiendo su permanencia durante toda la fermentación.

En una fermentación inoculada de mostos de agave, donde el cultivo iniciador de *S. cerevisiae* se encuentra en mayor proporción, se observará el desarrollo de levaduras no *Saccharomyces*, permaneciendo éstas hasta el final de la fermentación.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Fig. 4. Purificación e identificación de levaduras a partir de mostos fermentados de agave

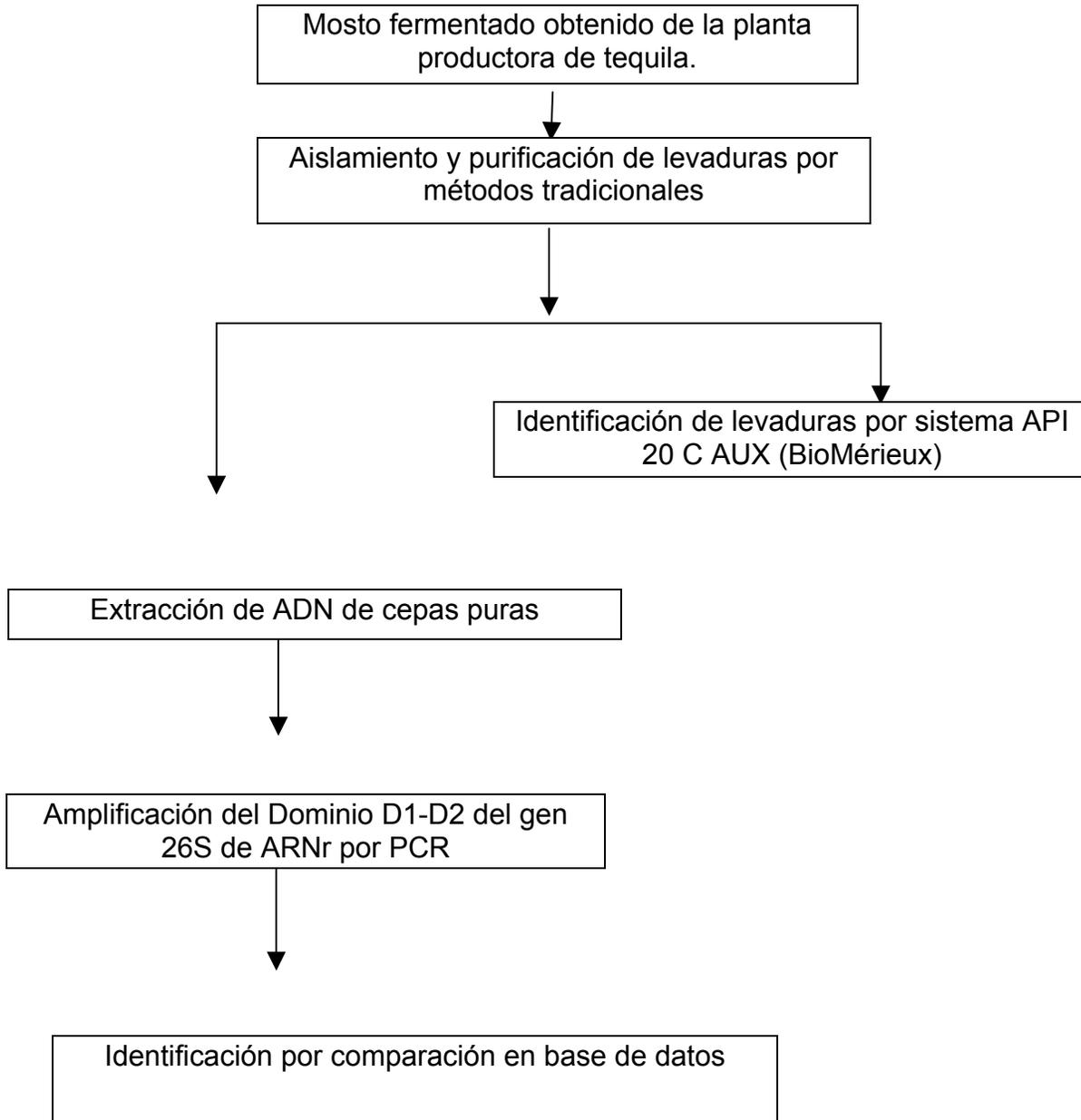


Fig. 5. Preparación de la técnica de PCR-DGGE para levaduras aisladas de mostos de agave.

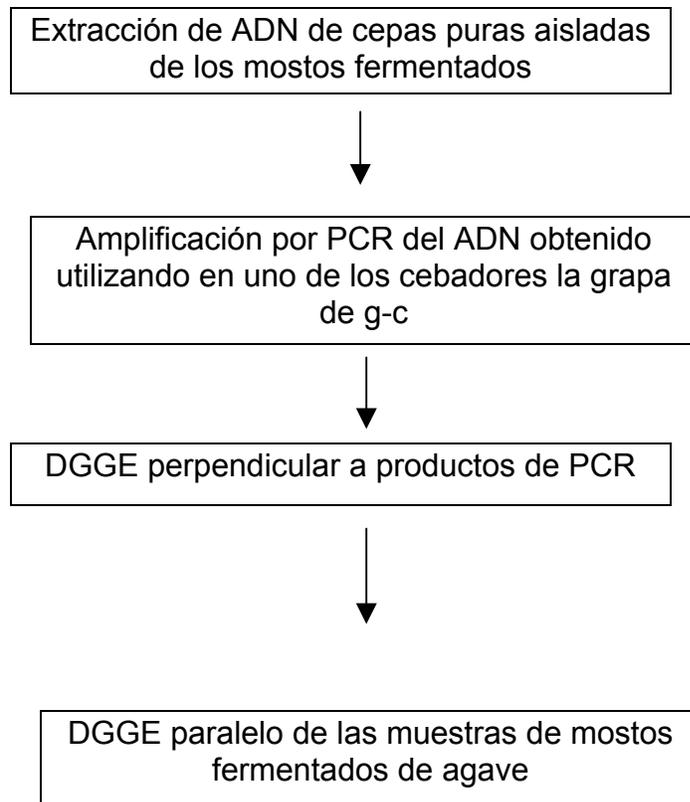
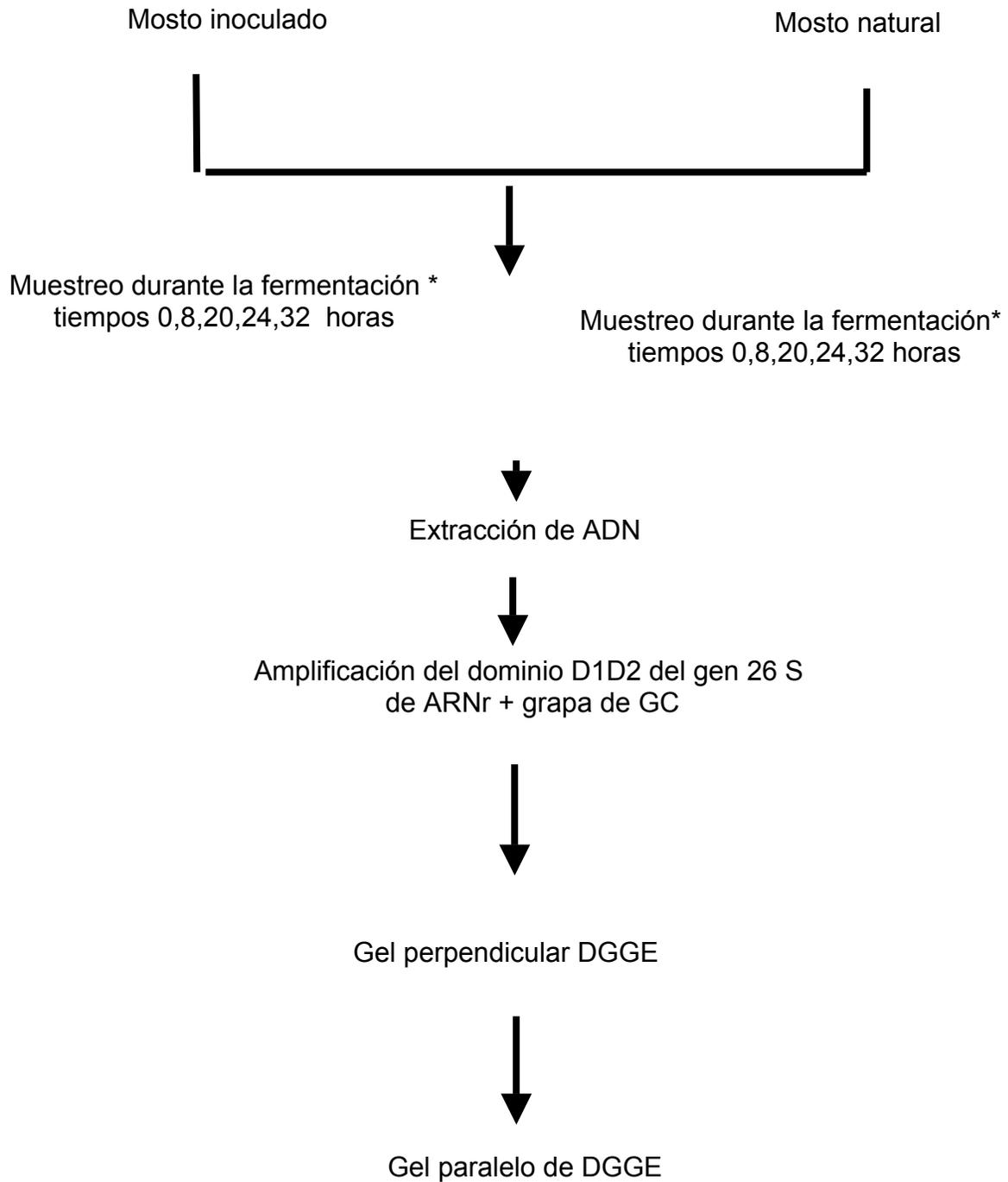


Fig. 6. Fermentaciones controladas



*Determinación de azúcares reductores, etanol y dinámica de la fermentación por métodos dependientes de cultivo (cuenta en placa).

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS POR MÉTODOS TRADICIONALES DEPENDIENTES DE CULTIVO.

El aislamiento de levaduras se realizó en muestras de mosto fermentado donadas por una empresa tequilera del Estado de Jalisco. Para los modelos de fermentación se obtuvo agave sin fermentar de la misma empresa y posteriormente se realizó la fermentación con las levaduras aisladas previamente de los mostos fermentados.

6.1.1 Aislamiento de levaduras a partir de mostos fermentados

Para el aislamiento de levaduras se tomaron dos muestras de mosto de agave usado para la elaboración de tequila 100%. Se realizaron diluciones decimales en agua peptonada al 0.1% y se inoculó 0.1 ml de cada dilución en cajas con agar YM (0.1% Extracto de levadura, 0.5% de peptona y 2% Glucosa, 1.5% agar). Las cajas se incubaron a temperatura ambiente de 48 a 72 horas. Después de este tiempo se seleccionaron las colonias de levaduras que presentaron características macroscópicas diferentes, posteriormente se realizaron observaciones en el microscopio para diferenciarlas por características microscópicas.

6.1.2 Purificación de levaduras.

Las colonias seleccionadas en el paso anterior se resembraron en cajas con agar YM por el método de extensión en superficie. Se tomó una colonia de las cajas para corroborar su pureza mediante la observación en el microscopio. Una homogeneidad en la forma de las levaduras de las colonias seleccionadas se consideró como una colonia pura, procediendo a resembrarla en tubos con agar YM inclinado. Los tubos con las cepas se guardaron en refrigeración para posterior análisis.

6.1.3 Identificación Bioquímica de Levaduras

Las cepas de levaduras ya puras se identificaron por medio del Sistema API 20 C AUX (BioMérieux). La inoculación e incubación se realizó según la técnica descrita en el manual del proveedor. Los resultados de las pruebas bioquímicas del kit para cada levadura se analizaron en el sistema APILAB PLUS (BioMérieux).

6.2 IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS POR MEDIO DE SECUENCIACIÓN DEL GEN RIBOSOMAL 26 S.

6.2.1 Preparación del paquete celular

Se inocularon con las diferentes levaduras aisladas tubos con caldo YM (0.1% extracto de levadura, 0.5% peptona, 2% glucosa). Los tubos con el inóculo se incubaron con agitación orbital a 180 rpm. durante 18 horas a 30° C. Después de la incubación las células se lavaron 2 veces con agua estéril eliminando el sobrenadante, posteriormente se centrifugaron a 15000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4° C. El paquete celular se transfirió a un tubo eppendoff y resuspendió en 1 ml de agua estéril. Finalmente el tubo se congeló para su uso posterior.

6.2.2 Extracción de ADN de cepas puras de levaduras.

Se descongeló el paquete celular y se centrifugó en microcentrífuga a 14000 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante, se añadieron a las células 500 µl de buffer de extracción (Anexo 1) y el equivalente a 200 µl de perlas de vidrio (previamente lavadas en ácido) de 400-600 micrones de la marca SIGMA. Se agitaron los tubos en vortex a máxima velocidad durante 3 minutos. Los tubos se incubaron en un baño de agua a 65° C durante 1 hora. Terminada la incubación se agitaron los tubos en vortex a máxima velocidad durante 3 minutos. Posteriormente se centrifugaron los tubos en microcentrífuga a máxima velocidad durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendoff nuevo y estéril, se añadieron 700 µl de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (24:24:1) de la marca SIGMA, se agitó suavemente inclinando el tubo y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendoff nuevo y estéril y se repitió el paso anterior. Después de la centrifugación se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendoff nuevo y estéril y se añadieron 500 µl de cloroformo, se agitó suavemente y se centrifugó en microcentrífuga a 14000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y estéril y se le añadieron 324 µl de isopropanol frío. El tubo se mantuvo a temperatura de congelación durante 5 minutos para precipitar el ADN. En el caso de que el ADN no hubiera precipitado, se adicionó al tubo 4 µl de acetato de amonio 3 M y se incubó 1 hora en congelación. Posteriormente se centrifugó en las mismas condiciones mencionadas en el paso previo. Se descartó el sobrenadante y el ADN precipitado se lavó con 1 ml de etanol

adicionándolo lentamente por las paredes del tubo. Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos y se descartó el etanol. La pastilla de ADN se diluyó en agua desionizada estéril. Se incubaron los tubos en un baño de agua a 55° C durante 15 minutos y el templado de ADN se guardó en congelación para su posterior uso.

6.2.3 Amplificación de ADN del fragmento del gen ribosomal 26S

Se amplificó simétricamente el dominio divergente D1/D2 (nucleótidos 63-642 para *S. cerevisiae*) del extremo 5' de la subunidad mayor (LSU) (26S) del gene de ARNr con los cebadores de ida NL-1 (5'- GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG) y de reversa NL-4 (5'- GGT CCG TGT TTC AAG ACG G) reportados por Kurtzman y Robnett (1998). El volumen final de la reacción de PCR fue de 50 µl con las siguientes concentraciones de reactivos: 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 3 mM de MgCl₂, 10 mM dNTP mix, 10 µmol/µl de cada cebador, 1.25 UI de Platinum taq DNA polimerasa (Invitrogen). Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización previa 95°C por 12 minutos, 36 ciclos con temperatura de desnaturalización de 94° C durante 1 minuto, alineamiento a 52° C por 2 minutos, extensión 72° C por 2 minutos y una extensión final de 72° C durante 10 minutos. Los productos fueron analizados en un gel de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml), visualizados bajo luz UV y fotografiados en el equipo Fluor-S (Bio-Rad).

6.2.4 Identificación de levaduras por medio de la secuenciación del gen ribosomal 26S.

Para la identificación de las levaduras se secuenciaron los fragmentos amplificados por PCR en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Las secuencias se compararon en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (<http://ncbi.nih.gov>), utilizando la herramienta de BLAST para buscar los microorganismos relacionados con lo cual se obtuvo la identificación de las levaduras. Estas levaduras se utilizaron como cepas de referencia en el DGGE para la identificación de las mismas en los mostos fermentados.

6.3. FERMENTACIONES CONTROLADAS DE MOSTOS DE AGAVE.

6.3.1 Fermentación natural de mostos 100% de agave.

En un estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo en una planta productora de tequila, la cual utiliza un cultivo de *Saccharomyces cerevisie* como iniciador, se aislaron diferentes levaduras *Saccharomyces* y no *Saccharomyces* del mosto antes de ser inoculado.

En nuestro estudio denominaremos fermentación natural, a la fermentación a la que no se le adicionó *S. cerevisiae* como cultivo iniciador, sino que se dejó fermentar con 4 de las levaduras que se identificaron en los mostos industriales antes de la fermentación. Los mostos para las fermentaciones controladas fueron pasteurizados a 80° C durante 15 minutos y posteriormente se simularon las condiciones de fermentación del mosto industrial agregando las levaduras.

6.3.2 Preparación del preinoculo para la fermentación natural

Para la preparación del preinoculo de las levaduras no *Sacharomyces* con las que se llevó a cabo la fermentación natural, se inocularon tres asadas del crecimiento en agar YM de las levaduras que se encontraron en mayor proporción en los mostos fermentados industrialmente las cuales corresponden a *Kluyveromices marxianus*, *Candida glabrata* y *Zygosaccharomyces bailii*, además se inoculó una levadura *Saccharomyces cerevisiae* diferente al cultivo iniciador, que para fines prácticos se llamó *S. cerevisiae* A (Anexo 5) en matraces Erlenmeyer de 125 ml que contenían 30 ml de mosto 100% de agave (4° Brix), obtenido de la planta productora de tequila. Cada una de las cuatro levaduras se inoculó en un matraz por separado. Los matraces se incubaron a 30° C, en una incubadora Lab-Line con agitación orbital a una velocidad de agitación de 250 rpm, durante 4 horas con el fin de alcanzar una concentración celular de 10^4 ufc/ ml (concentración a la cual se encontraron las levaduras antes de agregar el cultivo iniciador para la fermentación).

6.3.3 Fermentación natural de los mostos

Se colocaron 650 ml de mosto 100% de agave (14° Brix) en matraces de 1 l, se adicionó a los mostos 1% de extracto de levadura como suplemento nutritivo. Los matraces se inocularon con el 5% (v/v) de cada una de las levaduras obtenidas anteriormente. El mosto se incubó para la fermentación natural en un baño de agua a 30° C sin agitación y con reflujo para mantener la temperatura constante. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de la fermentación (0, 4, 8, 20, 24 y 32 horas) y se realizó una cuenta total en placa en agar YM y WL. Finalmente se realizó la extracción de ADN de levaduras directamente de los mostos, cuantificación de azúcares reductores por método de DNS y cuantificación de etanol por medio del kit enzimático comercial Boehringer.

6.3.4. Conteo en placa de levaduras.

De las muestras que se tomaron en los diferentes tiempos de la fermentación se realizaron diluciones decimales en agua peptonada al 0.1% y se inoculó 0.1 ml de cada dilución en cajas con agar YM (0.1% Extracto de levadura, 0.5% de peptona y 2% Glucosa, 1.5% agar nutritivo WL (DIFCO) y agar Lisina (DIFCO). Estos medios permiten realizar el conteo en placa de levaduras provenientes de fermentación para obtención bebidas destiladas y levaduras utilizadas en panificación (Manual DIFCO 11° Edición). Las placas petri se incubaron a 30°C de 48-72 horas. Después de este tiempo se distinguieron las levaduras inoculadas de acuerdo con sus características macroscópicas, y se cuantificaron para determinar la cuenta de cada una de ellas en el cultivo mixto.

6.3.5 Preparación del preinoculo para la fermentación no natural (inoculada)

Se inoculó un matraz Erlenmeyer de 125 ml que contenía 60 ml de mosto estéril con 3 asadas de la cepa de *S. cerevisiae* (que para fines prácticos llamamos *S. cerevisiae* B) utilizada como cultivo iniciador. Se incubó durante 18 horas a 30° C con una velocidad de agitación de 250 rpm, para alcanzar una población celular final de 10⁶ UFC/mL (Arrizon y Gschaedler, 2002).

6.3.6 Fermentación inoculada con el cultivo iniciador de la cepas *S. cerevisiae* en mostos 100% de agave.

En matraces de 1000 ml se colocaron 650 ml del mosto 100% de agave adicionando 1% de extracto de levadura como suplemento nutritivo. Los matraces se inocularon con el cultivo iniciador de *S. cerevisiae* B obtenido en el paso previo. Se inoculó además el 2.5% (v/v) de cada una de levaduras *Saccharomyces* A y no *Saccharomyces* utilizadas en la fermentación natural. El preinoculo de estas levaduras se obtuvo inoculando cada cepa por separado en mostos (4° Brix) e incubando durante 4 horas en el agitador orbital a 250 rpm. Para mantener la temperatura constante durante la fermentación, se utilizó un baño de agua a 30° C con reflujó. Se tomaron muestras durante la fermentación a diferentes tiempos (0, 8, 20, 24 y 32 horas) para cuenta en placa, extracción de DNA, determinación de azúcares y etanol.

El conteo en placa de las levaduras se realizó de acuerdo con la metodología descrita.

6.4 DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE LEVADURAS DURANTE LA FERMENTACIÓN NATURAL E INOCULADA EN MOSTOS 100% DE AGAVE POR EL MÉTODO DE DGGE.

6.4.1 Obtención del pellet celular de levaduras presentes en mostos fermentados

Los mostos fermentados se conservaron en congelación hasta su tratamiento para extracción de ADN. El mosto se descongeló a temperatura ambiente para su utilización. Se tomaron 20 ml de las muestras de cada tiempo de fermentación, este volumen se depositó en tubos de centrífuga, los tubos se incubaron en un baño de agua caliente (40° C) durante 15 minutos para homogenizar la muestra. Después del calentamiento se incubaron en el refrigerador durante 30 minutos, permitiendo la sedimentación de las levaduras. Las muestras se filtraron con ayuda de vacío, papel filtro y gasa. Después de filtrar el mosto, el papel y la gasa se lavaron con agua destilada estéril y se colectó el filtrado en un tubo de centrifuga de 40 ml. El filtrado se centrifugó en centrífuga Beckman a 1000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, se colectó el pellet en un tubo limpio y estéril y el sobrenadante se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones, colectando nuevamente el pellet en el tubo anterior. Este paso se repitió una vez más, para asegurar concentrar la mayor cantidad de células de levaduras posible.

Se colectaron tanto los sedimentos (células de levaduras concentradas) obtenidos después de centrifugar el filtrado (método 2 para obtención del paquete celular) y el sobrenadante final método 1 para obtención del paquete celular), para elucidar en cuál de las dos partes (sedimentos o sobrenadante) se obtenía mayor extracción de ADN de levaduras. La parte de sedimentos (método 2 para obtención de células) se lavaron 2 veces con agua destilada estéril, centrifugándolos finalmente a 15 000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4° C. En el último lavado se aseguró eliminar toda el agua del pellet retirándola con ayuda de una pipeta y punta estéril. La parte de sobrenadantes (método 1 para obtención de células) se centrifugó también en las mismas condiciones y se conservó el sedimento obtenido de este centrifugado.

6.4.2. Extracción enzimática de ADN de levaduras obtenido a partir de los mostos fermentados

Los sedimentos obtenidos en el paso anterior (método 1 y 2 para obtención del paquete celular) se resuspendieron por separado en 4 ml de solución amortiguadora TE (Anexo 1), se

homogenizó en vortex agitando a velocidad media, la suspensión se centrifugó en microcentrífuga a 10000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 4 ml de Buffer Y1 (agitando a velocidad máxima en vortex mientras se adicionó el buffer, para asegurar tener la solución homogénea). Se adicionaron 250 µl de Liticasa Sigma (1000 U/ml) y se incubó en un baño de agua a 30° C durante 45 minutos.

Después de la incubación se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos a 4° C. y se eliminó el sobrenadante. Los esferoplastos obtenidos se resuspendieron en 5 mL de Bufffer G2 (Anexo 1), se homogenizó invirtiendo el tubo varias veces o en vortex a velocidad media durante 30 segundos (asegurándose de homogenizar muy bien). Se adicionaron 25 µl de proteasa o proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó a 50° C durante 60 minutos.

El pellet de las células fragmentadas se separó por centrifugación a 10 000 rpm durante 10 minutos a 4° C. El sobrenadante se colectó en un tubo limpio y estéril y el pellet se descartó. Se tuvo el cuidado de que el sobrenadante fuera claro, no blanquecino y libre de partículas.

6.4.3 Amplificación de ADN de levaduras para DGGE

Se realizó la amplificación de aproximadamente 250 nucleótidos de la región extremo 5' del gene 26S del ARNr usando el cebador de ida NL-1 (5'- **CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG** GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA G) (la secuencia grapa de GC se indica con letras resaltadas) y el cebador de reversa LS2 (5'- ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC) (correspondiente a la posición 266 a 285 de oligonucleótidos en el gene 26S ARN de *S. cerevisiae*) (Cocolin *et al.*, 2000). La reacción PCR se realizó en un volumen final de 50 µl con las siguientes concentraciones de reactivos. 10mM Tris.HCl, 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada nucleótido (dNTP's), 0.2 µM de cada cebador, 1.25 UI de taq. polimerasa, 4 mg/ml de albúmina bovina sérica (sigma) y aproximadamente 10 ng de extracto de ADN. La reacción se realizó en un termociclador con las siguientes condiciones de reacción: desnaturalización 90 ° C por 1 minuto, alineamiento a 52 ° C por 45 segundos, extensión a 72 ° C por 1 minuto, por 30 ciclos, con una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95 ° C y una extensión final por 7 minutos a 72 ° C (Cocolin *et al.*, 2000).

Después de la amplificación las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 2% y se llevó a cabo una electroforesis a 60V durante 60 minutos para corroborar la amplificación del fragmento de ADN del tamaño esperado.

6.4.4 Gel perpendicular de gradiente desnaturante de los amplicones de ADN de cepas puras de levaduras

Se realizaron geles perpendiculares de acrilamida en condiciones desnaturantes de urea-formamida con un intervalo de concentración 30-80% y 30-60% (Anexo 2) con la finalidad de buscar la mejor separación de los productos de PCR obtenidos a partir de la amplificación de ADN de las cepas puras. La mezcla de cada uno de los productos de PCR obtenidos a partir de las cepas puras de levaduras, se aplicaron directamente en el gel de acrilamida al 8% (Anexo1) utilizando un buffer de corrida preparado con Tris-acetato 40 mM, Na₂EDTA.H₂O pH 8.5 (Buffer TAE Anexo 2) y un buffer de carga de azul de bromofenol (Anexo 2). Una vez cargados los productos de PCR en el gel de acrilamida se hizo una electroforesis con un voltaje constante de 120 volts durante 2 horas a una temperatura constante de 60° C (Cocolin *et al.*, 2000). Después de la electroforesis el gel se reveló con el Kit DNA silver staining de Amersham Biosciences y se tomó una impresión en el equipo Fluor-S (Bio-Rad) para posterior análisis.

6.4.5 Gel paralelo de DGGE de los amplicones de ADN de levaduras extraído de las fermentaciones controladas natural e inoculada de mostos de agave

Una vez que se obtuvieron las condiciones óptimas desnaturantes en el gel perpendicular de DGGE, se realizó el gel paralelo de DGGE con la finalidad de obtener la separación de ADN de las levaduras presentes durante las fermentaciones natural e inoculada.

Las cepas puras se tomaron como marcador de referencia para comparar cuáles de estas levaduras estaban presentes en cada tiempo de la fermentación. El marcador se preparó en un tubo eppendoff estéril, para lo cual, se tomaron 30 µl del producto de PCR de cada una de las cepas puras, el ADN se homogenizó agitando el tubo en un vortex, se tomaron 30 µl de esta mezcla y se le añadieron 20 µl de buffer de carga de azul de bromofenol. Para las muestras de las fermentaciones se tomaron 30 µl de cada uno de los productos de PCR obtenidos de los diferentes tiempos de fermentación y de las dos fermentaciones y se mezclaron cada uno por separado con 20 µl de buffer de carga de azul de bromofenol. Las mezclas resultantes, tanto del marcador como cada uno de los tiempos de fermentación, se aplicaron directamente en un gel de acrilamida al 8% utilizando un buffer de corrida preparado con Tris-acetato 40 mM, Na₂EDTA.H₂O pH 8.5 (Buffer TAE) con un gradiente desnaturante de 30 a 60% de urea/formamida. La electroforesis se realizó con un voltaje

constante de 70 volts por 16 horas a una temperatura constante de 60° C (Cocolin *et al.*, 2000).

Después de la electroforesis se tiñó el gel con un el kit DNA Silver Staining de Amersham Biosciences (cat.17-6000-30) siguiendo las instrucciones del proveedor y se visualizó y tomó impresión en el equipo Fluor-S (BioRad).

6.5 DETERMINACIÓN DE AMPLIFICACIÓN PREFERENCIAL DURANTE LA REACCIÓN DE PCR

Bajo la sospecha de que hubiera una amplificación preferencial entre algunas cepas de levaduras presentes durante la fermentación de tequila, se realizó un experimento en el cual se pusieron en una reacción de PCR, concentraciones iguales de ADN de las levaduras *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, y *C. glabrata*; se escogió a estas levaduras por ser las que se encuentran con mayor frecuencia en la fermentación de los mostos de agave. El experimento se llevó a cabo de la siguiente manera:

En una reacción de PCR siguiendo el protocolo descrito en la metodología, se realizó una mezcla de ADN de cepas puras de las levaduras, *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *C. glabrata*, ajustando la concentración de ADN, de tal forma que el ADN de las levaduras tuviera la misma concentración: 30 ng/μl. En la Tabla 2 se muestran las distintas combinaciones de ADN de levaduras que se realizaron.

La concentración de cebadores NL1-grapa y LS2, así como las concentraciones de MgCl₂, Buffer de PCR 10X, enzima Taq. polimerasa y dNTPs se mantuvieron constantes, tal como se describe en la metodología descrita por Cocolin *et.al* 2002. Las condiciones de PCR en el termociclador también fueron las mismas a las descritas por este autor. Se tomaron 10 μl del stock de ADN de 30 ng/μl de cada microorganismo para la reacción de PCR de acuerdo a las combinaciones mostradas en la tabla 2.

| Levadura | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|----------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| <i>S. cerevisiae</i> | X | | | X | X | | X |
| <i>K. marxianus</i> | | X | | X | | X | X |
| <i>C. glabrata</i> | | | X | | X | X | X |

Tabla 2. Combinaciones de ADN de cepas puras de levaduras en una reacción de PCR para determinar la presencia de amplificación preferencial entre ellas. El número de la columna indica la reacción que se llevó a cabo con el microorganismos señalado como X.

X= Concentración (30 ng/μl) de ADN de las cepas puras de levaduras.

Una vez realizada la reacción de PCR, se tomaron 25 μl de cada reacción y se mezclaron con 15 μl del buffer de carga. Esta mezcla se aplicó a un gel paralelo de DGGE con gradiente desnaturizante de urea/formamida de 40-60% de acuerdo a lo descrito en la metodología. Al término de la electroforesis, el gel se tiñó con el kit de plata y se tomó una impresión en el equipo Fluor-S (Biorad). Se utilizó el programa Quantity One versión 4 para Windows, para medir la intensidad de las bandas en los geles de DGGE y así poder elucidar la amplificación preferencial entre cepas. La intensidad de la banda fue medida como la altura del pico de la misma y determinada por el programa Quantity One. Dichos valores se sometieron a un análisis de varianza y/o prueba t de Student (Montgomery, 1991) con el fin de conocer si había diferencia significativa en la amplificación (Anexo 3). El análisis estadístico se realizó utilizando un intervalo de confianza de 95%. Todas las reacciones descritas en la Tabla 2 fueron realizadas por triplicado, así como los geles de DGGE.

6.6 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES Y ETANOL

Para la determinación de azúcares y etanol, los mostos se centrifugaron en una centrifuga Beckman a 15000 rpm, durante 15 minutos y 4° C de temperatura. Se utilizaron 3 ml de mosto centrifugado, los cuales fueron incubados a 80° C durante 15 minutos para detener las reacciones enzimáticas. Se realizaron las diluciones pertinentes para llevar a cabo la cuantificación de azucares y etanol.

Para la cuantificación de etanol, se utilizó un kit comercial de la marca Boehringer (catálogo número 10176290035), con la finalidad de monitorear la dinámica de producción de éste por

parte de las levaduras presentes durante la fermentación de los mostos, siguiendo la metodología descrita por el proveedor (Anexo 4).

Para monitorear el consumo de azúcares, éstos se cuantificaron por medio de la técnica de DNS (azúcares reductores, de acuerdo a Miller, 1959) utilizando un espectrofotómetro Agilent 8453 y maltosa (Sigma M5885) para realizar la curva estándar (Anexo 4).

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE LEVADURAS A PARTIR DE MOSTOS FERMENTADOS DE AGAVE

La primera parte de este trabajo consistió en aislar levaduras del mosto de agave de diferentes etapas del proceso de fermentación: mosto sin fermentar, mosto fermentando y mosto al final de la fermentación. Este aislamiento de levaduras se llevó a cabo para realizar la selección de las cepas que servirían como referencia en los geles de DGGE y así estudiar el comportamiento de la población de levaduras durante las fermentaciones de mostos de agave inoculados con 5% de un cultivo iniciador de *S. cerevisiae*, y de mostos fermentados de forma “natural” con la población de levaduras encontradas en éste, previo a la inoculación del cultivo iniciador de *S. cerevisiae*.

Se aislaron 3 levaduras diferentes, las cuales se encontraron en mayor proporción en los mostos fermentados. Las características de éstas se presentan en la Tabla 3. Las levaduras fueron seleccionadas con base a los análisis macroscópicos (características de la colonia) y microscópicos (forma y homogeneidad de las células). La selección de estas cepas se realizó con base a la diferencia en crecimiento y forma de las colonias en agar YM.

La información arrojada por el sistema API 20 C AUX (bioMérieux), el cual se basa en la identificación de los microorganismos de acuerdo al perfil de fermentación de azúcares (Tabla 3), muestra un alto porcentaje de identificación (99 y 94 %) para dos de las levaduras seleccionadas (*Saccharomyces cerevisiae* y *Candida kefir* respectivamente. *Candida kefir* es la forma asexual de *K. marxianus* (Barnett *et al.*, 2000). Para la levadura identificada como *Candida magnoliae* el porcentaje de identificación fue de 64%.

Se realizó la extracción de ADN de estas cepas puras de levaduras aisladas de los mostos fermentados de agave según lo descrito en la metodología. Después de la extracción, se mandó secuenciar el fragmento de ADN amplificado, correspondiente a 560 pares de bases del dominio D1/ D2 del gen 26 S del ARNr. Los resultados observados en la tabla 3 fueron obtenidos a partir de la secuenciación de los productos amplificados por PCR.

Tabla 3. Identificación de levaduras por el Sistema API 20 C AUX (bioMérieux).

| Fuente de levaduras | Medio de cultivo para aislamiento | Características macroscópicas | Identificación | % de identidad |
|-----------------------------------|-----------------------------------|---|---|----------------|
| Mosto sin fermentar | Agar YM | Colonias blancas, aspecto butiroso | <i>S. cerevisiae</i> | 99 |
| Mosto en fermentación | Agar YM | Colonias blancas, opacas, aspecto butiroso | Perfil dudoso <i>Candida magnoliae</i> | 64 |
| Mosto al final de la fermentación | Agar YM | Colonias blancas, grandes, aspecto butiroso | <i>Candida kefir</i> | 94 |

Los resultados de la identificación de las levaduras (Tabla 4) aisladas de los mostos corresponde a *Saccharomyces cerevisiae*, con un 99% de identidad; *Kluyveromyces marxianus*, con un porcentaje de identidad del 100% y *C. glabrata* con un porcentaje de identidad de 99%. Se identificaron además otras cepas de levaduras aisladas a partir de las tinajas con mostos para propagación del cultivo iniciador utilizado en la industria donde se realizó el estudio. Estas cepas fueron identificadas por medio de secuenciación de fragmentos de ADN y corresponden a *Issatchenkia orientalis* y *Zigosaccharomyces bailii* con un porcentaje de identificación del 99%.

Tabla 4. Identificación de levaduras por amplificación y secuenciación de nucleótidos.

| Cepa | Identificación | % de identidad | Valor E |
|-----------------------------------|--------------------------------|----------------|---------|
| Mosto sin fermentar | <i>S. cerevisiae</i> | 100 | 0 |
| Mosto en fermentación | <i>Candida glabrata</i> | 99 | 0 |
| Mosto al final de la fermentación | <i>Kluyveromyces marxianus</i> | 100 | 0 |

El método API puede servir como un complemento para conocer el perfil de utilización de

azúcares por parte de las levaduras (Nielsen et al. 2007). Este método no podría utilizarse como único para la identificación de microorganismos ya que, como se observa en las Tablas 3 y 4, para el caso de la levadura *C. glabrata* podría darse una identificación con mayor incertidumbre. Algunos autores mencionan que la identificación de microorganismos únicamente a partir de pruebas fisiológicas, morfológicas y/o bioquímicas de crecimiento puede resultar en una identificación equivocada debido a la difícil interpretación de dichos resultados por la similitud del metabolismo de algunos microorganismos (Lopandic et al. 2006; Hierro, et al. 2004; Egli et al. 1998).

7.2 DIVERSIDAD DE LEVADURAS EN MOSTOS FERMENTADOS

Con el fin de determinar la diversidad de levaduras en los mostos fermentados de agave, se usó el método PCR-DGGE. A continuación se describen los experimentos realizados para montar la técnica.

7.2.1 Amplificación de ADN de cepas puras de levaduras correspondiente al extremo 5' del gene 26S de ARNr.

Una vez que se tenía el ADN extraído de la colección de levaduras aisladas de los mostos de agave, se procedió a realizar la amplificación de ADN de 250 nucleótidos correspondientes a la región extremo 5' del gene 26S del ARNr por medio de la PCR, utilizando los cebadores descritos por Cocolin et al. (2002). Estos fragmentos de ADN amplificados contienen la grapa de GC requerida para los experimentos de electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE). Se realizó la extracción y amplificación de ADN de las cepas *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* y *Candida glabrata*, los resultados se muestran en la figura 7.

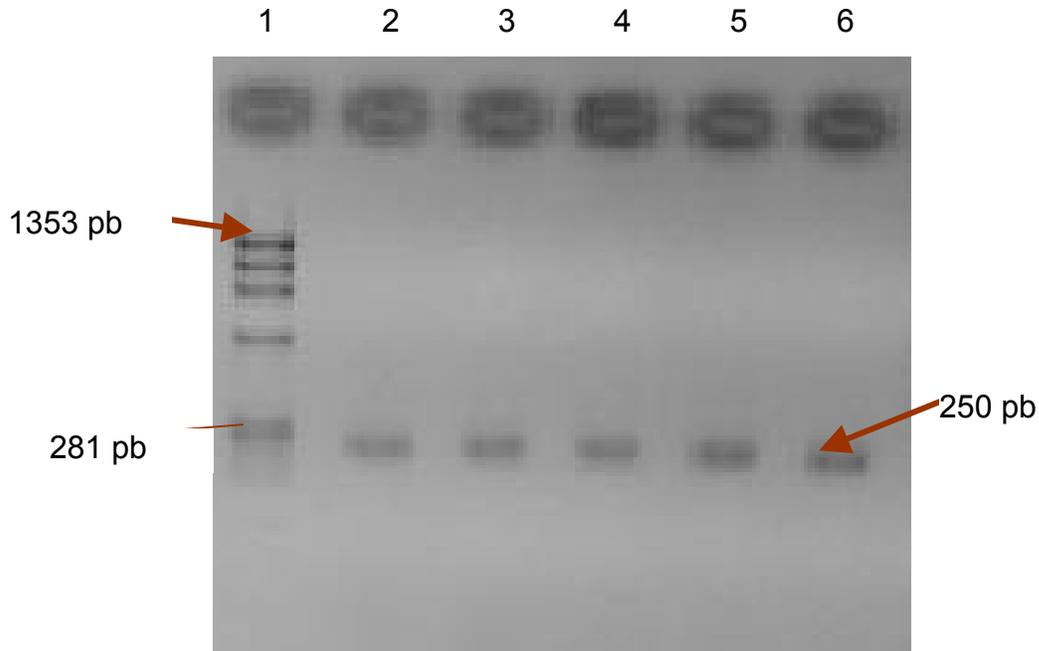


Fig. 7 PCR de cepas puras aisladas de mostos de agave. Carril 1, marcador de masa molecular (Φ X174); carril 2, *K. marxianus* ; carril 3, *C. glabrata*; carril 4, *C. glabrata*; carril 5, *S. cerevisiae*; carril 6, *S. cerevisiae*.

7.3 EXTRACCIÓN DE ADN DE LEVADURAS A PARTIR DE MOSTOS DE AGAVE FERMENTADOS

Ya que se obtuvo la amplificación del fragmento de ADN requerido para realizar el DGGE a partir de las cepas puras, se procedió a realizar fermentaciones mixtas controladas en mostos de agave, con las cepas *K. marxianus*, *C. glabrata* y *S. cerevisiae* para estandarizar la técnica de obtención de células y extracción de ADN de levaduras directamente de los mostos fermentados. Para la obtención del paquete celular a partir de los mostos se probaron dos experimentos, los cuales se describen en la metodología.

En la Figura 8, se muestra que el método 1 para obtención del paquete celular, el cual consistía en extraer el ADN de las levaduras a partir del sobrenadante final obtenido al centrifugar el mosto. Este no fue bueno, ya que no se recuperó ADN en los tiempos cero, 6 y 24 horas de la fermentación si no hasta las 48 horas que es donde se observa la banda en el gel de agarosa, correspondiente al ADN de levaduras extraído en ese tiempo de fermentación. Con el método 2 para obtención del paquete celular, el cual consistía en extraer el ADN del sedimento concentrado obtenido después de centrifugar varias veces el mosto, se recuperaron más células de levaduras, por lo tanto se logró extraer ADN desde el

tiempo de fermentación de 6 horas, 24 y 48 horas, aunque no se obtuvo ADN al inicio de la fermentación (tiempo cero). Con estos resultados se puede concluir que el método para la obtención de un paquete celular mayor con el cual podemos extraer una cantidad de ADN considerable para realizar la PCR, es aquel que se obtiene a partir del pellet concentrado después de centrifugar el mosto por 3 veces y coleccionar en cada etapa de centrifugación los sedimentos. Este método para concentración de células se utilizó en los experimentos posteriores.

La extracción de ADN utilizada en estos experimentos fue la misma que se utilizó para la extracción de ADN a partir de cepas puras.

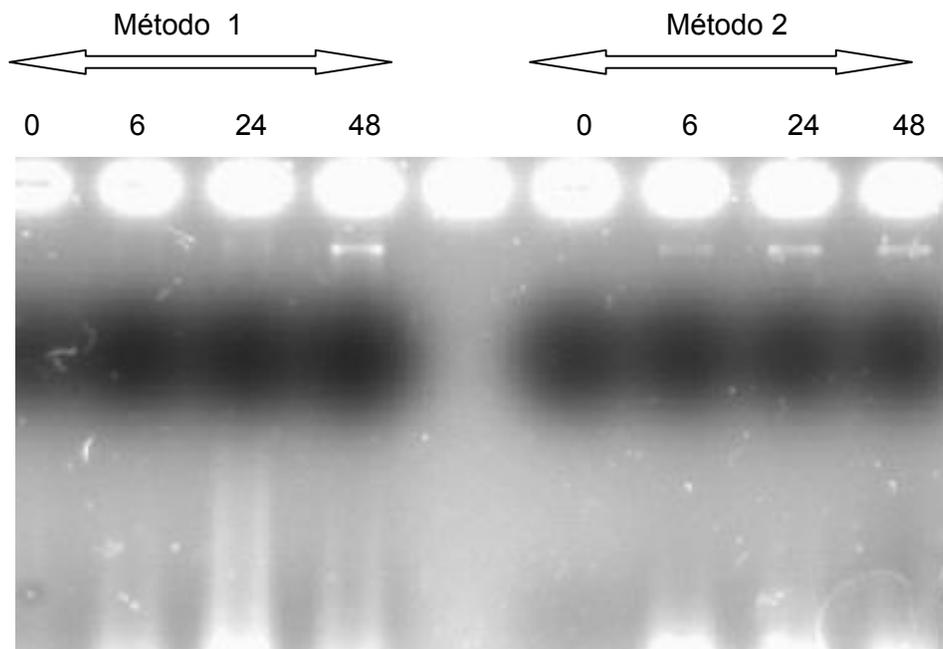


Fig. 8 DNA extraído a partir de fermentaciones mixtas controladas. El método 1 para obtención de células, se realizó a partir del pellet obtenido del sobrenadante resultante después de filtrar y centrifugar el mosto. El método 2 para obtención de células se realizó a partir del pellet obtenido después de concentrar las células recolectando los sedimentos de cada centrifugación. El número del carril corresponde al tiempo de fermentación.

7.4 AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN 26S DE ARNr A PARTIR DEL ADN EXTRAÍDO DIRECTAMENTE DE LOS MOSTOS FERMENTADOS

Se realizó la PCR con los cebadores NL1+grapa de G-C y LS2 según la metodología descrita en la sección correspondiente, utilizando el ADN extraído a partir del paquete celular obtenido por los métodos 1 y 2 antes descritos. No se obtuvieron los productos de

amplificación a partir del ADN extraído de los mostos. Una posibilidad de la no amplificación es la presencia de inhibidores de la reacción de PCR. Se han reportado diferentes factores de inhibición de la reacción de PCR, algunos de ellos pueden encontrarse en el propio sustrato de donde se extrajo el ADN, como algunos polisacáridos derivados de inulina (polímero de fructosa), compuestos fenólicos y ácidos orgánicos producidos durante la fermentación (ácidos octanóico y decanóico) y proteínas que podrían actuar como inhibidores de la reacción. Estos inhibidores pueden interferir en diferentes puntos, uno de ellos, es inhibir la actividad de la polimerasa para la amplificación de un fragmento de ADN (Wilson I, 1997).

Debido a que no se obtuvieron productos de la PCR con el ADN extraído en los pasos anteriores, se probó el método de extracción de ADN de levaduras con el Kit QIAGEN (catálogo no. 19090), que se basa en el aislamiento de ADN cromosomal utilizando buffers para llevar a cabo un lisis cuidadosa de las células y posteriormente la unión del ADN a una resina de intercambio aniónico (Genomic tips 20/G cat no. 10223) donde se eliminan las impurezas de proteínas, colorantes, etc., por lo que en esta limpieza se podrían eliminar algunos inhibidores. En la Figura 9 se presentan las bandas de ADN extraído de la fermentación mixta desde el tiempo cero (carril 1) y hasta el final de la fermentación (72 horas, carriles 4 y 5). El ADN de los carriles 7 y 8 es el que se limpió o purificó con las columnas del kit, lo cual muestra que este método de extracción es más eficiente para la obtención de ADN de levaduras partiendo de mostos de agave fermentados.

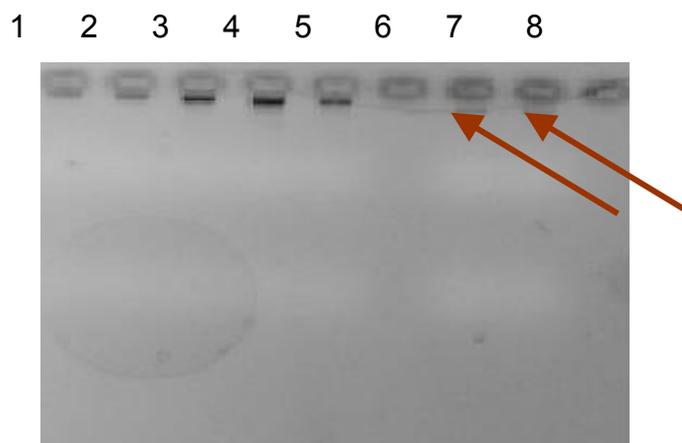


Fig. 9 Electroforesis en gel de agarosa del ADN extraído con el Kit QIAGEN. Carriles 1-4 muestras de DNA extraídos a partir de los tiempos de fermentación 0, 24 48 y 72 horas respectivamente. El carril 5 muestra el ADN extraído a las 72 horas de fermentación, carril 6 no tiene muestra, carriles 7 y 8 ADN extraído a las 72 horas de fermentación y purificado con las columnas QIAGEN.

Con el ADN extraído de los mostos fermentados y purificado con el kit se realizó la PCR según lo descrito en la sección correspondiente. En la Fig. 10, carriles 2 al 5 se observa que no se obtuvieron productos de amplificación a partir del ADN extraído de los tiempos de fermentación 0, 24, 48 y 72 horas los cuales, no fueron purificados con las columnas del kit Qiagen. En los carriles 6 y 7 sí hay productos de amplificación de ADN que además corresponden al tamaño del fragmento de 250 pb del gen de interés. El ADN que se utilizó para realizar el PCR en estos dos últimos casos se purificó con las columnas del kit. Este experimento confirma que al realizar la purificación del ADN extraído a partir de los mostos fermentados, se logra obtener la amplificación del fragmento deseado. El experimento en el que no se purificó el ADN (carriles 2 al 5 de la Figura 10) confirma la presencia de inhibidores en la reacción de PCR lo cual demuestra la no amplificación del fragmento deseado.

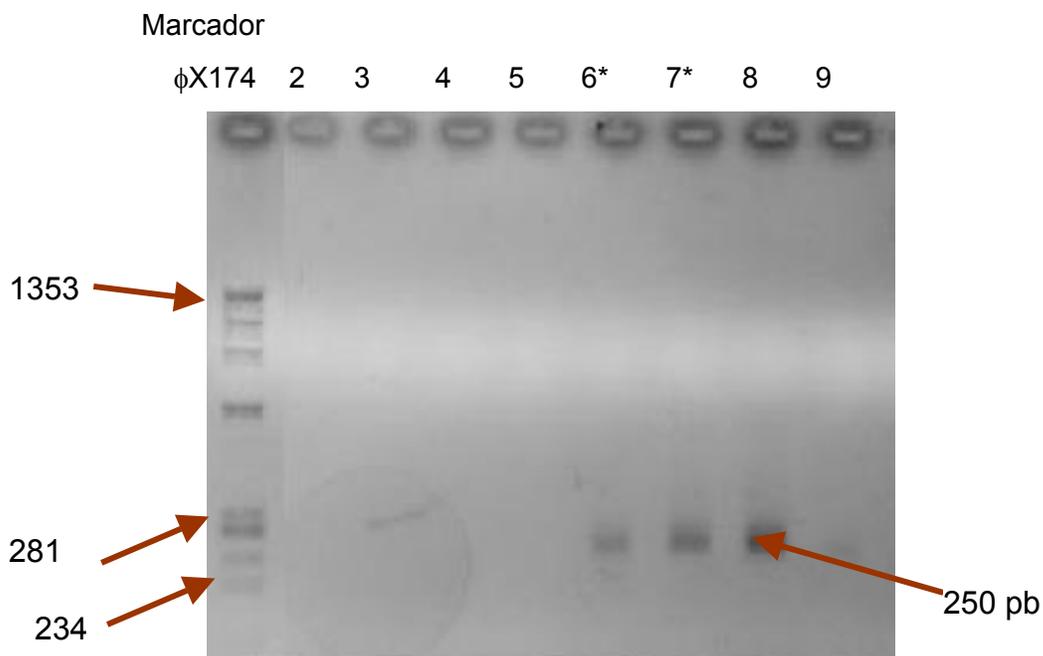


Fig. 10 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR. Carril 1 marcador de peso molecular ϕ X174, carriles 2-5 ADN extraído con kit QIAGEN sin purificar; carriles 6 y 7 ADN purificado con columnas del KIT QIAGEN; carril 8 control positivo (amplificación de ADN de cepa pura extraído por el método físico), carril 9 control negativo (amplificación de PCR utilizando agua en lugar de ADN).

Se ha reportado que la albúmina puede añadirse a la reacción de PCR como un facilitador de la misma (Wilson I, 1997) ya que en el medio de donde se extrae el ADN pueden existir

inhibidores que actúan de forma tanto física como química interfiriendo con la interacción entre el ADN y la enzima polimerasa. Con el fin de evitar el problema de la inhibición de la reacción de PCR, se realizaron experimentos en los que se utilizó ADN de levaduras extraído directamente de una fermentación de mosto y se le añadió dentro de la reacción de PCR albúmina bovina sérica en una concentración final de 4 mg/ml (Wilson I, 1997). En la Figura 11 se observa que se obtuvo una buena amplificación de los fragmentos de ADN en todos los tiempos de la fermentación (antes de inocular, tiempo cero, 4, 8, 20 y 24 horas) cuando se añadió albúmina en la reacción, por lo que en los posteriores experimentos de amplificación (PCR) se utilizó dicho reactivo para evitar la inhibición de la misma. Se ha reportado también que la albúmina puede restringir la inhibición por proteasas ya que provee un sustrato alternativo para la catálisis por estas enzimas (Wilson I, 1997).

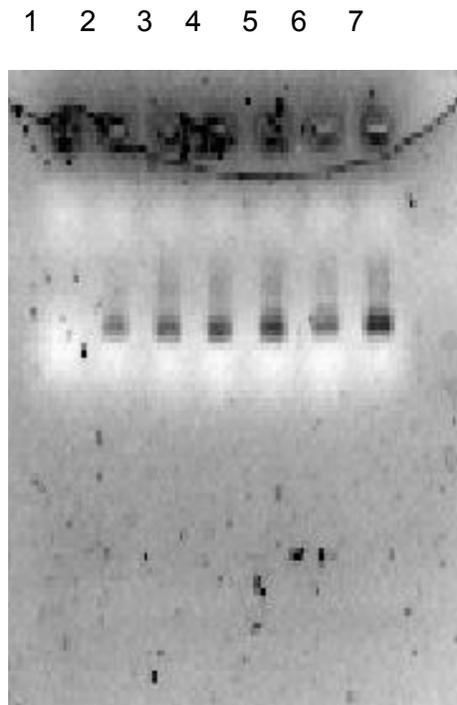


Fig. 11 Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR amplificados con albúmina bovina sérica a partir de ADN extraído de muestras de mostos fermentados. Carril 1 mosto antes de inocular, carril 2: Tiempo cero, carril 3: 4 horas, carril 4: 8 horas, carril 5: 20 horas, carril 6: 24 horas, carril 7: 32 horas.

7.5 FERMENTACIONES CONTROLADAS (NATURAL E INOCULADA) DE MOSTOS DE AGAVE PARA PRODUCCIÓN DE TEQUILA

7.5.1 Dinámica de levaduras durante la fermentación natural determinada por el método tradicional de cuenta en placa

Se realizaron fermentaciones por triplicado de mosto pasteurizado inoculado con *K. marxianus*, *C. glabrata*, *Z. bailii* y *S. cerevisiae* A simulando una fermentación natural industrial en la cual no se añade un cultivo iniciador si no que la fermentación se realiza con microorganismos presentes en el mosto.

La cuenta total de levaduras (sin distinguir entre las diferentes especies inoculadas) aumentó a lo largo de la fermentación, la cual inició con una cuenta de 10^6 UFC/ml, alcanzando una cuenta de 10^{10} UFC/ml al final de la misma (Fig. 12). Estas cuentas se determinaron a partir del agar WL y el agar YM, ya que en el agar Lisina no se obtuvo un crecimiento diferencial de las levaduras. El agar lisina se utiliza como medio de cultivo para el aislamiento diferencial entre cepas de *Saccharomyces* y no *Saccharomyces*, ya que permite el desarrollo de las levaduras no *Saccharomyces* e inhibe el crecimiento de las levaduras *Saccharomyces* (Manzano M, *et al.* 2005). Sin embargo en este experimento no fue posible diferenciar entre unas levaduras y otras ya que los dos tipos crecieron en el medio formando colonias pequeñas puntiformes. En el agar nutritivo WL las características macroscópicas de las colonias de las diferentes levaduras (tamaño y color) son variables gracias a esto fue posible diferenciarlas.

En la fermentación natural se inocularon 4 cepas diferentes de levaduras, éstas se diferenciaron por las características de las colonias en el agar WL. Durante las primeras 8 horas de la fermentación, se detectaron las 4 cepas inoculadas, sin embargo, a partir de las 20 horas de fermentación ya no se detectó *Z. bailii*. En cambio *K. marxianus* y *C. glabrata* (levaduras no *Saccharomyces*) estuvieron presentes durante todo el tiempo de la fermentación. En las diluciones más altas que se realizaron para la cuenta en placa a partir de las 20 horas de la fermentación (10^5 - 10^6) no fue posible aislar algunas levaduras, como fue caso de *Z. bailii*, ya que posiblemente estas levaduras se encontraban en concentraciones bajas en la fermentación. La levadura *S. cerevisiae*, se detectó durante toda la fermentación.

Se determinaron también los parámetros de la fermentación (azúcares y etanol) con el fin de

relacionar el consumo y producción de éstos, con la dinámica de la población de levaduras. La producción de etanol se detectó en la fermentación hasta después de 8 horas de transcurrida. A las 20 horas la concentración de etanol era de 3.28 % y continuó aumentando hasta las 32 horas, tiempo en el cual se decidió darla por terminada. Se encontró una producción de etanol de 6.64% al final de la fermentación. Ésta producción de etanol se encuentra dentro del promedio reportado para fermentaciones industriales que puede variar entre el 4 y 9% dependiendo de la concentración de azúcares inicial (M. Cedeño, Arrizón J. 2002).

Al inicio de la fermentación la concentración de azúcares era de 14% (reportado como azúcares reductores). No se observó un consumo total de los azúcares presentes en el mosto (fructosa glucosa y sacarosa) quedando un remanente a las 32 horas de fermentación de 2.94% (Fig. 12).

Los medios de cultivo utilizados permitieron realizar el conteo total de levaduras. Sin embargo, para poder concluir acerca de la presencia o ausencia de las diferentes levaduras inoculadas durante todo el proceso, se tiene que hacer un estudio más minucioso como el empleo de herramientas moleculares.

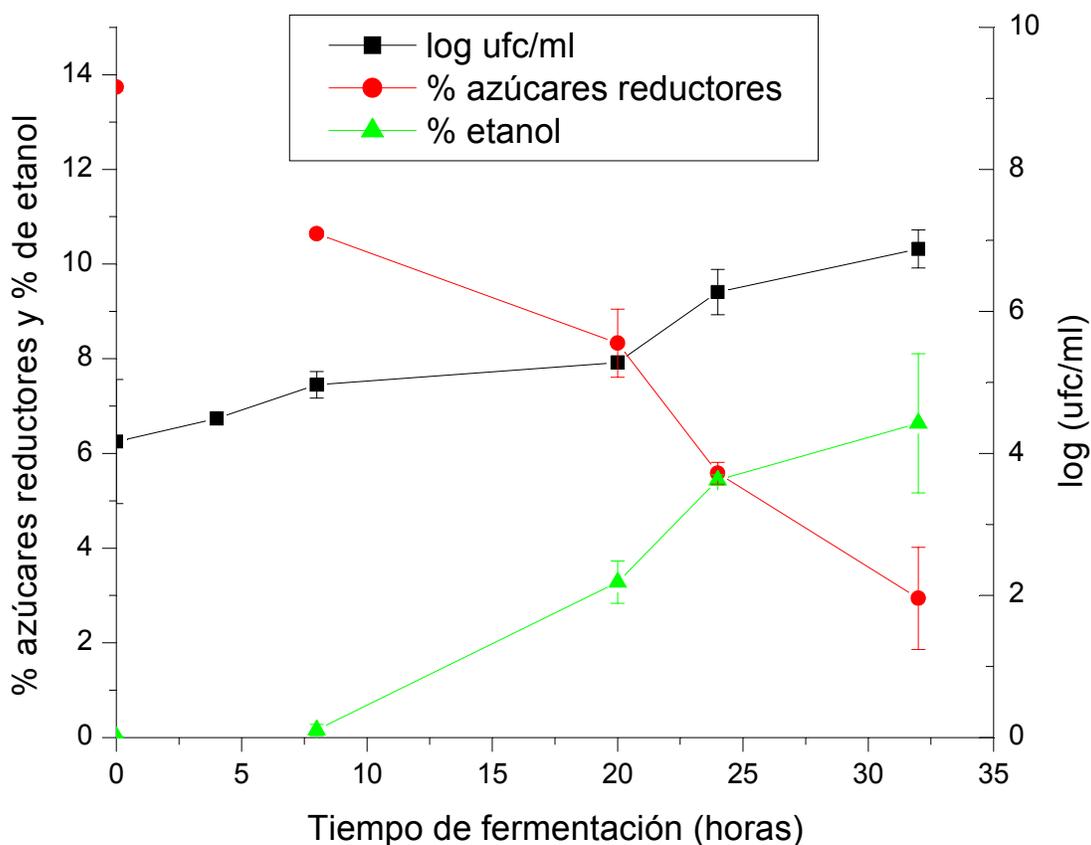


Figura 12. Dinámica de la fermentación natural determinada por métodos dependientes de cultivo. ●, % de azúcares reductores consumidos; ▲, % de etanol producido durante la fermentación; ■, crecimiento de levaduras (UFC/ml).

7.5.2 Dinámica de levaduras durante la fermentación inoculada determinada por el método tradicional de cuenta en placa.

En la fermentación inoculada con el cultivo iniciador se observó también un incremento de la cuenta total de levaduras de 10^6 UFC/ml que se tenía al inicio, se alcanzó a las 20 horas una cantidad de colonias viables de 10^{11} (Fig. 13). Esta concentración de microorganismos se mantuvo durante toda la fermentación.

En esta fermentación fue posible distinguir las diferentes cepas por las características de las colonias en el agar WL. En el tiempo cero se detectaron las 4 levaduras inoculadas, conforme transcurría el tiempo de la fermentación no se observó el crecimiento de algunas sobre las cajas de agar después de haber realizado el plaqueo, como fue el caso de *Z. bailii*,

por lo que no fue posible identificarlas a todas macroscópicamente. Esto se pudo deber a que las cuentas de estas estaban disminuyendo con respecto a otras que se encontraban en mayor concentración como fue el caso de *S. cerevisiae* y *K. marxianus*, es decir, las cuentas de *K. marxianus* y *S. cerevisiae* eran mayores en la fermentación, de tal forma que se tuvieron que realizar mayor número de diluciones para poderlas cuantificar por tanto las que se encontraban en menor concentración en el mosto fermentado como pudo ser el caso de *Z. bailii*, no se pudieron cuantificar debido a que solo se plaquero los tubos de mayor dilución.

Por medio de técnicas tradicionales de aislamiento de microorganismos como lo es el recuento en placa, es difícil distinguir entre las diferentes cepas. Para hacerlo sería necesario identificarlos aislándolos en medios de cultivo adecuados y realizando pruebas bioquímicas para sustratos específicos. Es preciso entonces buscar otros métodos que permitan distinguir entre las diferentes levaduras halladas a lo largo de la fermentación para conocer la diversidad de las mismas en este medio, sin tener la necesidad de aislarlas una por una e identificarlas posteriormente.

En cuanto a la producción de etanol durante la fermentación inoculada con el cultivo iniciador de *S. cerevisiae*, se detectó una concentración de 6.81%. Este resultado de etanol no es diferente a lo obtenido en la fermentación natural, por lo que asociando la persistencia de las levaduras no *Saccharomyces* en la fermentación con la producción de etanol, se puede concluir que en estas fermentaciones la persistencia de levaduras no *Saccharomyces* no depende de la concentración de etanol en el mosto fermentado, sino a la dinámica de crecimiento propia de las levaduras o a la adaptación de las mismas a este medio.

Se observó prácticamente el consumo total de los azúcares presentes en el mosto, ya que inicialmente se tenía 18% y terminó en una concentración 0.87% de azúcares reductores. Comparado el consumo de azúcares en la fermentación inoculada con la fermentación natural, se observa que en la primera fue mayor, esto debido probablemente a que había una mayor concentración de levaduras por tanto hubo un mayor consumo de azúcares, quedando un remanente menor que en la fermentación natural.

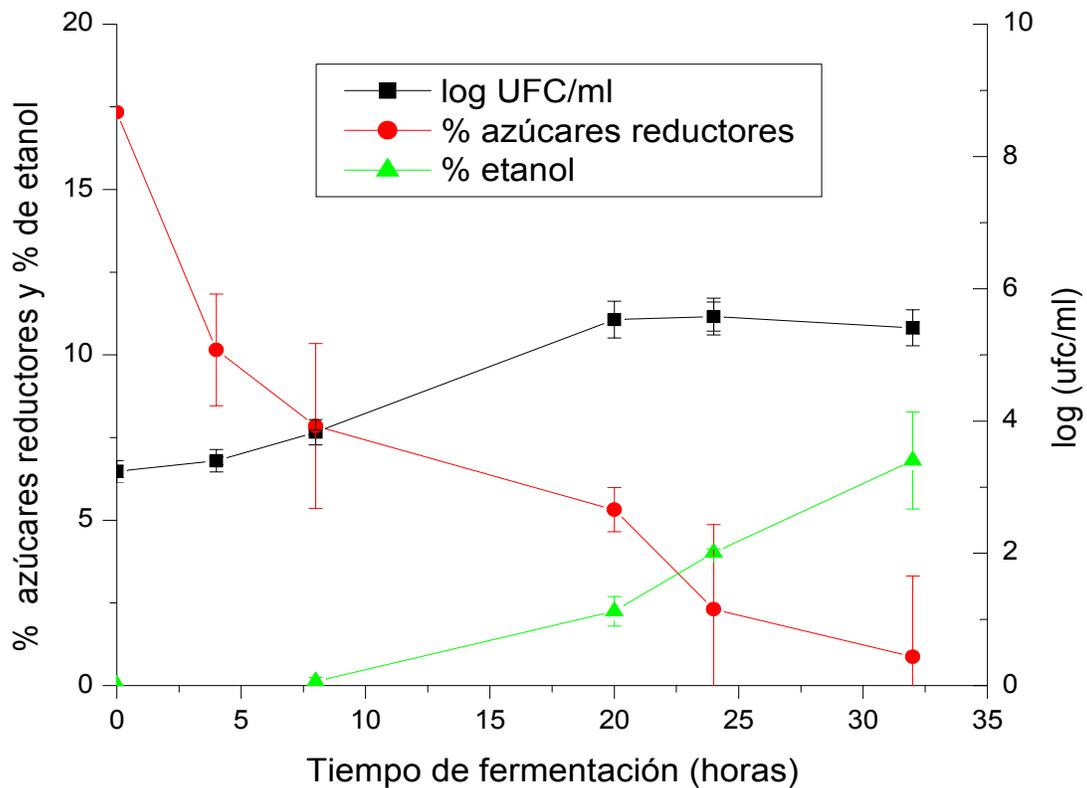


Figura 13. Dinámica de la fermentación inoculada determinada por métodos dependientes de cultivo. ●, % de azúcares reductores consumidos; ▲, % de etanol producido durante la fermentación; ■, crecimiento de levaduras (UFC/ml).

La tabla 5 muestra los parámetros de rendimiento y productividad de las dos fermentaciones llevadas a cabo. Se observó una mayor cantidad de células con respecto al sustrato en la fermentación inoculada que en la fermentación natural, es decir, en la fermentación natural se produjo más biomasa que etanol. El mayor rendimiento de etanol con respecto al sustrato se obtuvo en la fermentación natural, lo que significa que se produjo más producto que biomasa, esto se confirma en el cálculo de producto sobre biomasa, en el que se observó mayor producción de etanol a partir de la biomasa presente en la fermentación natural. La fermentación natural fue más productiva debido a que se obtuvo más etanol que biomasa, en cambio en la fermentación inoculada se produjo más biomasa que etanol a pesar de que al final de las dos fermentaciones la concentración de etanol no fue significativamente diferente entre ambas (6.84% inoculada y 6.64% en la natural)

Tabla 5 Comparación de los parámetros de rendimiento y productividad de las fermentaciones natural e inoculada

| Parámetro | Fermentación natural | Fermentación inoculada |
|-----------|----------------------|------------------------|
| $Y_{X/S}$ | 0.022 | 0.040 |
| $Y_{P/S}$ | 50.32 | 32.57 |
| $Y_{P/X}$ | 14.63 | 12.30 |

7.6 DIVERSIDAD DE LEVADURAS EN FERMENTACIONES CONTROLADAS DE MOSTOS DE AGAVE DETERMINADA POR EL MÉTODO INDEPENDIENTE DE CULTIVO DGGE

Se realizaron los siguientes experimentos para montar la técnica:

7.6.1 Gel perpendicular de DGGE

Se realizó un gel perpendicular de DGGE con la finalidad de obtener las mejores concentraciones (máxima y mínima) del gradiente desnaturizante de urea/formamida, para la separación óptima de los fragmentos de ADN de las cepas puras de levaduras. Se probaron gradientes de 40-80, 20- 60% (resultados no mostrados) y 30-60 % (Fig. 14) según lo reportado por Cocolin *et. al* 2004. Se seleccionaron las condiciones con las cuales se obtuvo la mejor separación para realzar geles paralelos de DGGE. Esta concentración desnaturizante fue la de 30-60% de urea/ formamida.

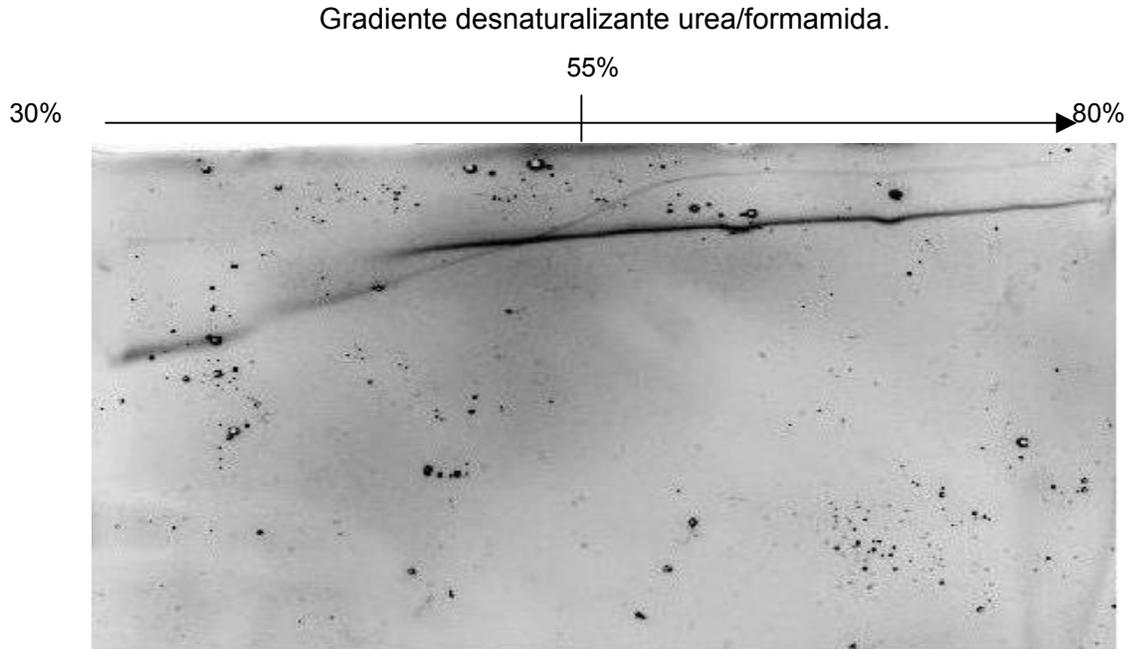


Fig. 14. Gel perpendicular de DGGE de la mezcla de productos de PCR de las cepas puras aisladas de los mostos (condiciones desnaturalizantes 30%-80% de urea/formamida, electroforesis: 2 horas, 120 Volts y 60° C de temperatura).

7.6.2 Gel paralelo de DGGE con ADN de cepas puras de levaduras

Una vez seleccionadas las concentraciones del gradiente de urea/formamida, se realizó un gel paralelo de DGGE (Fig. 15), con un gradiente desnaturalizante 30-60%, con los productos de PCR obtenidos a partir del ADN extraído de las cepas puras aisladas de las fermentaciones de agave. Esto con la finalidad de comprobar si éste gradiente permitía la separación adecuada de las bandas de ADN y distinguir por la migración en el gel a cada una de ellas.

Se obtuvo una buena separación del ADN de las cepas puras con el gradiente desnaturalizante de 30-60%, por lo que se empleó éste para el análisis de las fermentaciones de mostos de agave. Se observó también una sola banda correspondiente a la migración de los productos de PCR de cada una de las cepas puras en los geles de DGGE (Fig. 15).

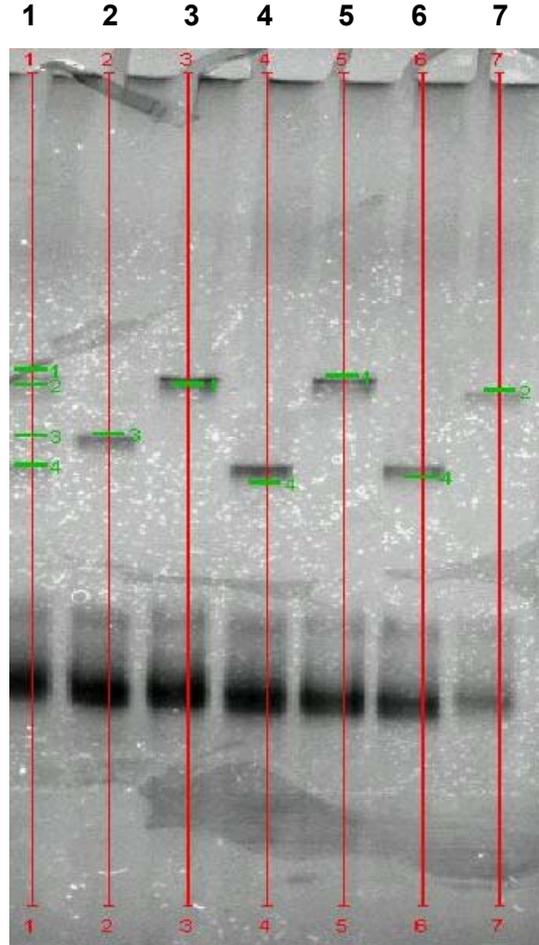


Fig. 15 Gel de DGGE paralelo con cepas puras aisladas de mostos fermentados: condiciones de electroforesis, 70 volts, 60° C durante 16 horas. Carril 1: Mezcla de productos de PCR de las cepas puras, carril 2 (banda 3): *Z. baillii*, carril 3 (banda 1): *K. marxianus*, carril 4 (banda 4): *S. cerevisiae A*, carril 5 (banda 1): *K. marxianus*, carril 6 (banda 4): *S. cerevisiae B*, carril 7 (banda 2): *C. glabrata*.

7.6.3 Gel paralelo de DGGE con ADN de levaduras extraído directamente de los mostos de agave

Se llevó a cabo la extracción de ADN de levaduras directamente de los mostos fermentados, para realizar el análisis de la diversidad de las mismas en la fermentación. Con los productos de PCR obtenidos después de la amplificación del ADN de levaduras extraído de los mostos fermentados se realizó un gel paralelo con el gradiente desnaturizante reportado previamente. En el carril 1 de este gel (Fig. 16) se observó que antes de inocular el mosto con las levaduras no se detectó ninguna banda lo cual muestra que no había una población considerable de levaduras antes de la inoculación. En el tiempo cero de la fermentación no

fue posible detectar alguna banda probablemente debido a la baja concentración de levaduras y / o a la presencia de inhibidores de la reacción de PCR en el mosto.

Transcurridas ocho horas de la fermentación natural (Fig. 16 carriles 2 al 6) se detectaron 3 bandas correspondientes a *K. marxianus* (banda 1), *C. glabrata* (banda 2) y *S. cerevisiae* A (banda 4). Estas cepas se detectaron a partir de las 8 horas y hasta el final de la fermentación natural. Cabe destacar que las levaduras *K. marxianus* y *C. glabrata* (ambas no *Saccharomyces*) se encontraron durante toda la fermentación lo cual coincide con los resultados obtenidos en la determinación de éstas por medio de conteo en placa. La levadura *Z. bailii* no fue detectada por este método, quizá por la concentración en la que se encontraban en el medio (10^4), ya que el límite de detección de concentración de células por el método de DGGE es 10^4 (Cocolin *et al.* 2000, Cocolin *et al.* 2004). La levadura *S. cerevisiae* A, también se encontró durante toda la fermentación lo cual puede hablar de la adaptación de ésta en los mostos.

Lachance (1995) realizó un estudio para determinar las comunidades de levaduras que se encontraban durante la fermentación natural de tequila y encontró en las etapas tempranas especies de *Candida*, *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulaspora*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*. Conforme la fermentación progresaba la diversidad de especies se fue reduciendo considerablemente, hasta el punto en el que las levaduras *S. cerevisiae* fueron dominantes. En nuestro estudio observamos que tanto las cepas *Saccharomyces* como las no *Saccharomyces* persisten durante toda la fermentación.

Otros estudios de diversidad de levaduras realizados en vino indican la ausencia de la levadura *S. cerevisiae* en las etapas tempranas de la fermentación y que conforme ésta progresa y la concentración de etanol incrementa las especies de *Saccharomyces* completan la fermentación (Fleet and Heard 1993).

Gutierrez *et al.* (1999) realizaron un estudio durante 5 años consecutivos en una planta productora de vino para analizar la diversidad de las levaduras en diferentes tiempos. Estos autores encontraron que la frecuencia de las levaduras varía de un año a otro. Sólo las levaduras *Saccharomyces* de diferentes biotipos estuvieron presentes durante los 5 años del estudio. Las levaduras *Saccharomyces* se encontraron durante la fermentación vigorosa del vino, lo cual demuestra una rápida adaptación y dominación en el medio fermentativo por parte de estas levaduras (Gutierrez *et al.* 1999). Estos autores reportaron también una

predominancia inusual en el año 1997, ya que en las muestras estudiadas las levaduras predominantes fueron no *Saccharomyces*.

En la fermentación inoculada (figura 16 carriles 8 al 12) sólo se aprecian las bandas correspondientes a *K. marxianus* (banda 1) y *S. cerevisiae* (banda 4), la banda correspondiente a *Z. bailii* (banda 3 en el patrón de referencia, carril 7) no se aprecia en ninguna de las dos fermentaciones, lo cual coincide con los resultados obtenidos en la cuenta en placa. Esta cepa que se caracteriza por presentar colonias muy pequeñas en el medio YM y WL y no aparece en las placas realizadas para la cuantificación de levaduras a partir de las 8 horas de la fermentación. *C. glabrata* (banda 2 del patrón de referencia) no se distingue en la fermentación inoculada pero en la fermentación natural sí aparece la banda 2 correspondiente a esta levadura (tiempos 8, 20, 24 y 32 horas). Este fenómeno puede deberse a la competencia por los azúcares que se establece entre las levaduras para mantenerse en la fermentación. La levadura *C. glabrata* en la fermentación inoculada está compitiendo con dos cepas de *Saccharomyces* que son dominantes en fermentaciones alcohólicas, por lo tanto se puede ver disminuido el crecimiento de *Candida* hasta una concentración tal que no puede ser detectada por la técnica de DGGE.

Este fenómeno parece no estar relacionado con la tolerancia de *C. glabrata* al etanol ya que Lachance (1995), reportó una tolerancia de etanol para *Saccharomyces* de 10 hasta 12%, para *K. marxianus* 7% y *Candida* spp 11%. Por tanto el que en las fermentaciones natural e inoculada se haya encontrado a las levaduras *K. marxianus* y *S. cerevisiae* es normal, sin embargo, a pesar de que *C. glabrata* también presenta una tolerancia alta al etanol, ésta no pudo encontrarse en la fermentación inoculada por la competencia con las otras levaduras presentes en los mostos.

Tiempo fermentación

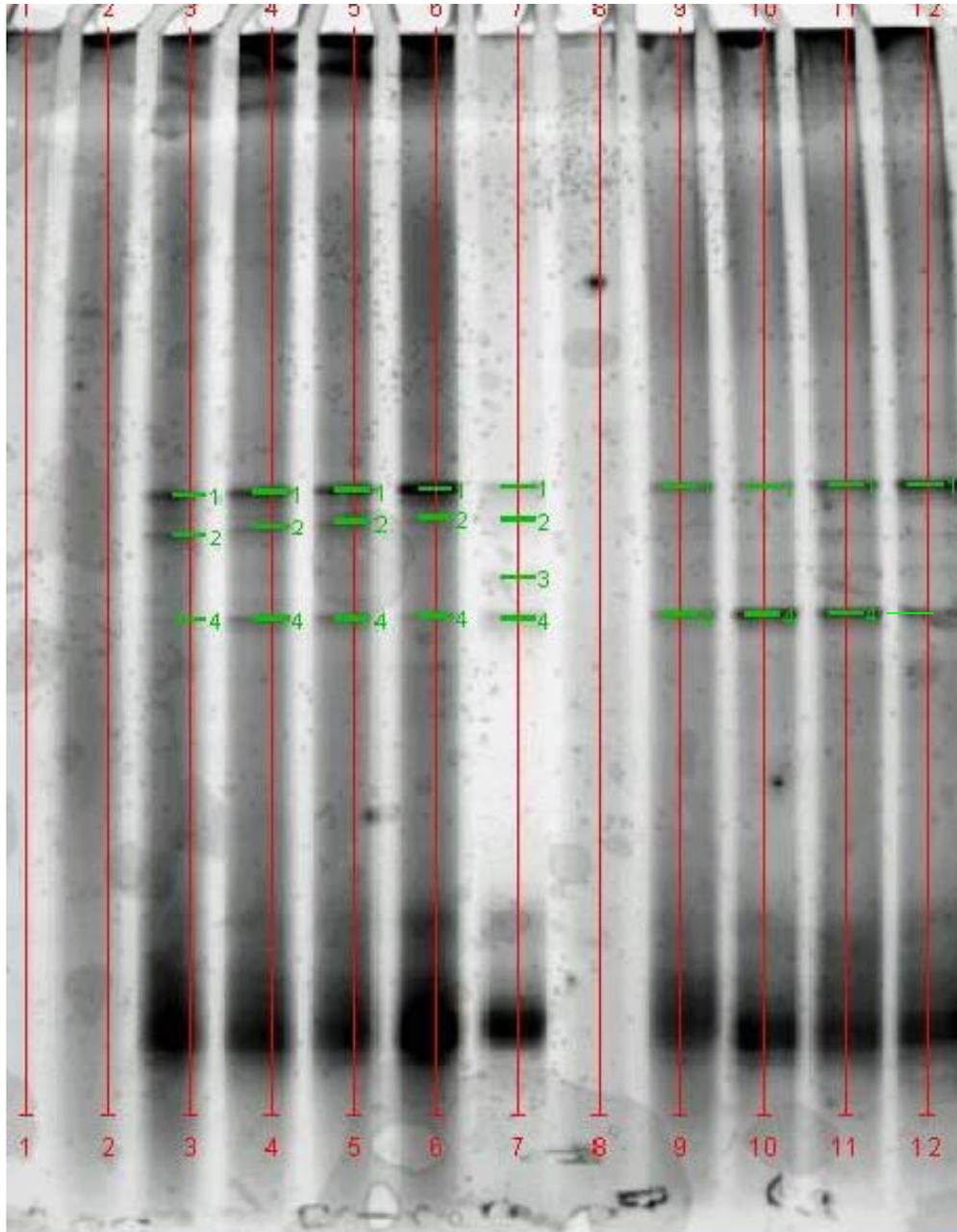
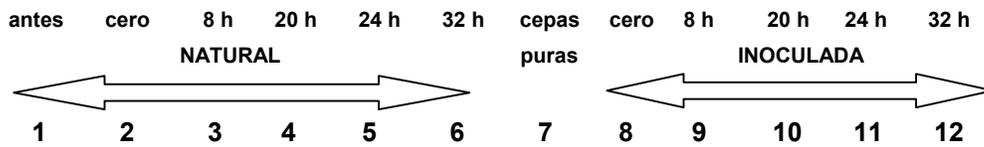


Fig. 16 Gel de DGGE paralelo con productos de PCR obtenidos a partir del ADN extraído de los mostos fermentados (condiciones de electroforesis, 70 volts, 60° C durante 16 horas, gradiente desnaturante 30-60%). Carriles 1-6: Tiempos durante la fermentación natural. Carril 1: Muestra antes de inocular el mosto, carril 2: tiempo cero, carril 3: 8 horas, carril 4: 20 horas, carril 5: 24 horas, carril 6: 32 horas. Carril 7: Mezcla de productos de PCR de las cepas puras, carriles 8-12: Tiempos durante la fermentación inoculada, carril 8: tiempo cero, carril 9: 8 horas, carril 10: 20 horas, carril 11: 24 horas, carril 12: 32 horas.

En la Figura 16 se puede observar también que antes de inocular el mosto y en el tiempo cero de la fermentación no se observa ninguna banda correspondiente a algún microorganismo, esto puede deberse a que la concentración de microorganismos no es la suficiente para realizar la extracción de ADN y además a la presencia de inhibidores, estos dos factores pueden conjuntarse y dificultar la amplificación de ADN por la enzima ADN polimerasa, fenómeno que disminuye o desaparece cuando la concentración de microorganismos se ve aumentada por el avance de la fermentación. Puede ser que cuando se inocularon concentraciones iguales de células de levaduras en el mosto, unas crezcan y otras no, por lo que en cuanto a crecimiento, algunas cepas tengan mayor ventaja que otras en las condiciones de la fermentación, la aparición de las bandas en el DGGE podría dificultarse por la fisiología de crecimiento propia de cada microorganismo o por la competencia por sustrato establecida en las condiciones de fermentación

La técnica de DGGE se considera semicuantitativa, es decir, la intensidad de cada banda es proporcional a la concentración de ese microorganismo (Pintado *et al.* 2003), sin embargo, algunas cepas presentan bandas más intensas que otras, esto puede deberse a una amplificación preferencial de las mismas durante la reacción de PCR (Reisenbah, 1992). La amplificación preferencial puede deberse a varios factores como la longitud del fragmento a amplificar o bien al uso de cebadores degenerados (Farely 1995). También se ha reportado que el plegamiento del templado así como la composición de guanina-citosina y las estructuras secundarias del ADN pueden ocasionar amplificación preferencial (Suzuki, 1996). Entre menor número de guaninas y citosinas exista, las secuencias pueden amplificarse preferencialmente.

Con el fin de descartar la presencia de este fenómeno se investigó la posibilidad de que se estuviera presentando una amplificación preferencial entre cepas.

7.6.4 Verificación de la presencia de amplificación preferencial en la reacción de PCR de cepas puras de levaduras

El ensayo consistió en la amplificación de concentraciones idénticas de templado de ADN de tres cepas puras las cuales fueron, *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *C. glabrata*, primero cada una por separado y después combinaciones entre ellas.

La Fig. 17 muestra el gel de DGGE obtenido con las diferentes combinaciones de ADN de los

tres diferentes microorganismos. La intensidad de las bandas del gel de DGGE, medida como la altura del pico de cada una de ellas, se obtuvo digitalizando los geles con el Software Quantity One versión 4.0 para Windows de Biorad.

Se realizó un análisis de varianza de los datos obtenidos digitalizando los geles con el Software Quantity One versión 4.0, para determinar si había diferencia significativa entre la intensidad de las bandas en el gel de DGGE, lo cual nos revelaría la existencia de amplificación preferencial entre cepas. El experimento se realizó por triplicado y se muestra en la Fig. 17 solo uno de los geles realizados.



Fig. 17 Gel DGGE. Amplificación preferencial entre cepas de levaduras. Carril 1, *S. cerevisiae*; carril 2, *K. marxianus*; carril 3, *C. glabrata*; carril 4, *S. cerevisiae*-*K. marxianus*; carril 5, *S. cerevisiae*-*C. glabrata*; carril 6, *K. marxianus*, *C. glabrata*; carril 7, *S. cerevisiae*-*K. marxianus*- *C. glabrata*.

Los resultados del análisis de varianza (Anexo 4) aplicado a la intensidad de las bandas, planteando como hipótesis nula la presencia de amplificación preferencial entre cepas

durante la reacción de PCR, con un nivel de significancia del 95%, indican que dicha hipótesis es rechazada, es decir, no hay amplificación preferencial cuando la misma concentración de ADN de las cepas se amplifica por separado (carriles 1, 2, y 3 de la Fig. 17). En el caso en el que se realizó la amplificación con la mezcla de concentraciones iguales de ADN de las 3 cepas de levaduras (carril 7, Fig.17), el análisis de varianza, con un nivel de significancia del 95%, demostró que no hay diferencia significativa en la intensidad de las bandas, es decir, no hay amplificación preferencial cuando una mezcla de concentraciones de ADN iguales de las levaduras se amplificaron.

Se realizó una prueba de t de student (Anexo 2) para comparar la amplificación en el caso de tener mezcla de concentraciones iguales de ADN de dos cepas (carriles 4, 5 y 6 de la Fig. 17). Los resultados arrojados por la prueba t de student, con un nivel de significancia del 95%, demostraron que para ninguna de las combinaciones cuando se mezcló el ADN de levaduras a la misma concentración, hubo diferencia significativa en la amplificación, es decir no hay amplificación preferencial en las combinaciones de *S. cerevisiae*-*K.marxianus*, *S. cerevisiae*-*C. glabrata*, y *K. marxianus*- *C. glabrata* (carriles 4, 5 y 6 de la Fig. 17).

Se determinó la proporción de g-c a partir de la secuencia del fragmento de ADN amplificado para realizar la identificación de las cepas utilizadas en el experimento. Esta proporción resultó para *S. cerevisiae* de 47.54%, 46% para *K. marxianus* y 47.26% para *C. glabrata*. Se observó que la proporción de g-c es muy similar para las tres cepas por lo cual el fragmento de ADN no se amplificaría preferencialmente.

Los datos del análisis estadístico realizado a los geles de DGGE para probar la existencia de amplificación preferencial entre cepas y la determinación de la proporción de g-c en la secuencia amplificada nos hacen descartar la presencia de dicho fenómeno, por tanto concluimos la ausencia de amplificación preferencial entre las cepas *S. cerevisiae*- *C. glabrata* y *K marxianus*-*C. glabrata*, las cuales parecían presentarla por la diferencia en la intensidad de las bandas observada a simple vista. La ausencia de bandas en los geles de DGGE se debe entonces a que la concentración de ADN extraída de los mostos no fue suficiente para que se llevara a cabo la amplificación. Esto debido a que la concentración de microorganismos en la fermentación fue menor a 10^4 ufc/mL, definido como la sensibilidad para el protocolo de PCR-DGGE utilizado (Cocolin *et al.* 2000) y por tanto no se detecta la banda en el gel.

En los resultados obtenidos en las fermentaciones natural e inoculada de mostos de agave, se observó que las levaduras no *Saccharomyces* permanecen durante toda la fermentación. En el caso de *K. marxianus*, se encontró que persiste tanto en la fermentación natural como en la inoculada. *C. glabrata* sólo se encontró en la fermentación natural. La persistencia de estas levaduras puede deberse a que son tolerantes a altas concentraciones de etanol (Lachance 1995). Estas levaduras podrían tener un papel importante en la fermentación del mosto ya que la presencia de levaduras no *Saccharomyces* como *K. marxianus* están correlacionadas con atributos de sabor tanto positivos como negativos, dependiendo del tipo y concentración de metabolitos que produzcan durante la fermentación (Egli, 1998). Manzano *et al.* (2006) menciona que la contaminación de una cepa iniciadora con levaduras no *Saccharomyces* como especies de *Candida*, *Hansenula*, etc. en las etapas tempranas de la fermentación, así como de bacterias, puede contribuir positiva o negativamente a las propiedades y características del vino. Algunos autores mencionan que la contaminación bacteriana produce una reducción en el rendimiento de etanol y la inhibición del crecimiento de levaduras. Las principales bacterias que contaminan las fermentaciones alcohólicas son bacterias lácticas quienes fermentan los carbohidratos a ácido láctico, reduciendo el rendimiento de etanol y causando inhibición de las levaduras (Narendranath et al., 1997). Lachance (1995) encontró en los mostos fermentados un gran número de bacterias productoras de ácidos. En la etapa temprana de la fermentación encontró que fueron dominantes las bacterias ácido lácticas *Leuconostoc* spp y *Lactobacillus* spp. En la etapa tardía de la fermentación encontró que se había formado una capa que contenía numeros significativos de *Acetobacter aceti*.

En el presente estudio con fermentaciones controladas, no se realizó análisis alguno acerca de bacterias presentes, sin embargo no se descarta su presencia en una fermentación natural industrial, lo cual podría cambiar la dinámica poblacional de levaduras.

8. CONCLUSIONES

Se llevó a cabo la identificación (en un porcentaje aceptable: más del 90%) de dos de las levaduras encontradas durante la fermentación industrial de mostos de agave, mediante el sistema API 20C AUX (bioMérieux).

Se identificaron las levaduras *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *C. glabrata*, *I. orientalis* y *Z. bailii* aisladas de mostos fermentados, a partir de la secuenciación del dominio D1-D2 de la subunidad mayor del gene 26S del ARNr.

Se presentaron dificultades para distinguir el crecimiento de cada cepa mediante sus características coloniales, usando la técnica tradicional de conteo en placa.

Fue posible describir la dinámica del crecimiento de cada una de las cepas de levaduras durante las fermentaciones mediante la técnica de DGGE.

Se determinó que las levaduras no *Sacharomyces* persisten durante todo el tiempo de las fermentaciones. *K. marxianus* esta presente en la fermentación natural y en la inoculada y *C. glabrata* solo en la fermentación natural. Este fenómeno muestra su adaptación al medio y sugiere que pueden ser de importancia durante la fermentación para el desarrollo de características organolépticas.

No se detecta microheterogenidad (aparición de más de una banda correspondiente al dominio D1-D2 del gen 26S de ARNr) en las levaduras aisladas de los mostos de agave: *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *C. glabrata* y *Z. bailii*

No se observó amplificación preferencial de las cepas de *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *C. glabrata* en la reacción de PCR, por lo que la intensidad de las bandas en los geles de DGGE sí podría indicar la proporción relativa de cada cepa presente en la fermentación.

9. PERSPECTIVAS

Entre las perspectivas para obtener un estudio más completo de la diversidad de microorganismos en los mostos de agave se encuentran:

Realizar un estudio de la diversidad de microorganismos (bacterias y levaduras) por medio de DGGE, presentes en la fermentación de los mostos de agave, partiendo de una fermentación natural e inoculada de una planta productora de tequila.

Realizar el estudio de diversidad de bacterias y levaduras por medio de DGGE en las fermentaciones de los mostos en distintas épocas del año y en diferentes plantas productoras de tequila.

Cuantificar en todas las fermentaciones la producción de etanol y comparar el crecimiento de levaduras *Saccharomyces* y no *Saccharomyces* en diferentes tiempos durante las fermentaciones en las plantas productoras de tequila.

Identificar y cuantificar los productos congénicos obtenidos durante las fermentaciones y relacionarlos con la presencia de los diferentes microorganismos con el fin de elucidar su función.

10. BILIOGRAFÍA

- Arrizon J. y Gschaedler A.** 2002. Increasing fermentation efficiency at high sugar concentrations by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of the tequila fermentation process. *Can. J. Microbiology*. **48**: 965-970
- Bafnacová, P., Smogrovicova, D., Slavikova, I.** 1999. Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *S. cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **21**: 337-341
- Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D.,** Yeast characteristics and identification. Third edition. U.K. 2000. Cambridge Editorial.
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E.,** 1995. Yeast and biochemistry of ethanol fermentation. In: Chapman & Hall (Ed.), Principles and Practices of Winemaking. The Chapman & Hall enology. Library, New York, pp. 102-181.
- Cedeño Cruz M. y Álvarez Jacob J.** Production of tequila from agave. Tequila Herradura, México. 1995. <http://www.scocia.com/newsite/Tequila.pdf>.
- Cocolin, L., Aggio, D., Manzano, M., Cantón, C., Comi, G.,** 2002. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *International Dairy Journal*. **12**: 407-411.
- Cocolin L., Bisson L.F., Mills D.A.** 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol Letters*. **189**: 81-87
- Coppola S., Blaiotta G., Ercolini D. y Moschetti G.** 2001. Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *J. Appl. Microbiol.* **90**: 414-420
- De Barros L.M, Soden A, Henschke Paul.A., Langridge Peter.** 1996. PCR Differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Appl Environm. Microbiol.* **62** (12): 4514-4520
- Difco Manual.** 11a edición. Difco Laboratories
- Egli C.M., Edinger W.D.** 1998. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Micro.* **85**: 779-789
- Ercolini Danilo.,** 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*. **56**:297-314
- Farrelly, V., Rainey, F., Stackebrandt, E.** 1995. Effect of genome size and rrn gene copy

number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. **Appl. Environ. Microbiol.** **61**:2798-2801.

Fleet, G.H., 1990. Growth of yeast during wine fermentations. **J. Wine Res. I (3)** 211-223 .

Fleet, G.H., Heard, G.M. 1993 Yeast growth during fermentation. In: Fleet, G. H. (Ed.), Wine microbiology and Biotechnology. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 27-54.

Gutierrez A.R., Santamaría P., Epifanio S. 1999. Ecology of spontaneous fermentation in one winery during 5 consecutive years. **Lett. In Appl. Microbiol.** **29**:411-415

Head I. M: Saunders J. R: Pickup R. W. 1998. Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. **Microbial Ecology.** **35**: 1-21

Hernán-Gómez S., Espinosa J.C., Ubeda J.F. 2000. Characterization of wine yeast by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). **FEMS Microbiol. Lett.** **193**: 45-50

Hierro N, González A, Mas A y Guillamón J.M. 2004. New PCR-based methods for yeast identification. **J. Appl. Microbiol.** **97**:792-801

Inglede W.M., Kunkee R. 1985. Factors influencing sluggish fermentations in grape juice. **Am. J. Enol. Vitic.** **36**:65-76

Kurtzman C. P., Robnett C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeast from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek.** **73**: 331-371

Lachance Mar-André. (1995) Yeast communities in a natural tequila fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek.** **68**: 151-160

Lopandic K., Zelger S.2006. Identification of yeast associated with milk products using traditional and molecular techniques. **Food Microbiology.** **23**: 341-350

Manzano, M., Colcolin, L., Longo, B., Comi, G., 2004. PCR-DGGE differentiation of strains of *Sacharomyces sensu stricto*. 2004. **Antonie van Leeuwenhoek** **85** : 23-27.

Manzano, M., Medrala, D., Giusto C., Bartolomeoli, I., Urso, R., Comi G. 2006. Classical and molecular analyses to characterize commercial dry yeasts used in wine fermentations. **J. Appl. Microbiol.** **100**: 599-607

Mauricio J.C. Y Salmon J.M. 1992. Apparent loss of sugar transport activity in *S. cerevisiae* may mainly account for maximum ethanol production during alcoholic fermentation. **Biotechnol. Lett.** **14** (7): 577-582

- Miller G.L.** 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**(3):426-428.
- Montgomery D.C.** 1991. Diseño y Análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamericana.
- Muyzer G. de Waal E C.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S RNAr. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695-700
- Muyzer G., Smalla K.** 1998. Application of denaturing gradient del electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwehoek.* **73**: 127-141
- Narendranath N.V., Hynes S.H., Thomas K.C. Y Ingledew W.L.** 1997. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 4158-4163.
- Nielsen D.S., Teniola O.D., Ban-Koffi L., Owusu M., Andersson T.S., Holzapfel W.H.** 2007. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture -independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* **114**: 168-186
- Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-1994,** bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones.
- Norma Oficial Mexicana.** Denominación de Origen TEQUILA
- Piña, C., Santos, C., Couto, J. A., Hogg, Tim.,** 2004. Ethanol tolerance of five non *Saccharomyces* wine yeast in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*-influence of different culture conditions. *Food Microbiology.* **21**: 439-447.
- Quantity one software.** User guide for version 4 windows and macintosh. BIO-RAD
- Reynsenbach, A.L., Giver, L.J., Wickham, G.S., Pace, N.R.** 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 3417-3418.
- Salmon, J. M., Vincent, O., Mauricio, J. M., Bely, M., y Barre, P.,** 1993. Sugar transport inhibition and apparent loss of activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor of enological fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* **44**(1): 56-64.
- Sanchez-Marroquín , A. y P.H. Hope.** 1953. Fermentation and chemical composition studies of some species. *Agric. Food Chem.* 246:1
- Schuller, D., Valero, E., Dequin S., Casal, M.,** (2004) Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiology Letters.* **231**: 19-26.
- Suzuki, M.T., Giovannoni, S.J.** 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 625-630

The Dcode Universal Mutation Detection System. Catalog Numbers 170-9080 Through 170-9104. BIO-RAD.

Thomas, D. S., Rose, A. H., 1979. Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane lipid composition. *Arch Microbiol.* **122**, 49-55.

Thomas K. Hynes S.H., Ingledew W.M. 1996. Effect of nitrogen limitation on synthesis of enzymes in *S. cerevisiae* during fermentation of high concentration of carbohydrates. *Biotech. Lett.* **18** (10): 1165-1168

van Beek S. y Priest G.F. 2002 Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisky fermentation: a polyphasic study. *Appl. Environ. Microbiol.* 297-305

Wafa Masoud, Lene B. Cesar, Lene Jespersen and Mogens Jakobsen. 2004. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast.* 21: 549-556.

Wilson, Ian G. 1997 Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Appl. Environm. Microbiol.* 63:3471-3751.

11 ANEXOS

ANEXO 1 Soluciones utilizadas en las distintas técnicas.

1.1 Extracción de ADN de cepas puras de levadura

1. Buffer de lisis

Tris Base 50 mM

NaCl 250 mM

EDTA 50 mM

SDS 0.3 %

Ajustar el pH a 8

1.2 Extracción de ADN de levaduras a partir de los mostos de agave fermentados (kit QIAGEN GENOMIC DNA)

A. Buffer G2 (Buffer de digestión)

800 mM guanidina-HCl

30 mM Tris-Cl pH 8

30 mM EDTA pH 8

5% Tween-20

0.5% Triton X-100

La solución se puede almacenar a una temperatura de 2 a 8° C o a temperatura ambiente.

B. Buffer Y1 (Buffer de lisis de levaduras)

1M sorbitol

100 mM EDTA

14 mM β -mercaptoetanol

La solución se debe almacenar a una temperatura de 2 a 8 ° C

C. Buffer QBT (Buffer de equilibrio)

750 mM NaCl

50 mM MOPS pH 7

15 % isopropanol

0.15% Triton X-100

D. Buffer QC (Buffer de lavado)

1 M NaCl

50 mM MOPS pH 7

15% isopropanol

E. Buffer QF (Buffer elución)

1.25 M NaCl

50 mM Tris-Cl pH 5

15% isopropanol

F. Buffer TE

10 mM Tris-Cl pH 8

1 mM EDTA pH 8

ANEXO 2

Soluciones requeridas para la elaboración de geles de gradiente desnaturizante (DGGE)

1. Buffer TAE 50X

Tris Base: 2M

ácido acético glacial: 1M

EDTA 0.5 M pH 8: 50 mM

La solución se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 a 20 minutos

2. Solución de acrilamida- bis acrilamida al 40 %

acrilamida 38.93 g

bis acrilamida 1.07 g

Aforar con agua destilada a 100 mL

La solución se filtró con ayuda de vacío en un equipo millipore, con una membrana de 0.45 μ m. Después de la filtración, la solución se desgasificó durante 10 minutos con ayuda de un agitador magnético y se mantuvo almacenada a 4° C.

3. Soluciones desnaturizantes UREA-FORMAMIDA al 30% y 60%

| Reactivo | Solución al 30 % | Solución al 60 % |
|-------------------------------------|------------------|------------------|
| Acrilamida-bisacrilamida al 40 % | 20 ml | 20 ml |
| Buffer TAE 50X | 2 ml | 2 ml |
| Urea | 12.6 g | 25.2 g |
| Formamida | 12 ml | 24 ml |
| Agua destilada | Aforar a 100 ml | Aforar a 100 ml |

La solución se filtró con ayuda de vacío en un equipo millipore, con una membrana de 0.45 μm . Después de la filtración, la solución se desgasificó durante 10 minutos con ayuda de un agitador magnético y se mantuvo almacenada a 4° C.

ANEXO 3

Análisis de varianza de los datos de amplificación preferencial de templados de ADN individuales de las cepas puras *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *C. glabrata* en geles de DGGE

Ho= Hay diferencia significativa cuando las levaduras se amplifican individualmente en una reacción de PCR

$$F_o = 0.515 \quad F_{0.05,3,6} = 4.76$$

$F_o < F_{0.05}$ por tanto no hay diferencia significativa en la amplificación de las cepas con un nivel de significancia del 95%

Análisis de varianza de los datos de amplificación preferencial de la mezcla de templados de ADN de las cepas puras de *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *C. glabrata* en geles de DGGE.

Ho= Hay diferencia significativa cuando las levaduras se amplifican juntas en una mezcla de concentraciones iguales en una reacción de PCR

$$F_o = 0.403 \quad F_{0.06,3,6} = 4.76$$

$F_o < F_{0.05}$ por tanto no hay diferencia significativa en la amplificación de la mezcla de las tres cepas con un nivel de significancia del 95%

Prueba t de student realizada a los datos de amplificación preferencial de las mezclas de ADN de cepas puras.

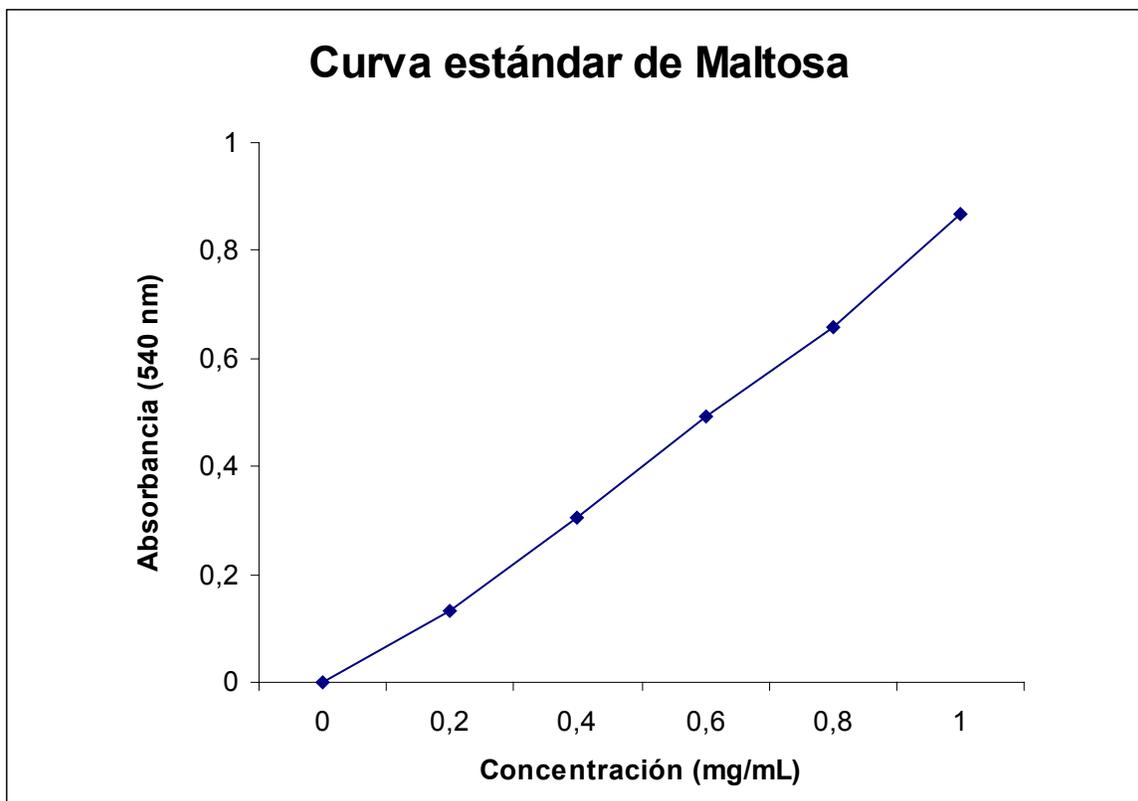
Valor $t_{0.05,2}=4.3$

| Combinación de cepas | $t_{\text{experimental}}$ |
|--|---------------------------|
| <i>S. cerevisiae</i> - <i>K. marxianus</i> | 2.05 |
| <i>S. cerevisiae</i> - <i>C. glabrata</i> | 2.44 |
| <i>K. marxianus</i> - <i>C. glabrata</i> | 1.74 |

En todas las combinaciones $t_{0.05,2}=4.3 < t_{\text{experimental}}$. Por lo tanto No hay diferencia significativa en la amplificación de la mezcla de dos templados de ADN de cepas puras

ANEXO 4 Cuantificación de Azúcares y Etanol

4.1 Curva estándar de maltosa para cuantificación de azúcares reductores por método DNS



Ecuación de la recta:

$$y = 0.871X - 0.026$$

Fermentación natural

| Tiempo (Horas) | % Azucares reductores |
|----------------|-----------------------|
| 0 | 13.74 |
| 4 | * |
| 8 | 10.69 |
| 20 | 8.33 |
| 24 | 5.58 |
| 32 | 2.94 |

* no calculado

Fermentación inoculada

| Tiempo (horas) | % Azucares reductores |
|----------------|-----------------------|
| 0 | 17.34 |
| 4 | 10.15 |
| 8 | 7.85 |
| 20 | 5.32 |
| 24 | 2.31 |
| 32 | 0.87 |

4.2 Principio del sistema enzimático para la cuantificación de etanol

El etanol es oxidado a acetaldehído por NAD en presencia de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH)



El NADH se determina por la absorbancia de luz a 340 nm

Para calcular la concentración de etanol en la reacción, la cantidad de NADH formada es estequiometricamente la mitad de la cantidad del sustrato.

Orden de adición de los reactivos para la cuantificación de Etanol

| Pipetear en el tubo de reacción | Blanco de etanol | Muestra de etanol |
|---------------------------------|------------------|-------------------|
| Solución 2* | 2.0 mL | 2.0 mL |
| Agua destilada | 0.066 mL | - |
| Muestra | - | 0.066 mL |

Mezclar. Esperar 3 minutos y leer la absorbancia de la solución (A1). Continuar la reacción adicionando:

| | | |
|--------------|----------|---------|
| Solución 3** | 0.033 mL | 0.033mL |
|--------------|----------|---------|

Mezclar. Esperar de 5 a 10 minutos. Leer la absorbancia de las soluciones una después de la otra inmediatamente (A2).

*Solución 2: Disolver 1 tableta de NAD (botella 2) en 3 mL del buffer difosfato de potasio pH 9 (botella 1)

**Solución 3: Suspensión de ADH sin diluir (botella 3)

Se determinó la diferencia de absorbancias (A2-A1) tanto para el blanco como para la muestra. Finalmente:

$$\Delta A = (A2-A1)_{muestra} - (A2-A1)_{blanco}$$

La concentración de etanol se calcula mediante la formula:

$$C = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 2 \times 1000} \times \Delta A \times F \quad (\text{g etanol/l de solución de la muestra})$$

V= volumen final (mL)

V= volumen de la muestra (mL)

MW= Peso molecular de la muestra (g/mol)

d= paso de luz (cm)

F= Factor de dilución

€= Coeficiente de extinción de NADH (6.30 l/mmol cm)

ΔA = absorbancia de la muestra – absorbancia del blanco

El porcentaje de etanol se calcula:

$$\% \text{ etanol} = \frac{C_{\text{etanol}} (\text{g/L de solución de la muestra})}{10 \times 0.78924 \text{ g/ml}} \quad (\% \text{ v/v})$$

Fermentación Natural

| Tiempo (Horas) | % Etanol |
|----------------|----------|
| 0 | 0.018 |
| 4 | * |
| 8 | 0.16 |
| 20 | 3.28 |
| 24 | 5.44 |
| 32 | 6.64 |

*no calculado

Fermentación inoculada

| Tiempo (horas) | % Etanol |
|----------------|----------|
| 0 | 0.02 |
| 4 | * |
| 8 | 0.13 |
| 20 | 2.25 |
| 24 | 4.02 |
| 32 | 6.81 |

*no calculado

ANEXO 5

Electroforesis en gel de agarosa. Comparación del patrón de bandas obtenido para diferentes cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de los mostos fermentados de agave utilizando los primers $\delta 1$ y $\delta 2$ (Legras J.L. Karst F, 2003; Egli C.M. 1998)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 **10*** 11 12 13 14

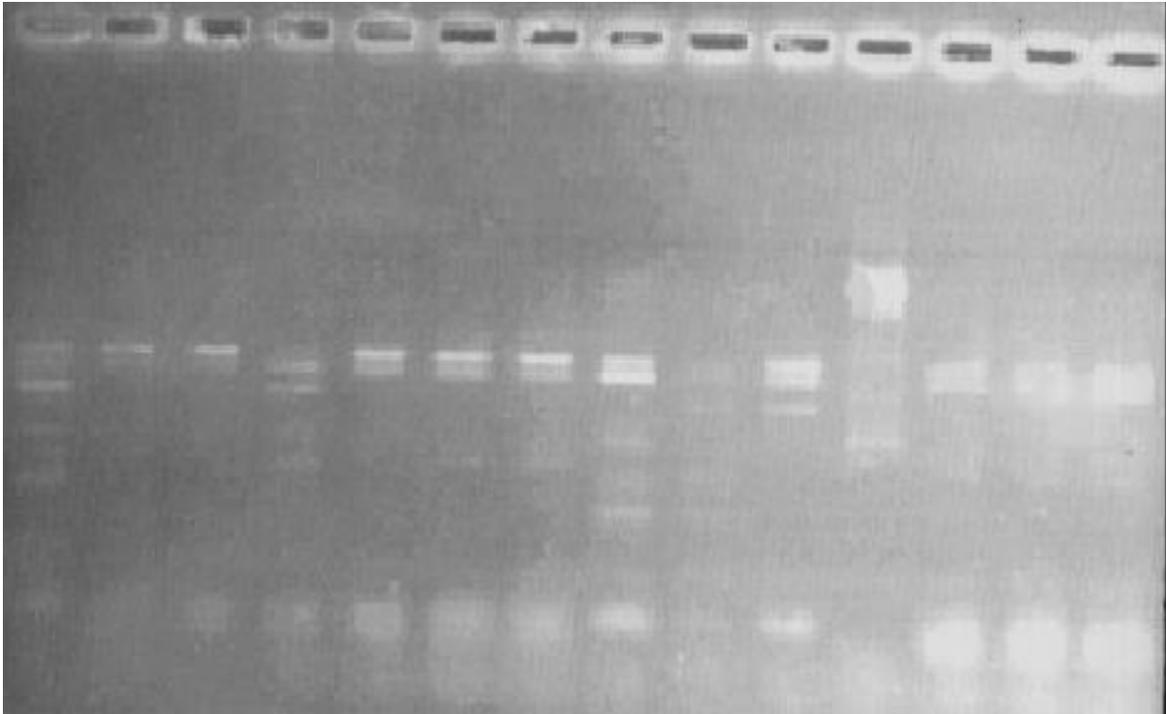


Figura 18 Patrón de bandas obtenido para diferentes levaduras *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de mosto no inoculado de agave 100% para producción de tequila, con los primers $\delta 1$ y $\delta 2$. Carril 1, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC; carril 2, *S. cerevisiae* B cultivo iniciador utilizado en la planta productora de tequila, carril 3-6, *S. cerevisiae* encontradas en tinas de formulación de 2000 Litros, carril 7-10, *S.cerevisiae* de la tina de formulación de 50000 litros; carril 11 cepa de *K. marxianus* encontrada en el fermentador de 50000 litros al tiempo cero de la fermentación; carriles 12-14 *S.cerevisiae* encontradas en el tiempo cero de la fermentación. *La cepa de *S. cerevisiae* A diferente del cultivo iniciador utilizada en nuestros modelos de la fermentación natural es la que se encuentra en el carril 10.