



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DE LAS LEVADURAS ASOCIADAS AL
PROCESO FERMENTATIVO DEL MEZCAL

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

ALMA GABRIELA VERDUGO VALDEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANNE GSCHAEDLER MATHIS
CIATEJ A.C.

COTUTOR DE TESIS: DR. ROBERTO CORIA ORTEGA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

COMITÉ TUTOR: DRA. ALMA ROSA GONZÁLEZ ESQUINCA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS,
UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM

Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 18 de junio de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **VERDUGO VALDEZ ALMA GABRIELA** con número de cuenta **507011776** con la tesis titulada: "**CARACTERIZACIÓN DE LAS LEVADURAS ASOCIADAS AL PROCESO FERMENTATIVO DEL MEZCAL**", realizada bajo la dirección de la **DRA. ANNE CHRISTINE GSCHAEDLER MATHIS**:

Presidente:	DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
Vocal:	DR. FRANCISCO RUIZ TERÁN
Secretario:	DRA. ALMA ROSA GONZÁLEZ ESQUINCA
Suplente:	DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO
Suplente	DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizara a solicitud de la alumna, **con cinco sinodales**, con base en lo establecido en el Artículo 31 y acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO** del Reglamento General de Estudios de Posgrado vigente.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 25 de abril de 2013.



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por ser la plataforma para mi formación científica.

Al CONACyT, por el apoyo financiero brindado durante mi formación como becario y por el financiamiento al proyecto de investigación número 24556.

Al PROMEP, por la beca recibida para la terminación de los estudios de doctorado.

Al COCyTECH, por el apoyo recibido para la redacción del documento final de tesis.

A la Dra. Anne Gschaedler Mathis, por su impecable desempeño como Tutora Principal de este trabajo y por impulsarme siempre de manera incondicional por el camino de la ciencia y de la vida.

Al Dr. Roberto Coria Ortega, por aceptar fungir como Co-Tutor y por sus acertadas aportaciones.

A la Dra. Alma Rosa González Esquinca, por su participación en el Comité Tutor con valiosas aportaciones al desarrollo de la investigación y por ser un apoyo en todo momento de mi formación.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Este trabajo se desarrolló en los laboratorios de Biología Molecular y de Biotecnología del Centro de Investigación en tecnología y diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ A. C.) y en el laboratorio de Biología Molecular y Genética de la Facultad de ciencias biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, por lo que reitero mi agradecimiento a estas Instituciones, al personal en ellas labora y a mis compañeros y amigos que fueron un importante apoyo para mi formación.

Agradezco a la Fábrica “Laguna Seca” por las facilidades brindadas para la realización de esta investigación.

A todos mis maestros, que supieron guiarme con paciencia y sabiduría a través de este proceso, compartiéndome su experiencia y su pasión por la ciencia.

Infinitamente agradezco el amor, comprensión y apoyo que tuve de mi familia y mis amigos en todos los sentidos. Definitivamente son el soporte que nunca me faltó, y a pesar de la distancia, la representación de Dios conmigo. Sin ellos este trabajo hubiera sido imposible.

Gilberto, Oscar, Gaby y Ale
Por ustedes

ÍNDICE

1.- RESUMEN	
2.- ABSTRACT	
3.- INTRODUCCIÓN	
4.- JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
5.- OBJETIVOS	2
5.1.- OBJETIVO GENERAL	2
5.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
6.- ANTECEDENTES	3
6.1.-EL GÉNERO AGAVE	3
6.1.1.- Descripción de <i>Agave salmiana</i>	3
6.1.2.- Usos de los agaves	7
6.2.- BEBIDAS DERIVADAS DE AGAVE.....	8
6.2.1.- Pulque	8
6.2.2.- Mezcales	10
6.2.2.1.- Proceso de elaboración del mezcal en San Luís Potosí	14
6.3.- BIOQUÍMICA DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.....	18
6.3.1.- Etanol.....	19
6.3.2.- Alcoholes superiores	21
6.3.3.- Ésteres	21
6.3.4.- Compuestos volátiles en las bebidas alcohólicas destiladas de agave.....	22
6.4.- ECOLOGÍA DE LAS LEVADURAS	24

6.4.1.- Clasificación taxonómica.....	24
6.4.2.- Levaduras en los productos fermentados	25
6.4.3.- Levaduras en las bebidas alcohólicas derivadas de agave.....	28
6.5.- IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS POR TÉCNICAS MOLECULARES	30
6.5.1.-Técnicas moleculares dependientes de cultivo para la identificación de especies.....	30
6.5.1.1.- Análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP).....	30
6.5.1.2.- Secuenciación de la región D1/D2 del gen ribosomal 26S.....	31
6.5.2.- Técnicas dependientes de cultivo para la caracterización a nivel de cepas	32
6.5.2.1.- Electroforesis de cromosomas en campo pulsado (PFGE).....	32
6.5.2.2.- El análisis del polimorfismo de los fragmentos de ADN amplificados aleatoriamente (RAPD)	33
6.5.2.3.- Microsatélites y Minisatélites.....	34
6.5.2.4.- Análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos de amplificación (AFLP).....	35
6.5.2.5.- Análisis de restricción del ADN mitocondrial	37
6.5.3.- Técnicas de identificación independientes de cultivo.....	38
6.5.3.1.- PCR en tiempo real.....	38
6.5.3.2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente de desnaturalización (DGGE) y de temperatura (TGGE).....	39
7.- MATERIALES Y MÉTODOS	42
7.1.- MUESTREO.....	42

7.2.- DIVERSIDAD DE ESPECIES DE LEVADURAS.....	45
7.2.1.- Medios de cultivo	45
7.2.2.- Aislamiento en placa	46
7.2.3.- Extracción de ADN total a partir de muestras de mosto.....	46
7.2.4.- Extracción de ADN total de levaduras a partir de colonias aisladas.	48
7.2.5.- Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de la región 5.8S-ITSs.	49
7.2.6.- Secuenciación de la región D1/D2 del gen ribosomal 26S.....	50
7.2.7.- Electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente de desnaturalización (DGGE).	51
7.3.- ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DE LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE AMPLIFICACIÓN (AFLP).....	53
7.4.- ÍNDICES DE DIVERSIDAD.....	54
7.5.- EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO FISIOLÓGICO DE LAS PRINCIPALES LEVADURAS DEL MEZCAL EN SAN LUÍS POTOSÍ.....	55
7.5.1.- Cinética de fermentación de las levaduras.....	55
7.5.1.1.- Reactivación de las levaduras para la obtención del inóculo	55
7.5.1.2.- Fermentaciones controladas en matraz	56
7.6.- MÉTODOS ANALÍTICOS.....	56
7.6.1.- Determinación de azúcares reductores directos	56
7.6.2.- Determinación enzimática de etanol	56
7.6.3.- Determinación de compuestos volátiles mayoritarios.....	57
7.7.- DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS.....	57
7.8.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	59

8.- RESULTADOS	60
8.1.- DIVERSIDAD DE LAS LEVADURAS EN LA FERMENTACIÓN.....	60
8.1.1.- Caracterización morfológica de las levaduras cultivadas en placa	60
8.1.2.- Identificación molecular de levaduras por métodos convencionales.....	62
8.1.3.- Distribución y sucesión de levaduras en los procesos fermentativos.....	65
8.2.- RELACIÓN ENTRE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA Y LA CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES	71
8.3.- DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS LEVADURAS PERSISTENTES DURANTE LA FERMENTACIÓN.....	75
8.4.- EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LEVADURAS A NIVEL MATRAZ	80
8.4.1.- Cinética de crecimiento de las levaduras y producción de etanol.	80
8.4.2.- Generación de compuestos volátiles mayoritarios	83
9.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS	86
9.1.- COMPOSICIÓN Y DIVERSIDAD DE LAS LEVADURAS.....	86
9.2.- RELACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE LEVADURAS CON LA GENERACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN LA FERMENTACIÓN	93
9.3.- VARIABILIDAD GENÉTICA DE LAS ESPECIES DE LEVADURAS PERSISTENTES DURANTE LA FERMENTACIÓN DEL MOSTO DE A. salmiana EN LA FÁBRICA "LAGUNA SECA".....	96
9.4.- COMPORTAMIENTO DEL CONSORCIO DE LEVADURAS BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE LABORATORIO.....	98
10.-CONCLUSIONES	102
11.-BIBLIOGRAFÍA	105

12.- ANEXOS	131
ANEXO I: ANÁLISIS DE AFLP	131
ANEXO II: DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES TOTALES	138
ANEXO III: TABLAS DE ANOVA PARA LOS PARÁMETROS CINÉTICOS Y LOS COMPUESTOS VOLÁTILES MAYORITARIOS, SEGÚN LAS CEPAS ESTUDIADAS EN EXPERIMENTOS CONTROLADOS A NIVEL MATRAZ...	140
ANEXO IV: TABLAS DE RESULTADOS DE LA PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES PARA LOS PARÁMETROS CINÉTICOS Y LOS COMPUESTOS VOLÁTILES MAYORITARIOS, SEGÚN LAS CEPAS ESTUDIADAS EN EXPERIMENTOS CONTROLADOS A NIVEL MATRAZ.....	144
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE CUADROS	

1.- RESUMEN

México se ha caracterizado por la utilización integral de los agaves desde la época prehispánica, cuando se señalaba a esta planta como “el árbol de las maravillas”; desde entonces, las bebidas fermentadas derivadas de estos han sido muy importantes, tanto comercial como culturalmente. El proceso de obtención del mezcal, al igual que otros productos fermentados, es llevado a cabo por fermentación espontánea (Escalante-Minakata *et al.* 2008). La población microbiana de este tipo de fermentaciones es escasamente conocida, en particular; las levaduras que crecen durante la fermentación de *Agave salmiana* subsp. *crassispina* en el Estado de San Luís Potosí.

En este trabajo se caracterizó la dinámica de las levaduras y su diversidad durante el proceso fermentativo en la fabricación del mezcal “Real de Magueyes” elaborado en la fábrica Ex-Hacienda “Laguna Seca” de San Luís Potosí, México. Se identificaron ocho especies de levaduras a partir del aislamiento en placa por análisis RFLP de la región ITS-5.8S del ADNr, con las endonucleasas de restricción HhaI, HaeIII e HindI. La identidad de las levaduras se confirmó por la secuenciación del dominio D1/D2 de la subunidad grande (26S) ribosomal. Las especies encontradas fueron: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kluyveri*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Clavispora lusitaniae*, *Torulaspota delbrueckii*, *Candida ethanolica* y *Saccharomyces exiguus*.

La diversidad de las levaduras al inicio y al final de las fermentaciones, en términos del Índice de Shannon-Wiener osciló de 0.49 hasta 0.20 durante la

Resumen

fermentación 1, en la que se evidenció correlación inversa con la concentración de alcoholes superiores y en la fermentación 2 los valores fueron desde 0.12 hasta 0.79, en ésta fermentación no se observó correlación estadísticamente significativa con ninguno de los parámetros medidos.

Se encontró que *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* y *Torulaspota delbrueckii* persistieron a lo largo de toda la fermentación, lo cual fue confirmado con un análisis de PCR-DGGE.

La variabilidad de las tres especies anteriores se valoró con el análisis AFLP. El porcentaje de polimorfismo fue de 66.5%, 63% y 88.3% para *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* respectivamente; y la heterocigosidad esperada fue de 0.989, 0.984 y 0.988 para las mismas especies.

La etapa final del trabajo consistió en someter dos cepas de cada una de las tres especies, a condiciones controladas de laboratorio y determinar sus parámetros cinéticos y la generación de compuestos volátiles, en estos experimentos se encontró que no hubo diferencia de velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}), velocidad específica máxima de consumo de sustrato ($q_{s_{max}}$) y rendimiento de producto con base al sustrato ($Y_{p/s}$). Aunque *K. marxianus* produjo más acetato de etilo que *S. cerevisiae*, mientras que *T. delbrueckii* presentó el más alto valor de rendimiento de biomasa con base en sustrato ($Y_{x/s}$) (0.63 y 0.41, cepas 620 y 1423 respectivamente). También se encontraron diferencias significativas entre las cepas de las tres especies respecto a la concentración final de etanol y de algunos compuestos volátiles.

Resumen

Este trabajo aporta información sobre el comportamiento de las levaduras autóctonas que intervienen en la producción del mezcal en la fábrica Ex-Hacienda “Laguna Seca” de San Luís Potosí, México, y evidencia la importancia de las especies no-Saccharomyces en el proceso fermentativo.

2.- ABSTRACT

Mexico has been characterized by the integral use of agaves from prehispanic ages, when this plant was considered as "the tree of wonders" and since then, fermented beverages derived from these plants have been very important, both commercially and culturally. The production process of mezcal, like other fermented products, is carried out by spontaneous fermentation (Escalante-Minakata *et al.* 2008), whose microbial population has not been characterized. Particularly; the growing yeast during fermentation of *Agave salmiana* ssp. *crassispina* in San Luís Potosí State.

In this research were characterized the dynamics and diversity of yeast during the fermentation process in the manufacture of mezcal "Real de Magueyes " prepared at the factory Ex-Hacienda "Laguna Seca" in San Luis Potosi, Mexico. Eight species of yeasts were identified isolated from the plate by RFLP analysis of ITS-5.8S region of rRNA, with the restriction endonucleases HhaI, HaeIII and HinfI, and they identity was confirmed by sequencing the D1/D2 domain of large subunit (26S) ribosomal. The found species were: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kluyveri*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Clavispora lusitaniae*, *Torulaspota delbrueckii*, *Candida ethanolica* y *Saccharomyces exiguus*.

The diversity of yeast at the beginning and end of the fermentation, in terms of Shannon-Wiener index ranged of 0.49 to 0.20 during fermentation 1, on which inverse correlation was found with the higher alcohols concentration and in

Abstract

fermentation 2 the values were from 0.12 to 0.79, in this fermentation there was no statistically significant correlation with any of the parameters measured.

It was that *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* y *Torulaspota delbrueckii* persisted throughout the fermentation, which was confirmed by performing a PCR-DGGE analysis and with PCR-DGGE analysis.

The variability of the above three species was assessed using the AFLP analysis. The polymorphism percentage was 66.5%, 63% and 88.3% for *S. cerevisiae*, *K. marxianus* and *T. delbrueckii* respectively, and expected heterozygosity was 0.989, 0.984 and 0.988 for the same species.

The final stage of the work was to submit two strains of each of the three species, under controlled laboratory conditions and determine their kinetic parameters and the generation of volatile compounds, in these experiments it was found that there was no difference in the maximum specific growth rate (μ_{max}), maximum specific rate of substrate consumption ($q_{s_{max}}$) and product yield based on the substrate ($Y_{p/s}$). Although *K. marxianus* produced more ethyl acetate *S. cerevisiae*, while *T. delbrueckii* showed the highest value of biomass yield based on substrate ($Y_{x/s}$) (0.63 and 0.41, strains 620 and 1423 respectively). There were also significant differences among strains of three species with respect to the final concentration of ethanol and some volatile compounds.

Abstract

This work provides information on the behavior of yeasts involved in the production of mezcal in the factory Ex-Hacienda “Laguna Seca” of San Luis Potosi, Mexico, and shows the importance of non-Saccharomyces species in the fermentation process.

3.- INTRODUCCIÓN

El mezcal es una bebida destilada, producida por la fermentación del jugo de la piña de agave que ha sido previamente cocida y posteriormente molida. En México, esta bebida tradicional se obtiene a partir de varias especies de *Agave* cultivadas en la región de Denominación de Origen o fuera de ella (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, 1994). Debido a su gran popularidad, el mezcal y otras bebidas derivadas del agave han sido objeto de estudios para conocer su microbiología.

Sánchez-Marroquín y Hope (1953) reportaron que *Saccharomyces carbajali* (*S. cerevisiae*) y *Pseudomona lidneri*, fueron las principales levaduras productoras de alcohol a partir del aguamiel, *Lactobacillus spp* fueron responsables de la fermentación láctica, y *Leuconostoc mesenteroides* y *L. dextranicum* generaron la viscosidad en el producto final. Por su parte, Lappe-Oliveras y Moreno-Terrazas (En prensa) proporcionaron un listado de estudios realizados en pulque que datan desde 1864 cuando Río de la Loza reportó la primera observación microscópica de ésta bebida encontrando bacterias y levaduras; más recientemente se han realizado estudios que caracterizan la microbiota de levaduras (Estrada-Godina *et al.* 2001) y la diversidad bacteriana en pulque (Escalante *et al.* 2004).

Respecto a la microbiología de las bebidas destiladas derivadas de agave, Lachance (1995) y Andrade-Meneses y Ruíz-Terán (2004) señalaron la predominancia de especies de *Candida* en tequila y en mezcal de Oaxaca, respectivamente. Recientemente Escalante–Minakata *et al.* (2008) realizaron un

Introducción

estudio acerca del mezcal producido en la destilería “La Perla”, en el Estado de San Luís Potosí y reportaron la presencia de las levaduras *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia fermentans* y *Clavispora lusitaniae* mediante la aplicación de métodos moleculares.

En la última década, se ha demostrado que aplicados de manera independiente, ni los métodos microbiológicos clásicos ni los métodos moleculares dependientes de cultivo son capaces de detectar la diversidad microbiana en las fermentaciones artesanales (Ben Omar y Ampe, 2000; Tu *et al.* 2010), y es en este sentido que la aplicación de los métodos independientes de cultivo ha tomado auge para los estudios de diversidad microbiana en productos fermentados como en vinos (Cocolin *et al.* 2001; Renouf *et al.* 2007), masas fermentadas (Meroth *et al.* 2003; De Vuyst *et al.* 2009), granos de cacao (Nielsen *et al.* 2005; Lefeber *et al.* 2011), salchichas (Rantsiou y Cocolin 2006), aceitunas (Abriouel *et al.* 2011), entre otros.

En este trabajo se analiza la composición de levaduras y su efecto en la fermentación de *Agave salmiana* subsp. *crassispina* que crece silvestre en el altiplano Potosino, utilizando el método molecular de análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) de la región 5.8S-ITS del ADNr (Esteve-Zarzoso *et al.* 1999) seguido de la secuenciación del dominio D1/D2 (Kurtzman y Robnett, 1998), con el que se identificaron las colonias aisladas en placa. Con electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente de desnaturalización (DGGE, por sus siglas en inglés)

Introducción

se determinó que *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* persistieron a lo largo del proceso fermentativo.

Además de la diversidad de la microflora involucrada en este tipo de procesos, un aspecto que se debe de tomar en cuenta, es la diversidad genética de las poblaciones, dado que se ha revelado que aunque una especie sea predominante en un proceso fermentativo, no se trata de un solo biotipo el que sobrevive a todo el proceso (Cocolin *et al.* 2006). En este sentido, la diversidad genética de las 3 especies que persisten durante toda la fermentación se calcula mediante las distancias génicas por el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (AFLP, por sus siglas en inglés) y con base en esta información se diseñaron experimentos en condiciones controladas de laboratorio para describir el comportamiento cinético de dos cepas de cada una de ellas.

4.- JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Al igual que en el vino, en los procesos de fermentación de bebidas destiladas de agave, intervienen levaduras del género *Saccharomyces* y levaduras de otros géneros, es decir no-*Saccharomyces*, así como algunas especies de bacterias lácticas (Pretorius 2000; Lachance 1995; Lappe *et al.* 2004; Gschaedler *et al.* 2004; Flores Berrios *et al.* 2005). En México se ha iniciado el estudio de los procesos de elaboración y fermentación de los mezcales, en particular de la microbiota involucrada (Andrade-Meneses y Ruiz-Terán, 2004; Escalante-Minakata *et al.* 2008; Segura-García, 2010). Sin embargo, es necesario profundizar en la dinámica de crecimiento de las especies que llevan a cabo la fermentación, así como la relación que guardan con el perfil aromático del producto y el efecto de la especie de agave utilizada como materia prima en las regiones mezcaleras.

Este proyecto contribuye a la caracterización de la dinámica microbiana durante la fermentación de *Agave salmiana* subsp. *crassispina* mediante el empleo de métodos microbiológicos tradicionales e independientes de cultivo (como PCR-DGGE). Con estos métodos moleculares se pueden identificar a los microorganismos más abundantes involucrados en el proceso y además el impacto de estos sobre las características sensoriales del producto final. El objetivo final es ayudar a mejorar el proceso de fermentación y la calidad de los mezcales y permitir, quizás que los microorganismos aislados y caracterizados en este trabajo sean utilizados en otros procesos biotecnológicos.

5.- OBJETIVOS

5.1.- OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la dinámica de crecimiento de las levaduras y su diversidad durante la etapa de fermentación en la producción del mezcal “Real de Magueyes” en la fábrica Ex-Hacienda “Laguna Seca” del Estado de San Luís Potosí.

5.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Conocer la composición y diversidad de levaduras asociadas a la producción de mezcal mediante métodos morfológicos, moleculares y bioquímicos tradicionales.
2. Determinar la relación entre la diversidad de las levaduras y la generación de compuestos volátiles mayoritarios durante la fermentación.
3. Evaluar la diversidad genética de las levaduras persistentes durante el proceso fermentativo.
4. Caracterizar la cinética de crecimiento y la producción de compuestos volátiles de las levaduras que persisten durante el proceso fermentativo; en condiciones controladas de laboratorio a nivel matraz.

6.- ANTECEDENTES

6.1.-EL GÉNERO AGAVE

El género *Agave* pertenece a la familia Asparagaceae Juss (APGIII, 2009). Esta familia es endémica de América y se encuentra distribuida desde el sur de Canadá, México, Centroamérica, norte de Sudamérica y las islas del Caribe (Rocha *et al.* 2006; Cházaro *et al.* 2007). Esta familia tiene su origen hace alrededor de 14 millones de años (Eguiarte, 1995), y está representada por dos subfamilias: Yuccoideae y Agavoideae (Cházaro *et al.* 2007). Por su parte, el género *Agave*, es relativamente joven, data de entre 7.8 y 10.1 millones de años (Good-Ávila *et al.* 2006). En México, se encuentra el 78% de los taxa pertenecientes al género *Agave*, ya que de los 207 taxa reportados en el mundo, en nuestro país se encuentran 161. Según Gentry (1982), se reconocen 136 especies, 26 subespecies, 29 variedades y 7 formas para la parte continental de Norteamérica. El género *Agave* se divide en dos subgéneros: *Agave*, con inflorescencia en panícula o umbelada; y *Littaea*, en forma de espiga o racimosa (Cházaro *et al.* 2007).

6.1.1.- Descripción de *Agave salmiana*

Agave salmiana Otto ex Salm-Dyck., in Otto y Dietr. Allg.Gartenz. 51. 1842.

Agave cochlearis Jacobi, Nachtr.II in Abh.Schels. Ges.Vaterl.Cult. Abth. Naturwiss. 1870:151.

TIPO: No existe.

Clasificación taxonómica:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Lilianae Takht.

Orden: Asparagales Link

Familia: Asparagaceae Juss

Género: *Agave* L.

Especie: *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck

Especímenes del Occidente de México: **Aguascalientes**: Rose y Hoygh 4931 (US); Tepezalá M. de la Cerda 5540, (HUAA). **Jalisco**: Lagos de Moreno, Sierra Alta de Comanja, M. Cházaro B. et al. S.n. (IBUG); Tepatitlán de Morelos, fotografía, Fig. 21.12 (Gentry 1982). **Colima**: Dodge 2 (US).

Rosetas muy grandes, comúnmente con vástagos, rosetas laxas de 80 a 200 cm de alto por 120 a 250 cm de diámetro. **Hojas** linear-lanceoladas o lanceoladas, de 1 a 2.5 m de largo por 16 a 40 cm de ancho, hacia la base marcadamente convexas en la cara exterior y cóncavas o hasta acanaladas en la cara interior, ápice largamente acuminado con una curvatura sigmoidea más o menos marcada, carnosas casi rígidas, verde claras a verde amarillentas o verde glaucas, con evidentes impresiones de los dientes de las hojas adyacentes; margen repando; dientes planos de 5 a 10 (17) mm de largo, marrón rojizo oscuros a grisáceos, la mayoría recurvados; espina terminal de 4.5 a 10 cm de largo, recta y excavada en su cara interior, ampliamente decurrente, en ocasiones hasta la mitad o por todo el margen de la hoja. **Inflorescencia** paniculada amplia, de 3.5 a 8 m de largo, con 9 a 20 ramas con umbelas descompuestas en la mitad superior del escapo; pedúnculo fuerte, cubierto por brácteas carnosas, imbricadas. **Flores** de 7 a 11 cm de largo gruesas y carnosas, amarillento-verdosas. Ovario de 50 a 60 mm de largo, grueso, cilíndrico, sin constricción en el cuello. Tubo de 17 a 24 mm de largo, surcado. Tépalos desiguales, lanceolados, de 21 a 25 mm de largo, por 3.5 a 6.0 mm de ancho, ápices cuculados, involutos y pilosos, los de la serie interna ampliamente aquillados; anteras linear-oblongas, de 30 a 35 mm de largo. **Cápsulas** oblongo-elipsoidales, de 5.5 a 7.0 cm de largo por 2 a 2.4 cm de diámetro, apiculadas, estipitadas, marrón oscuras; semillas lacrimiformes, de 8 a 9 mm de longitud por 5 a 7 mm de ancho. Florece de marzo a junio.

Antecedentes

Distribución: México: Coahuila, Durango, Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Jalisco, Colima, Querétaro, San Luís Potosí, Hidalgo, Puebla y Veracruz. Florece de marzo a junio.

Agave salmiana* subsp. *crassispina

Agave salmiana Otto ex Salm-Dyck ssp. *crassispina* (Trel.)Gentry.

Agave crassispina Trel.In Standley, Contr. U. S. nat. Herb.23:129, 1920; in Bailey, Stand, Cycl.Hort. 1:234, 1914.

Sinonimias: *Agave crassispina* Trel. ex L.H. Bailey y *Agave crassispina* var. *culta* Trel. (Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 20 Jun 2012).

Tipo: Trelease?, "about San Luís Potosí."(¿MO?).

Especímenes del occidente de México: **Jalisco:** Lagos de Moreno Sierra Alta de Comanja.

Se distingue porque su roseta suele no ser urceolada -en forma de cántaro-, sus hojas o son pardo verduzcas o verde glaucas, erectas, ascendentes, rara vez curvadas hacia fuera, usualmente acuminadas, con los márgenes y dientes variables y con el tubo de 7 a 21 mm de ancho.

Distribución: Coahuila, Guanajuato, Jalisco, San Luís Potosí, Hidalgo, Puebla y Zacatecas. Florece de marzo a junio. En Jalisco crece en bosque de *Quercus* (encinos), en la Sierra Alta (también conocida como Cuatralba o Comanja) a 2532 m. s. n. m. donde prospera en grandes poblaciones. Las plantas encontradas en

floración, creciendo en forma espontánea, en los cerros de la Sierra Alta de Comanja, municipio de Lagos de Moreno, corresponden a *Agave salmiana* subsp. *crassispina* y representa el primer registro para Jalisco, ya que McVaugh (1989) la había reportado solo como especie cultivada. Florece de marzo a junio (Vázquez-García, 2007).

6.1.2.- Usos de los agaves

Saldívar y Vargas-Rodríguez (2007) y recientemente Lappe-Oliveras y Moreno-Terrazas (En prensa) recopilaron lo reportado por Gonçalves de Lima en 1956, quien describe el uso que los indígenas mexicanos daban a los agaves según los códices prehispánicos, precortesianos y postcortesianos.

Las crónicas de Fray Toribio de Benavente –Motolinía—hablan acerca de cómo los indígenas utilizaban al agave, que ellos llamaban según los españoles, maguey (Saldívar y Vargas-Rodríguez, 2007). Igualmente Zizumbo-Villarreal *et al.* (2009) detallan en su obra las evidencias arqueológicas sobre el uso que los indígenas de Mesoamérica daban al agave y la importancia que estas plantas tenía para ellos. Estos pueblos utilizaban a los magueyes como fuentes de fibras para la fabricación de papel, telas y cuerdas (Nieves *et al.* 2007). Además, otras partes de la planta se usaban también para fines tales como construcción de viviendas (con los quiotes), para cubrir los techos (pencas), para la fabricación de zapatos, agujas, fibras y artesanías.

En general, el maguey era utilizado de forma integral como alimento, ropa, combustible, papel, medicina y como bebida, la cual según los indígenas tenía

origen divino. Los españoles lo llamaron “el árbol de las maravillas” debido a los múltiples usos que los indígenas le daban.

Carlos Linneo denominó al género con el nombre de *Agave*, del griego *agavos*, que significa “maravilloso”. Por su parte, los aztecas lo llamaban “metl” y Mayahuel era la diosa del maguey y del pulque (Cházaro *et al.* 2007).

6.2.- BEBIDAS DERIVADAS DE AGAVE

6.2.1.- Pulque

Esta es una bebida no destilada que se obtiene de la fermentación del jugo extraído de cinco especies de agave (*A. salmiana*, *A. atrovirens*, *A. americana*, *A. hookeri* y *A. mapisaga*) (Cházaro *et al.* 2007; Lappe *et al.* 2008) que crecen en zonas templadas y semi-áridas, de suelos pobres con precipitaciones escasas e irregulares.

El pulque se caracteriza por ser una bebida alcohólica de aspecto lechoso, viscosa, con sabor ligeramente ácido (Sánchez-Marroquín y Hope, 1953; Lappe *et al.* 2012) y era considerado como una bebida sagrada para los pueblos indígenas, la cual se consumía en rituales religiosos (Saldívar y Vargas-Rodríguez, 2007; Escalante *et al.* 2012).

Lappe *et al.* (2008) describen el proceso de producción tradicional del pulque y ellos mencionan que se obtiene después de que se ha eliminado la inflorescencia, y una vez que han madurado las hojas centrales, se forma una cavidad o cajete raspando el centro del tallo del agave, en donde se acumulará la

savia, que es removida por succión oral y depositada en recipientes abiertos para su fermentación espontánea generalmente, aunque algunas veces se utiliza también un inóculo o “semilla” que es preparado para incrementar la microbiota natural para la adecuada fermentación, y es utilizado para la producción del pie de cuba o inóculo cuando se mezcla con savia Tipo I –Según la norma NMX-V-022, se refiere a la savia limpia y con alto contenido de azúcar--.

La microbiota presente en la savia y en el pulque se clasifica en dos grupos principales: bacterias, que en la savia y el pulque joven o fresco son predominantes ($8.0-15.0 \times 10^8$ cel/mL) y levaduras ($3-6 \times 10^6$ cel/mL), cuya menor cantidad se atribuye al pH inicial (7-7.4). También se han encontrado algunos hongos como *Aspergillus*, *Mucor* y *Penicillium*. Conforme el proceso fermentativo avanza, los cambios químicos en el sustrato propician el desarrollo secuencial de diferentes microorganismos siendo más abundantes primero las bacterias productoras de ácido láctico tales como *Leuconostoc* y especies de *Lactobacillus* homo- y heterofermentativas, enseguida incrementa la cantidad de levaduras (especies de no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces*) y *Zymomonas mobilis* ssp. *mobilis* que transforman azúcares en alcohol y otros productos, posteriormente proliferan bacterias productoras de dextranos (*Leuconostoc* spp.), bacterias productoras de ácido acético (*Acetobacter* spp.). Al final del proceso se encuentran microorganismos causantes de putrefacción (Sánchez-Marroquín y Hope, 1953; Lappe *et al.* 2008; Valadez-Blanco *et al.* 2012).

6.2.2.- Mezcales

El vocablo mezcal se deriva de la palabra náhuatl “*metl*” que significa maguey o agave, y de “ixcahui” o cocimiento (Lappe *et al.* 2008) y se refiere a todas las bebidas que se obtienen de la destilación del jugo fermentado extraído después de haber cocido las cabezas de agave.

Según la Norma Oficial Mexicana NOM-0701-1994, el mezcal es la bebida elaborada a partir de agaves cosechados en la región de Denominación de Origen, comprendida en los estados de Oaxaca, Guerrero, Durango, San Luís Potosí y Zacatecas, además de algunos municipios de Guanajuato y Tamaulipas (Fig. 1), sin embargo Colunga *et al.* (2007) reportaron que se produce mezcal en 24 estados de la República mexicana, a partir de 42 especies de agave.

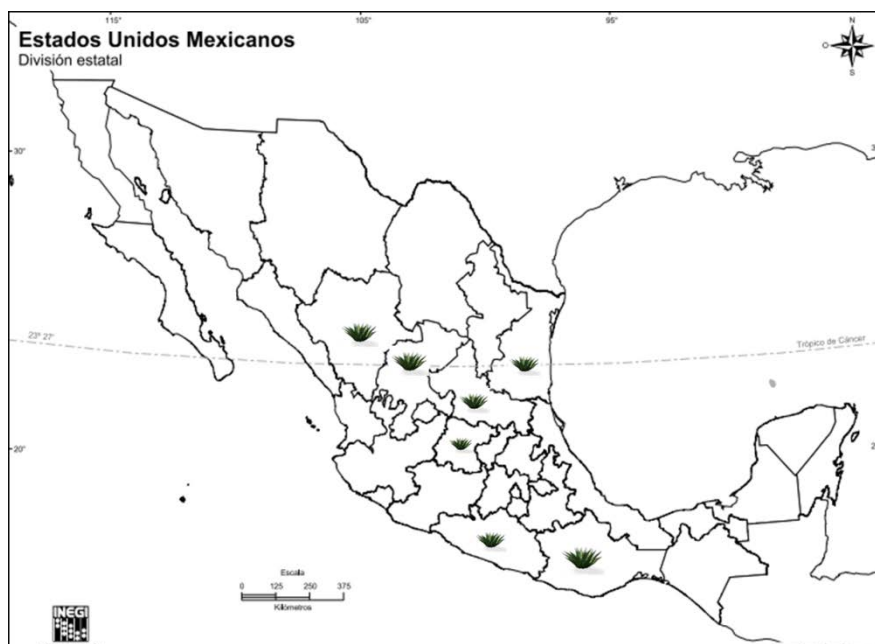


Figura 1.- Estados de la República Mexicana que pertenecen a la región de Denominación de Origen del mezcal según la Norma Oficial Mexicana NOM-0701-1994

Antecedentes

Las especies de agave que son consideradas como materia prima para la elaboración de mezcal según la NOM son: *A. angustifolia* Haw, *A. esperrima* Jacobi (cuyo nombre correcto es *A. asperrima*; según APGIII, 2009), *A. weberi* Cels ex Poisson, *A. potatorum* Zucc y *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck subsp *crassispina* (Trel.) Gentry, así como otras especies cuando no se encuentren en denominaciones de origen para la elaboración de otras bebidas.

Según la CONABIO (2006), las especies utilizadas para la producción mezcalera son: *A. angustifolia* Haw, *A. potatorum* Zucc, *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck ssp *crassispina* (Trel.) Gentry, *A. americana* L., *A. americana* var. *oaxacensis*, *A. cupreata* Trel & Berger, *A. durangensis* Gentry, *A. karwinskii* Zucc. , *A. marmorata* Roezl, *A. maximiliana* Baker, *A. rhodacantha* Trel. *A. inaequidens*, *A. lophanta* y *A. tequilana* Web. Además de estas especies, en la base de datos de la CONABIO (BADANAM) se registran otras dentro de la región de denominación de origen. En la Fig. 2, se presentan algunas especies de agave utilizadas para la obtención de bebidas alcohólicas.



Agave maximiliana



Agave angustifolia



Agave cupreata



Agave tequilana Weber



Agave salmiana ssp.

Figura 2.- Algunos tipos de agaves utilizados tradicionalmente para la elaboración de bebidas alcohólicas en México (Fotografías: Gschaedler A.).

En la misma norma se clasifica al mezcal según el porcentaje de azúcar proveniente del agave y con base en este criterio, se tienen dos tipos de mezcal:

Tipo I: 100% agave, obtenido de la destilación y rectificación de mostos preparados directamente con los azúcares de las cabezas maduras de los agaves, previamente hidrolizadas por cocimiento y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras cultivadas o no.

Tipo II: producto que se obtiene de la destilación y rectificación de mostos a cuya formulación se han adicionado hasta un 20% de otros carbohidratos permitidos.

Antecedentes

Ambos tipos de mezcal, pueden ser clasificados como joven, reposado o añejo y susceptible de ser abocado, es decir, que ha sido procesado para suavizar el sabor, mediante la adición de uno o más de los siguientes ingredientes:

- Color caramelo
- Extracto de roble o encino naturales
- Glicerina
- Jarabe a base de azúcar
- Colorantes y saborizantes que acepta la SSA.

En la actualidad la actividad económica en torno de la comercialización del mezcal se ha visto incrementada considerablemente, según el informe del 2011 del Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal A. C., (COMERCAM), en los últimos seis años se han exportado en promedio, 361,000 L a 55% Alc/Vol.; siendo los Estados Unidos el país más importante en este sentido. Pero el mezcal se ha exportado también a países europeos, asiáticos y de América Latina. En 2010, se envasaron 487,407.39 L de mezcal certificado referidos a 45% de Alc/Vol. en 61 marcas pertenecientes a 35 empresas; sin embargo, según el COMERCAM, la producción a granel ha sido por encima de 1'500,000 L referidos al mezcal a 45% Alc/Vol.

6.2.2.1.- Proceso de elaboración del mezcal en San Luís Potosí

México es reconocido por la producción de varias bebidas alcohólicas obtenidas a partir de la destilación de jugos fermentados de diferentes especies de *Agave*. El mezcal particularmente, se produce a partir de diferentes especies de agaves como por ejemplo *Agave angustifolia*, *A. salmiana*, *A. potatorum* (García Mendoza, 1998) y de otras 39 especies registradas por la CONABIO tanto en la región de denominación de origen como en otras 19 entidades federativas (Colunga *et al.* 2007).

Cosecha de los agaves:

Particularmente, en San Luís Potosí se utilizan las “piñas” de *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck ssp *crassispina* (Trel.) Gentry (Fig. 3) que se obtienen de poblaciones silvestres y cultivadas (Vázquez Díaz *et al.* 2011). Para la recolección se ocupan barretas y la extracción se efectúa desde la base y no desde la raíz, esto con el propósito de no recolectar partes que puedan dar sabores desagradables al mezcal.



Figura 3.- Piñas de *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck ssp *crassispina* (Trel.) Gentry, cosechadas del Altiplano Potosino.

Cocción:

El proceso de cocción de las piñas o cabezas de agave se lleva a cabo en hornos de mampostería (Fig. 4) con inyección de vapor; con lo que la materia prima se ablanda para facilitar la molienda.



Figura 4.- Horno de mampostería y piñas de *Agave* después del proceso de cocción.

Molienda:

La molienda se lleva a cabo en molinos rústicos llamados tahona. El agave cocido es prensado por una piedra que da vuelta en una fosa recubierta de piedras (Fig. 5) de esta manera se extraen los jugos de las piñas de agave cocidas.

Los pasos que se siguen para que la molienda se lleve a cabo son los siguientes:

- Cortado o rajado de las *piñas* cocidas.
- Acomodo de los trozos de *piña* en el centro del molino, con el fin de dar continuidad al machacado.

Antecedentes

- Traspaso del jugo de agave desde el molino a la tina de fermentación.
- En algunas destilerías, pasan las fibras de agave cocido a un depósito con agua para hacer un “lavado” de los azúcares y posteriormente esta agua es depositada también en las tinas de fermentación.



Figura 5.- Proceso de molienda en la tahona de las piñas de agave cocidas

Fermentación:

En esta etapa los azúcares contenidos en las *piñas* se transforman en etanol y otros compuestos, en particular alcoholes superiores, esterres y aldehídos; importantes para las características organolépticas del producto final.

Antes de iniciarse el proceso en las tinas de fermentación, se hace la preparación de un inóculo mezclando las mieles del cocimiento de las piñas con una porción de jugo obtenido de la molienda, esta mezcla se deposita en contenedores de plástico o de madera (Fig. 6) y se añade una porción de mosto proveniente de fermentaciones previas, que ha sido conservado en refrigeración.



Figura 6.- Inóculos preparados antes que se inicie el proceso de obtención del mezcal en las tinajas de fermentación

Una vez obtenido el inóculo, se deposita en las tinajas de fermentación de cantera (Fig. 7) en donde se mezcla con el jugo que se generó de la molienda para iniciar el proceso de fermentación del mosto. Esta operación dura aproximadamente 16 horas, tomando en consideración la temperatura ambiente.



Figura 7.- Llenado y aspecto de la tina durante la etapa de fermentación para la obtención del mezcal.

Destilación:

El proceso de destilación se realiza en alambiques de acero inoxidable (Fig. 8), el calentamiento es con vapor producido por una caldera y el enfriamiento se hace con agua fría para la condensación de los compuestos volátiles.



Figura 8.- Alambique de acero inoxidable en el que se lleva a cabo la destilación del mosto fermentado.

6.3.- BIOQUÍMICA DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

El término “fermentación” es derivado del latín “*fervere*”, que significa hervir; por tanto, la palabra describe la apariencia de la acción de las levaduras sobre extractos de frutas o de granos; dicha apariencia es debida a la producción de burbujas de CO_2 causadas por el catabolismo anaeróbico de los azúcares presentes en el extracto. Sin embargo, la fermentación ha empezado a tener diferentes significados en los procesos para microbiólogos industriales y bioquímicos. Su significado bioquímico relaciona la generación de energía por el catabolismo de compuestos orgánicos, mientras que el significado en microbiología industrial tiende a ser más amplio.

Desde un contexto bioquímico, el catabolismo de los azúcares es un proceso oxidativo que resulta en la producción de nucleótidos de piridina reducidos, los cuales deben ser reoxidados por procesos subsecuentes.

Bajo condiciones aeróbicas, la reoxidación de nucleótidos de piridina ocurre por transferencia de electrones; vía el sistema citocromo, con el oxígeno actuando como aceptor final de electrones. Sin embargo, bajo condiciones anaeróbicas, la reoxidación de los nucleótidos de piridina reducidos está acoplada a la reducción de un compuesto orgánico, el cual es un producto subsecuente de la vía catabólica.

En el caso de la acción de las levaduras sobre las frutas o extractos de granos, el NAD^+ es regenerado por la reducción del ácido pirúvico a etanol; entonces, el término fermentación ha sido usado en sentido bioquímico estricto para definir el proceso de generación de energía en donde un compuesto orgánico actúa como donador y aceptor final de electrones.

6.3.1.- Etanol

La producción de alcohol por la acción de las levaduras se lleva a cabo a gran escala desde hace muchos años y fue el primer proceso industrial para la formación de un metabolito microbiano; sin embargo, la microbiología industrial extiende el término fermentación para describir cualquier proceso para la generación de un producto por la masa de un microorganismo cultivado.

Antecedentes

En la producción del mezcal; durante la fermentación, los microorganismos utilizan los azúcares y otros compuestos del jugo de agave, como sustrato para su crecimiento, transformándolos en etanol, dióxido de carbono, alcoholes superiores y sus ésteres, entre otros compuestos metabólicos que en conjunto determinan las características organolépticas del producto final (Escalante-Minakata *et al.* 2006).

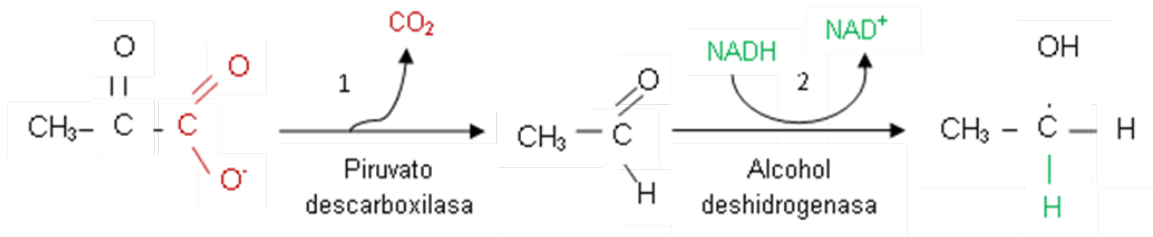


Figura 9.- Síntesis de etanol a partir del piruvato (Voet *et al.* 1999).

En la Fig. 9 se presentan las dos reacciones consecutivas para la síntesis de etanol en las levaduras. En la reacción 1; se lleva a cabo la descarboxilación del piruvato para formar acetaldehído y CO_2 , por acción de la piruvato descarboxilasa que utiliza como cofactor al pirofosfato de tiamina (TPP). En la reacción 2 ocurre la reducción del acetaldehído a etanol, por NADH por efecto de la enzima alcohol deshidrogenasa, regenerándose el NAD^+ para su utilización en la glucólisis por la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Voet *et al.* 1999).

Sin embargo, en el caso del vino no hay fermentación alcohólica pura, debido a que no todas las moléculas de azúcar siguen la ecuación de Gay-Lussac, porque en cierta proporción, son degradadas por la fermentación gliceropirúvica según la ecuación de Neuberg:



En esta reacción, se genera además del ácido pirúvico; glicerol, que eventualmente es descarboxilado a acetaldehído y no reducido a etanol; de tal forma que esta es la vía de generación de diversos productos secundarios que se obtienen en anaerobiosis, tales como el ácido acético, ácido succínico, acetil metil carbinol, 2,3- butanodiol y etanal (Usseglio-Tomasset, 1995).

6.3.2.- Alcoholes superiores

Además del etanol, las levaduras generan alcoholes complejos y de cadena larga, tales como alcohol isoamílico, alcohol amílico, isobutanol, 2-fenil etanol y triptotohol. Estos alcoholes complejos son importantes para el aroma y sabor de todos los productos generados por fermentación por levaduras, confiriéndoles características organolépticas en función de su concentración y de la presencia de otros compuestos volátiles, como los ésteres (Voet *et al.* 1999).

Los alcoholes superiores se originan por la descarboxilación y reducción de los cetoácidos que a su vez se generan por la vía de Ehrlich, o catabólica (Usseglio-Tomasset, 1995), o por la vía anabólica, de la que se obtienen los cetoácidos a partir de la asimilación de los azúcares del medio por la glucólisis (Gschaedler *et al.* 2004).

6.3.3.- Ésteres

Estos compuestos provienen en las bebidas alcohólicas del metabolismo secundario de las levaduras que realizan la esterificación enzimática entre los

alcoholes y los acil-S-CoA, que son las formas activas de los ácidos carboxílicos. El representante principal de este tipo de compuestos es el acetato de etilo, ya que sus precursores; etanol y acetil-CoA son muy abundantes en la fermentación (Gschaedler *et al.* 2004; Fugelsang y Edwards, 2007).

6.3.4.- Compuestos volátiles en las bebidas alcohólicas destiladas de agave

En las bebidas alcohólicas, la mayoría de los compuestos responsables del olor y el sabor son volátiles, y las principales etapas responsables de su producción son las siguientes: procesamiento de la materia prima (cocimiento y molienda en el caso del tequila y del mezcal), fermentación, destilación y maduración. Pero también algunos aromas pueden provenir directamente de la materia prima, como es el caso de la producción de alcoholes superiores provenientes de la catálisis de los aminoácidos contenidos en el jugo de agave (Gschaedler *et al.* 2004).

Con un grado de participación diferente en función de cada uno de ellos, las levaduras están involucradas en la generación de estos compuestos. Es importante mencionar que todos los géneros de levaduras involucrados en la fermentación de mostos para la obtención de bebidas alcohólicas tienen metabolismo semejante y son capaces de producir casi todos los compuestos, aunque la capacidad de producción está más desarrollada en algunas especies que en otras (Gschaedler *et al.* 2004).

Lachenmeier *et al.* (2006) usando cromatografía de iones y cromatografía de gases realizaron el análisis de los compuestos volátiles de bebidas alcohólicas

derivadas de agave (tequila mixto, tequila 100%, bacanora, sotol y mezcal). Describen que no existen diferencias significativas en el contenido de cloruros, oxalato, 1-propanol, 2-butanol y acetato de etilo entre las bebidas. En contraste, el contenido de sulfato, metanol, acetaldehído, 1-butanol, isobutanol, 2-3-metil-1-butanol, 2-feniletanol y lactato de etilo, presentan diferencias significativas según el tipo de bebida analizada.

De León–Rodríguez *et al.* (2006), identificaron 37 compuestos volátiles de 16 muestras de mezcal obtenido a partir de *A. salmiana* que fueron proporcionadas por la Asociación de Productores de mezcal del Estado de San Luís potosí, México. Del total de estos compuestos se clasificaron 9 como compuestos mayoritarios, siendo los más importantes: alcoholes superiores, etil acetato, etil 2-hidroxiopropanoato y ácido acético. Dentro de los compuestos minoritarios, identificaron otros alcoholes, aldehídos, cetonas, etil ester de cadena larga, ácidos orgánicos, furanos, terpenos, alquenos y alquinos. Además encontraron que este producto contiene compuestos únicos, tales como el limoneno y fenilbutanoato, que pueden ser usados como marcadores de autenticidad para los mezcales obtenidos de esta especie de agave.

La misma estrategia de análisis fue utilizada por Escalante-Minakata *et al.* (2006) para estudiar la composición de mezcales comerciales producidos en la región de denominación de origen que abarca a los estados de Durango, San Luís Potosí, Zacatecas, Guerrero y Oaxaca, y encontraron resultados muy semejantes a los mencionados en el trabajo anterior.

6.4.- ECOLOGÍA DE LAS LEVADURAS

6.4.1.- Clasificación taxonómica

Las levaduras representan un grupo de hongos filogenéticamente diverso, que se divide en los Phylum Ascomycota y Basidiomycota (Kurtzman y Fell, 1998; Deak, 2009).

El Phylum Ascomycota, gracias a la introducción de análisis filogenéticos de secuencias moleculares ha sido dividido en los últimos años en tres Clases taxonómicas: Archiascomycetes, Euascomycetes y Hemiascomycetes (Kurtzman, 1998). Las levaduras ascomicetes se ubican en la Clase Hemiascomycetes y se caracterizan porque sus ascas no están incluidas en un ascocarpo o cuerpo fructífero y se dividen por gemación o fisión binaria. Esta Clase está formada por el Orden taxonómico Saccharomycetales Kudryavtsev, que a su vez está compuesto por 11 familias (Kurtzman, 1998).

En lo que respecta al Phylum Basidiomycota Boekhout *et al.* (1998), refieren que los organismos que presentan una fase o estado de levadura, pertenecen a los heterobasidiomycetes dimórficos, y el término “levadura” o “estado de levadura” se aplica a la fase de gemación unicelular en el ciclo de vida de estos hongos. En algunas especies pueden ocurrir estados de levadura dicarióticas, aneuploides y diploides; y muchos taxa anamórficos son conocidos solamente como “levaduras”, mientras que en las levaduras teleomórficas el estado filamentoso puede estar limitado en cultivo.

Al igual que los hongos filamentosos, las levaduras son saprofitas, y crecen en ambientes que contienen una fuente simple de carbono. Entre los ambientes de levaduras se han descrito a los cactus en descomposición, el agua marina y dulce, como parásitos de insectos, los suelos, los bosques, y ambientes extremos, como es el caso de *Debaryomyces* y *Zygosaccharomyces*, que sobreviven en un rango de pH de 0.65 a 0.85 y *Metschnikowia*, a pH mayor de 9 (Deak, 2009); pero también se han descubierto especies nuevas y especies conocidas en hojas, escarabajos, abejas, encurtidos, corcho y bebidas suaves. Los análisis de levaduras en ambientes no explorados, como en diferentes grupos de insectos y otros invertebrados, aumentará considerablemente el número de especies (Lachance y Starmer, 1998).

De acuerdo con lo anterior, las levaduras no se encuentran distribuidas al azar en la naturaleza. Forman comunidades de especies que pueden ser definidas por su hábitat, y por los nichos de sus especies componentes (Deak, 2009).

Contrariamente a la creencia general, de las más de mil especies de levaduras que han sido descritas, aproximadamente la mitad no son capaces de fermentar; aunque muchas de ellas tienen un papel biotecnológico significativo. (Deak, 2009).

6.4.2.- Levaduras en los productos fermentados

En la fermentación de productos lácteos y cárnicos, las levaduras son solamente secundarias a las bacterias ácido lácticas. En la fermentación alcohólica de varias bebidas, además del vino, las levaduras juegan un papel significante. En muchas

de ellas, por ejemplo sidra, sake, tequila, ron, etc., además de *S. cerevisiae*, otras levaduras pueden dominar respecto al desarrollo de sabor y aroma característicos (Romano et al. 2003; Deak, 2009).

En años recientes, la rica y variada microbiota participante en varios alimentos y bebidas fermentadas ha sido sujeta a estudios detallados, y se han encontrado que algunas especies pueden ser utilizadas como adyuvantes para mejorar la calidad del producto.

El consorcio *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* se ha encontrado en granos de kefir (un producto lácteo fermentado originario de las Montañas Caucásicas), en fuerte asociación simbiótica con bacterias ácido lácticas (Deak, 2009).

Las levaduras juegan un papel vital en la producción de muchos alimentos fermentados tradicionales alrededor del mundo. En todos los casos estudiados, la composición de la microflora relacionada con los procesos depende de factores tales como: región de origen de la materia prima, procedimiento de elaboración del producto, concentración inicial de levaduras, temperatura y concentración de etanol. (Romano et al. 2006).

Los géneros de levaduras asociados con la fermentación de alimentos y bebidas son principalmente *Brettanomyces* (su estado asexual, *Dekkera*), *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Galactomyces*, *Geotrichum*, *Hansenula*, *Hanseniaspora* (su contraparte asexual *Kloeckera*), *Hyphopichia*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*,

Saccharomycopsis, *Schizosaccharomyces*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Yarrownia* y *Zygosaccharomyces* siendo esto demostrado también en estudios sobre ecología microbiana de productos tales como el pozol (Ben Omar y Ampe, 2000), granos de café (Masoud *et al.* 2004), salami y salchichas italianas (Rantsiou *et al.* 2005, Rantsiou y Cocolin, 2006, Cocolin *et al.* 2006, Aquilanti *et al.* 2007; Cocolin *et al.* 2011), vino (Cocolin *et al.* 2001, Hesham *et al.* 2006, Renouf *et al.* 2007, Divol *et al.* 2006, Di Maro *et al.* 2007) y otras bebidas fermentadas como las derivadas de agave (Lachance 1995; Escalante-Minakata *et al.* 2008).

Durante la vinificación, se pueden encontrar diferentes levaduras, de las cuales las más comunes son *Saccharomyces*, *Brettanomyces* y *Pediococcus*. Sin embargo, en el transcurso del procesamiento se presenta un desarrollo secuencial de microorganismos.

En general, las levaduras no-*Saccharomyces* se desarrollan al inicio del proceso fermentativo y son gradualmente sustituidas por levaduras *Saccharomyces*, que son las que terminan la fermentación alcohólica (Fugelsang y Edwards, 2007).

Se han realizado varios estudios para conocer la población de levaduras con un énfasis especial sobre las levaduras no-*Saccharomyces*. En un estudio realizado en Argentina fueron aisladas 11 especies por Combina *et al.* (2005). González *et al.* (2006) en España, encontraron 27 especies con un alto número de *Candida* y *Pichia*. Zott *et al.* (2008) encontraron 19 especies de levaduras en el proceso de elaboración de vino en Francia, el cual incluye una maceración en frío

antes de la fermentación; *H. uvarum* y *C. zemplinina* fueron las levaduras predominantes. Ocón *et al.* (2010) encontraron que en vinos provenientes de cuatro bodegas de la región de Rioja, en España; las levaduras no-*Saccharomyces* predominantes pertenecían a los géneros *Cryptococcus* y *Pichia*.

6.4.3.- Levaduras en las bebidas alcohólicas derivadas de agave

Al igual que en vino, en los procesos de fermentación de bebidas derivadas de *Agave* intervienen levaduras del género *Saccharomyces* y levaduras de otros géneros es decir no-*Saccharomyces*, así como algunas especies de bacterias lácticas (Pretorius 2000; Lachance 1995; Lappe *et al.* 2004; Gschaedler *et al.* 2004; Flores Berrios *et al.* 2005).

En cuanto al estudio de las poblaciones a lo largo de la fermentación en bebidas derivadas de agave, Lappe-Oliveras y Moreno-Terrazas (En prensa) proporcionaron un listado de estudios realizados en pulque que datan desde 1864 cuando Río de la Loza reportó la primera observación microscópica de ésta bebida encontrando bacterias y levaduras; más recientemente se han realizado estudios que caracterizan la microbiota de levaduras (Estrada-Godina *et al.* 2001) y la diversidad bacteriana en pulque (Escalante *et al.* 2004).

Lachance (1995) mediante los métodos estándar para identificación de especies de van der Walt y Yarrow, reportó que durante los dos primeros días de la fermentación se encontraron 14 especies de levaduras: *Candida intermedia*, *C. krusei*, *C. milleri*, *Candida spp.*, *Brettanomyces anomalus*, *B. bruxellensis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia membranifaciens*, *Torulaspota delbrueckii*,

Antecedentes

Hanseniaspora spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Z. rouxii*. Conforme avanzó el proceso de fermentación se redujo el número de especies. En la etapa final de la fermentación, *S. cerevisiae* fue la especie predominante, aunque también estuvieron presentes *P. membranifaciens* (formando una película sobre los tanques de fermentación), *B. bruxellensis*, *C. milleri* y *Z. bailii*. Además de las levaduras, al inicio de la fermentación se detectaron bacterias lácticas de los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus* y en la fase avanzada de la fermentación se observó la formación de una capa superficial constituida por *Acetobacter aceti*.

En una fermentación de mezcal en Oaxaca, Andrade-Meneses y Ruiz-Terán (2004) señalaron la predominancia de especies de *Candida*. Por su parte, Escalante-Minakata *et al.* (2008) reportaron la identificación de *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia fermentans* y *Clavispora lusitaniae*, en la mezcalera “La Perla” en el Estado de San Luís Potosí, mediante el análisis RFLP de la región ITS-5.8S, con la enzima de restricción HaeIII.

Lappe *et al.* (2008) realizaron una revisión sobre la microbiota presente en diversas bebidas derivadas de *Agave* en varias regiones de México. Reportaron que en estas bebidas; tanto destiladas como no destiladas, los microorganismos se pueden agrupar en bacterias y levaduras. Señalan que en el caso de las levaduras se han encontrado especies no-*Saccharomyces* (*Candida* spp, *C. parapsilosis*, *C. magnolia*, *Clavispora lusitaniae*, *Hanseniaspora uvarum*, *H. guillermondii*, *H. vineae*, *K. marxianus*, *K. lactis*, *P. membranifaciens*, *Pichia* spp., *P.*

fermentans, *P. caribbica*, *P. guillermondii*, *T. delbrueckii* y *Debaryomyces hansenii*) y *Saccharomyces* (*S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*).

6.5.- IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS POR TÉCNICAS MOLECULARES

6.5.1.-Técnicas moleculares dependientes de cultivo para la identificación de especies.

6.5.1.1.- Análisis del polimorfismo de la Longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

El estudio del Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP por sus iniciales en inglés) se ha empleado con el fin de identificar a las levaduras a nivel de especie (Esteve-Zarzoso *et al.* 2001; Las Heras-Vazquez *et al.* 2003; Masneuf *et al.* 1998; Capello *et al.* 2004; Cadez *et al.* 2003; Dias *et al.* 2003). Este método se basa en el análisis de los patrones de restricción generados por la amplificación de los dos espaciadores internos de transcripción (ITS1 e ITS2) que flanquean al gen ribosomal 5.8S. Estas son dos regiones no-codificantes que muestran baja variabilidad intraespecífica y alto polimorfismo interespecífico (Guillamón *et al.* 1998), que están presentes en todos los organismos y no están sujetas a transferencia horizontal (Boundy-Mills, 2005).

La amplificación de la región ITS, usando los cebadores ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), han permitido seleccionar aislados que presentan una banda simple de peso molecular

característico de distintas cepas, permitiendo la identificación y clasificación de las levaduras por la digestión posterior con enzimas de restricción tales como Hae III, Cfo I e Hinf I (Capello *et al.* 2004), entre otras.

Una aplicación importante de esta técnica es que también puede ser usada para determinar el desarrollo secuencial de levaduras, como lo reportan Combina *et al.* (2005) en su estudio sobre vinos argentinos.

6.5.1.2.- Secuenciación de la región D1/D2 del gen ribosomal 26S.

Otras zonas importantes para efecto de identificación de especies son las regiones D1/D2 localizadas en el extremo 5' del gen 26S del ADNr, que pueden ser analizadas por secuenciación (Dahllöf, 2000, Fell *et al.* 2000). Esta es una región de aproximadamente 600 pb con una variabilidad suficiente para identificar especies de levaduras, como lo evidencian los estudios sobre identificación y filogenia de ascomicetos y basidiomicetos (Kurtzman y Robnett, 1998; Fell *et al.* 2000). En este proceso, el dominio D1/D2 es amplificado partiendo del ADN total. Los productos de la amplificación son purificados usando kits comerciales para eliminar los cebadores y el exceso de deoxinucleótidos que pudieran interferir con la reacción de secuenciación (Fernández-Espinar *et al.* 2006).

**6.5.2.- Técnicas dependientes de cultivo para la caracterización
a nivel de cepas**

**6.5.2.1.- Electroforesis de cromosomas en campo pulsado
(PFGE)**

El PFGE es una herramienta usada en la taxonomía de levaduras y es común en el control de calidad de la industria de la fermentación. Para la obtención de los datos se usa una cámara de electroforesis de campo pulsado, que permite aislar y examinar la segregación del cariotipo.

El campo pulsado es un sistema de pulsos eléctricos con una duración de 1 a 90 s, generados alternadamente a partir de electrodos orientados de forma perpendicular en la cámara de electroforesis (Schwartz y Cantor, 1984). Las condiciones de corrimiento como son el tiempo y la frecuencia del pulso se ajustan para que la separación de los cromosomas sea eficiente, según su longitud. Las levaduras se desarrollan en medio líquido y se combinan con una solución de agarosa, la mezcla se deposita en pequeños moldes para la formación de bloques (plugs) que se someten a un tratamiento enzimático con el fin de que el ADN quede liberado dentro de los bloques de agarosa, los cuales son insertados en un gel también de agarosa y sometidos al campo eléctrico (Fernández-Espinar *et al.* 2001).

Numerosos autores han utilizado esta técnica para evaluar la diversidad de especies involucradas en procesos fermentativos de alimentos y bebidas, así como en estudios taxonómicos (Guerra *et al.* 2001; Esteve-Zarzoso *et al.* 2001;

Kusiluka *et al.* 2001; Cadez *et al.* 2002; Martínez *et al.* 2004; Jespersen *et al.* 2005; Antunovics *et al.* 2005; Divol *et al.* 2006) demostrando su eficiencia para la caracterización de especies de *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera* y *Pichia membranifaciens* por el polimorfismo que las distintas cepas exhiben, posiblemente debido a la recombinación entre cromosomas homólogos de diferentes tamaños, generándose productos que pueden migrar a diferentes posiciones relativas respecto a una banda parental.

Guerra *et al.* (2001) en su trabajo sobre la diversidad genética de cepas de *S. cerevisiae* aisladas de cachaça en Brasil, reportan que se han evidenciado deleciones, duplicaciones y translocaciones así como la presencia de un número variable de cromosomas en una especie y sugieren que esta diversidad podría deberse a las características únicas del proceso fermentativo en cuestión. Aunque es eficiente para evidenciar diferenciación intraespecífica, el tiempo que se debe de invertir en el procesamiento de las muestras podría ser un factor limitante para su aplicación generalizada.

6.5.2.2.- El análisis del polimorfismo de los fragmentos de ADN amplificados aleatoriamente (RAPD)

Los RAPDs (Williams *et al.* 1990), se basan en la amplificación aleatoria de secuencias a lo largo del genoma. Los cebadores se escogen al azar, por lo que no es necesario contar con información sobre secciones específicas del microorganismo a tipificar. Se utilizan temperaturas de alineamiento bajas, de

manera que se obtengan productos de PCR que permitan el alineamiento de los cebadores, a pesar de que una o dos bases no coincidan.

Después de la electroforesis en geles de agarosa se obtienen patrones simples de fragmentos de ADN de distintos tamaños. Sin embargo esta técnica es muy sensible a las condiciones de reacción, por lo que es difícil la reproducibilidad entre laboratorios (Díaz y Wachter, 2003; Fernández-Espinar *et al.* 2006). Esta técnica se ha utilizado para conocer la diversidad genética de levaduras en diferentes productos fermentados, como salchichas italianas (Gardini *et al.* 2001; Cocolin *et al.* 2006), productos lácteos (Vasdinyei y Deák, 2003), cerveza (Barszczewski y Robak, 2004), así como para evaluar la diversidad genética entre las especies del complejo *Saccharomyces sensu stricto* y para deducir que el origen de la especie híbrida *S. pastorianus*, se debe a la hibridación entre *S. cerevisiae* y *S. bayanus* (Fernández-Espinar *et al.* 2003).

6.5.2.3.- Microsatélites y Minisatélites

Los micro y mini satélites son secuencias simples repetidas (SSR, por sus iniciales en inglés) que consisten en repeticiones directas en tándem que constituyen motivos cortos a lo largo del genoma. Los motivos de los microsatélites tiene una longitud de menos de 10 pares de bases (pb), mientras que los segundos pueden medir entre 10 y 100 pb. Estas secuencias pueden ser utilizadas como marcadores moleculares debido a que muestran gran variabilidad en su longitud (González-Techera *et al.* 2001; Fernández- Espinar *et al.* 2006).

Las cepas de *S. cerevisiae* han sido objeto de tipificación con este tipo de marcadores moleculares, como lo reportan Hennequin *et al.* (2001) que estudiaron el polimorfismo de microsatélites como herramienta de identificación de cepas de *S. cerevisiae* causantes de infección probando siete regiones polimórficas, las levaduras fueron aisladas de laboratorios, de la industria de panificación colectadas de diferentes países y cepas aisladas de pacientes de instituciones hospitalarias Europeas, se estudiaron siete motivos, cinco constaron de tres nucleótidos repetidos hasta 13 veces y dos motivos de dos nucleótidos repetidos 15 y 31 veces cada uno.

Pérez *et al.* (2001) estudiaron cepas aisladas de mosto de uva y vinos españoles, producidos en la región de Denominación de origen “Vinos de Madrid” y encontraron que los motivos que se repiten más comúnmente en estas cepas son AT, AAT y AAC con 124, 37 y 26 secuencias repetidas respectivamente, y más recientemente Jubany *et al.* (2008) propusieron una metodología estandarizada para reportar datos del análisis del polimorfismo de cepas argentinas de *S. cerevisiae* por microsatélites de cuatro diferentes motivos.

6.5.2.4.- Análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción amplificados (AFLP)

El análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción amplificados (AFLPs, por sus iniciales en inglés) (Vos *et al.* 1995) es aplicable universalmente, y los patrones pueden ser fácilmente almacenados en una base de datos como mencionan Meudt y Clarke (2007). En su publicación, estos mismos

autores reportan que la técnica de AFLP supera a las técnicas de RAPDs y de ISSRs en reproducibilidad, robustez, información generada y poca interferencia en las reacciones de PCR, lo anterior ha sido reportado también por otros autores (Restrepo *et al.* 1999; Flores-Berrios *et al.* 2005; Qin *et al.* 2007).

Esta técnica se ha considerado como adecuada para la caracterización de levaduras, debido a su poder discriminatorio (Díaz y Wachter, 2003; Reijans *et al.* 2003; Meudt y Clarke, 2007). Se realiza en tres etapas, A) Restricción del ADN y ligamiento de adaptadores. La restricción se realiza con dos enzimas que producen extremos cohesivos; a estos se ligan adaptadores, que son oligonucleótidos cortos que funcionarán como los sitios de alineamiento de algunos cebadores. B) Amplificación selectiva de algunos de los fragmentos de restricción. Se usan dos cebadores diferentes conteniendo la misma secuencia que los adaptadores más varias bases contiguas al sitio de restricción; se usan condiciones estrictas, de manera que se amplifiquen únicamente los fragmentos en los que los extremos del cebador coinciden exactamente con los nucleótidos adyacentes al sitio de restricción. C) Separación de los fragmentos en geles (Díaz y Wachter, 2003; Borst *et al.* 2003).

La ventaja del análisis de AFLP es que solamente se requiere de una cantidad limitada de ADN debido a que los fragmentos son amplificados por PCR. Además, como se usan temperaturas de alineamiento que van disminuyendo a intervalos cortos de tiempo durante la amplificación, la técnica es más reproducible y robusta que otras, tales como el análisis de RAPD-PCR (Meudt y Clarke, 2007). Un ejemplo del empleo de ésta técnica en epidemiología fue el trabajo de Kusiluka

et al. (2001) para determinar el origen de cepas de *Mycoplasma mycoides* causantes de pleuroneumonía bovina en Tanzania. Se ha aplicado en estudios de levaduras, como el realizado por Flores Berrios *et al.* (2005), quienes detectaron el polimorfismo del ADN, y determinaron la diversidad genética entre levaduras aisladas de bebidas mexicanas destiladas de agave y de mostos de uva de regiones de Italia y de Sudáfrica, encontrando que existe diferencia genética entre cepas de *Kloeckera*, aisladas de vino tinto del sur de Italia y de tequila en Jalisco; cepas de *Candida*, aisladas de Sotol de Chihuahua y mezcal de Guerrero, y cepas de *Saccharomyces* aisladas de vino tinto de dos regiones del sur de Italia, de tequila y de raicilla de Jalisco y de vinos de Sudáfrica, tal diferencia

6.5.2.5.- Análisis de restricción del ADN mitocondrial

En la levadura *S. cerevisiae*, el ADN mitocondrial (ADNmt) es una pequeña molécula de entre 65 y 80 Kb, con un alto grado de polimorfismo que puede ser evidenciado por análisis de restricción (Fernández-Espinar *et al.* 2006). Para la obtención del ADNmt es necesario utilizar gradientes de cloruro de cesio y ultra centrifugación, lo cual hace la aplicación de esta técnica complicada para el análisis a nivel industrial (Querol y Barrio, 1990). Sin embargo, Querol *et al.* (1992), propusieron una técnica para monitorear el desarrollo de *S. cerevisiae* durante la fermentación de vino en Alicante, España.

Utilizando las enzimas de restricción *RsaI* e *HinfI*, que reconocen sitios GCAT, los cuales son abundantes en el ADN genómico y escasos en el ADNmt, por lo que al realizar una electroforesis en gel de agarosa, los fragmentos de

restricción del ADNmt se ubicaron en la porción superior del gel, seguidos de un barrido del ADN nuclear extensamente digerido, con esto se evita el uso del gradiente de cloruro de cesio y la ultra centrifugación, haciendo el análisis más aplicable a nivel industrial. Fernández-Espinar *et al.* (2006) hace referencia a otros investigadores que han empleado este análisis para el estudio de cepas de *D. hansenii*, *S. cerevisiae*; *K. lactis*; *K. marxianus*, *Z. bailii* y *Z. rouxii* aisladas de vinos y otras fuentes.

6.5.3.- Técnicas de identificación independientes de cultivo

6.5.3.1.- PCR en tiempo real

Llamada también PCR cuantitativa, ésta técnica ha sido desarrollada para detectar y cuantificar el número total de varias bacterias y levaduras en alimentos, sin que éstos se hayan sometido a un cultivo en placa (Hierro *et al.* 2006). En la PCR en tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección de fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores para llevar a cabo la PCR a tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación.

Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en estos equipos pueden ser de dos tipos; agentes intercalantes y las sondas de hibridación

específicas; de los primeros, el más empleado es el SYBR Green I, y de las segundas, las más empleadas son las sondas de hidrólisis (Costa, 2004).

Por medio de ésta técnica se ha logrado cuantificar las levaduras totales en una muestra de vino, mediante el diseño de cebadores universales basados en los dominios D1/D2 del gen de ARNr 26S, que como se ha mencionado antes, es una de las pocas secuencias disponibles para todas las especies de levaduras conocidas (Hierro *et al.* 2006; Divol *et al.* 2006). Otros autores han partido de secuencias diferentes para el diseño de sus cebadores (Gibson *et al.* 1996; Bleve *et al.* 2003, Delaherche *et al.* 2004; Hierro *et al.* 2007).

Hasta el momento no existen trabajos publicados que utilicen esta herramienta para establecer la dinámica microbiana, pero, sí se ha utilizado para estudiar la expresión de genes, y detectar microorganismos contaminantes en alimentos y vinos (Bleve *et al.* 2003; Hein *et al.* 2001; Phister y Mills, 2003, Neeley *et al.* 2005).

6.5.3.2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente de desnaturalización (DGGE) y de temperatura (TGGE).

Estas técnicas se han empleado para conocer la estructura de las comunidades microbianas complejas; es decir, se obtiene una “huella digital” de la diversidad de especies en una muestra, sin necesidad de un aislamiento previo de los microorganismos (Ben Omar y Ampe, 2000; Cocolin *et al.* 2002; Díaz y Wachter, 2003; Fernández-Espinar *et al.* 2006; Boundy-Mills, 2006; Kim *et al.* 2009).

El fundamento de la técnica se basa en la separación por electroforesis de fragmentos de ADN parcialmente desnaturalizados, que tienen menor movilidad que los fragmentos completamente helicoidales, estos amplicones tienen la misma longitud pero poseen diferentes secuencias de bases (Muyzer et al. 1993). La desnaturalización es en función del número de variaciones en sus secuencias de bases, de tal manera que fragmentos con diferentes grados de fusión o desnaturalización, producirán bandas en diferentes posiciones en el gel. Los agentes desnaturalizantes son una mezcla de urea y formamida en el caso del DGGE y la temperatura en el caso del TGGE (Díaz y Wachter, 2003).

Para crear dominios de alto punto fusión y evitar la separación completa de las dos cadenas, se une una secuencia rica en GC (que requiere condiciones más drásticas para desnaturalizarse), llamada grapa-GC, en el extremo 5' de uno de los cebadores, que se amplifica junto con el segmento del ADN (Fernández-Espinar *et al.* 2006). Teóricamente, cada banda representa a un microorganismo diferente, sin embargo se ha reportado la presencia de bandas múltiples de un solo microorganismo debido a heterogeneidad intragenómica en muchas especies de bacterias y en la levadura *Clavispora lusitaniae* (Boundy-Mills 2006).

Esta técnica detecta el 90-99% de las especies de una comunidad sin discriminar a las células vivas activas, de las vivas en estado no cultivable. Meroth *et al.* (2003) utilizaron los cebadores U1 y U2, ligando el cebador U1 a los adaptadores GC, para amplificación del fragmento 28S del ADNr, los amplicones generados a partir de las cepas tipo de levaduras representativas o conocidas se usan para diferenciar de acuerdo a la distancia de migración en el gel. Divol *et al.*

Antecedentes

(2006), emplearon la técnica para analizar el locus RDN1 que codifica para las regiones D1-D2 localizadas en el extremo 5' del gen 26S del rARN y caracterizar las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* responsables de la refermentación de vinos dulces.

7.- MATERIALES Y MÉTODOS

7.1.- MUESTREO

Los muestreos se realizaron en la mezcalera Ex-Hacienda “Laguna Seca”, localizada en el Municipio de Charcas del Estado de San Luís Potosí, México; cuyas coordenadas geográficas son 23° 08' de latitud norte, 101° 07' de longitud oeste y altitud de 2010 msnm. Colinda al norte con los municipios de Santo Domingo y Catorce; al este con los municipios de Catorce y Villa de Guadalupe; al sur con los municipios de Venado y Salinas; al oeste con los municipios de Salinas y Santo Domingo (INEGI, 2009) (Fig. 10).

El muestreo se realizó en marzo del 2009, a partir de diferentes lugares de la fábrica: en el “lavadero” que es un contenedor en donde se colocan las piñas cocidas después de la molienda y se adiciona agua para extraer el máximo contenido de miel, el “tanque de inóculo”, en el “jugo antes de la inoculación” y a lo largo de dos procesos de fermentación (fermentación 1 y 2) con el fin de cumplir con el esquema de trabajo propuesto en la Fig. 11.

Para la realización de los análisis por métodos independientes de cultivo y para la aplicación de los métodos analíticos; las muestras fueron colectadas en tubos de 10 mL y congeladas a -20°C hasta su procesamiento.

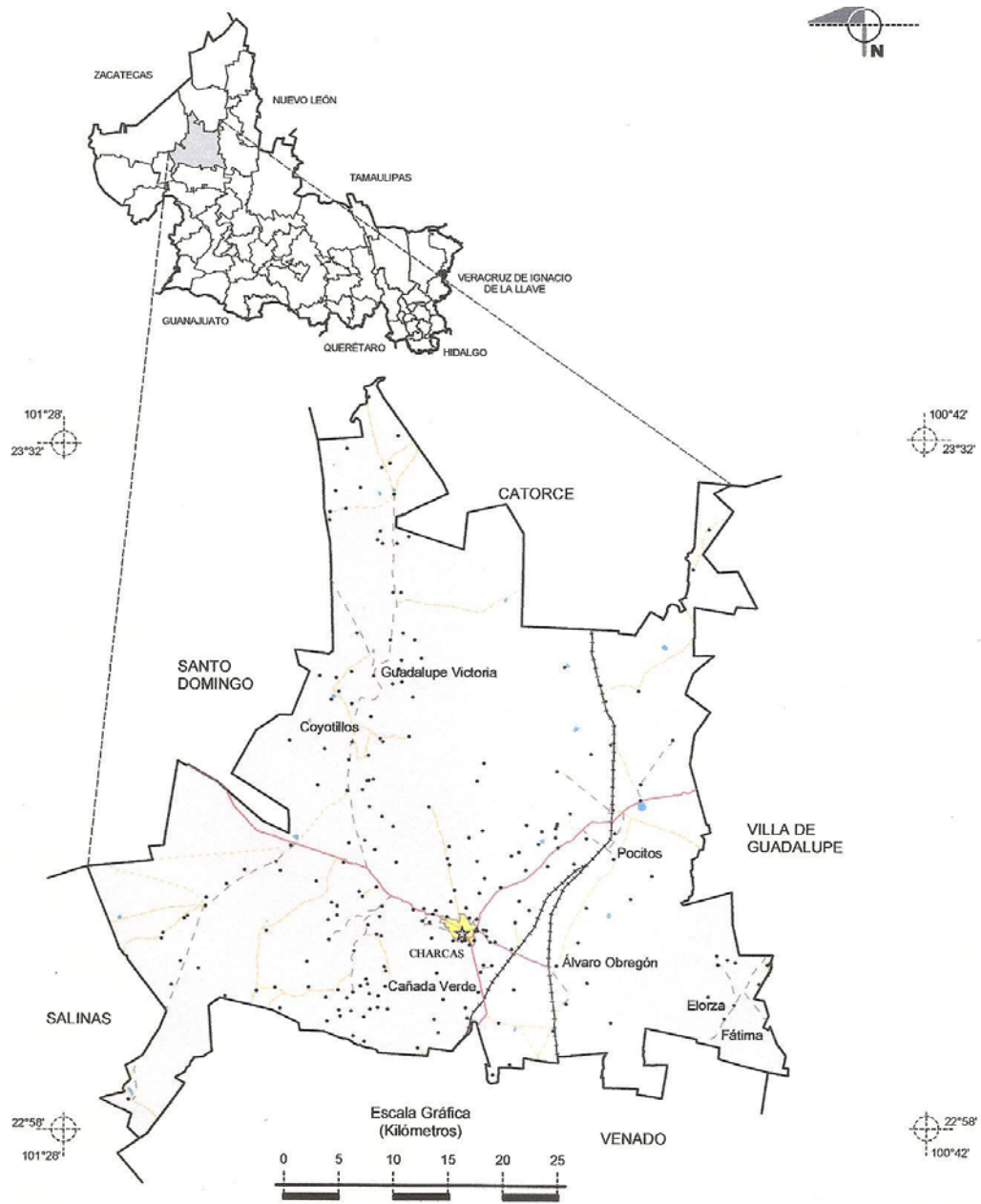


Figura 10.- Ubicación geográfica de la mezcalera Laguna Seca, Municipio de Charcas, San Luis Potosí, México. (INEGI, 2009).

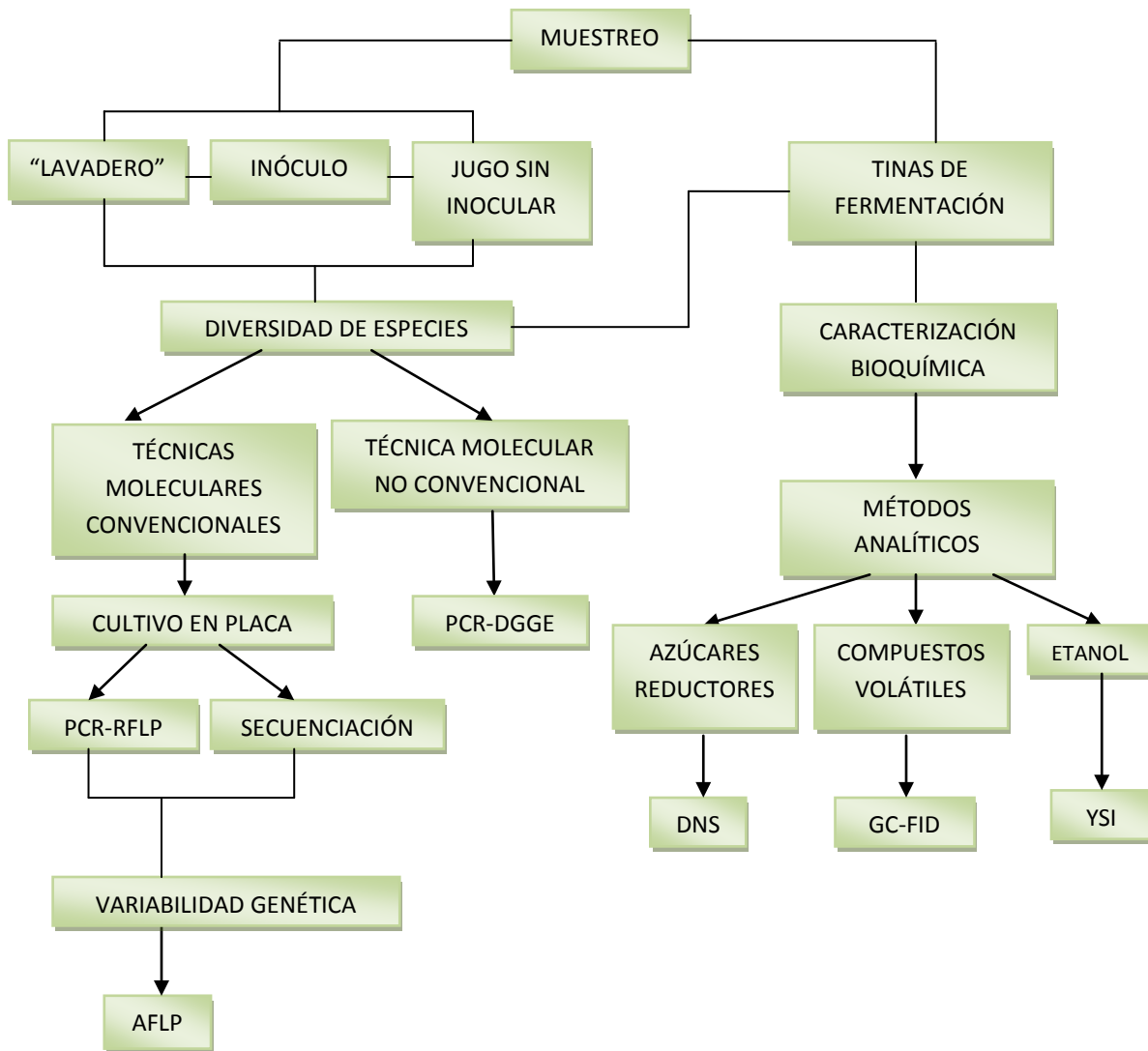


Figura 11.- Esquema de trabajo para la realización de la caracterización de las levaduras involucradas en el proceso fermentativo del mezcal.

7.2.- IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE LEVADURAS

7.2.1.- Medios de cultivo

Se utilizaron diferentes medios de cultivo durante el desarrollo del trabajo, para las diversas etapas de la investigación (Cuadro 1); el agar Wallerstein Laboratory (WL) 17222 de Fluka se utilizó para la etapa de aislamiento en placa durante el muestreo en la fábrica, siguiendo las instrucciones del fabricante, el medio YPD (Extracto de levadura, Peptona, Dextrosa, por sus siglas en inglés), fue utilizado para la conservación y proliferación de las colonias de levadura durante los experimentos de variabilidad genética y el medio JA (Jugo de Agave) se empleó durante la etapa de fermentaciones controladas en matraz. Los dos últimos medios de cultivo se prepararon mezclando sus componentes individuales, y en todos los casos la disolución se realizó en agua destilada y fueron esterilizados a 121 °C por 15 minutos en autoclave, para ser vaciados posteriormente en cajas de cultivo de 90 X 15 mm, en el caso del agar WL y en cajas de 60 x 15 mm, el agar YPD; el medio JA se utilizó en los mismos matraces en los que se esterilizaron, conservándose en refrigeración hasta su uso. Así mismo, en los tres medios de cultivo se añadió 0.01% de cloranfenicol para inhibir el crecimiento de bacterias, que fue previamente disuelto en etanol al 96% cuando la temperatura de los medios estuvo alrededor de 40 °C después de la esterilización.

Materiales y métodos

Cuadro 1.- Formulación de los medios de cultivo utilizados en las diferentes etapas del trabajo. Abreviaturas: WL, Wallerstein Laboratory; YPD, Extracto de levadura-Peptona-Dextrosa (por sus siglas en inglés) y JA, Jugo de Agave cocido.

	WL		YPD		JA
Hidrolizado enzimático de caseína	5 g/L	Extracto de levadura	10 g/L	Jugo de <i>A. salmiana</i> con una concentración final de azúcar de 20 g/L	
Extracto de levadura	4 g/L	Dextrosa	20 g/L	Sulfato de amonio	1 g/L
Dextrosa	50 g/L	Bactopeptona	20 g/L		
Fosfato de monopotasio	0.55 g/L	Agar	20 g/L		
Cloruro de calcio	0.125 g/L				
Sulfato de magnesio	0.0025 g/L				
Cloruro férrico	0.0025 g/L				
Verde de bromocresol	0.22 g/L				
Agar	20 g/L				
pH final	5.5 ± 0.2		4.7 ± 0.2		4.5 ± 0.2

7.2.2.- Aislamiento en placa

Se realizó un conteo directo al microscopio con una cámara de Neubauer, para determinar la dilución en la que se obtuvieran aproximadamente 100 colonias aisladas. 100 µL de dichas diluciones se sembraron por dispersión con varilla acodada en cajas con agar WL suplementado con 0.01% de cloranfenicol, y se incubaron a 29°C durante 3 a 5 días para el desarrollo de las colonias.

7.2.3.- Extracción de ADN total a partir de muestras de mosto

Este método se implementó siguiendo las instrucciones del kit MasterPure Yeast Purification (Epicentre Biotechnologies). Para la extracción del ADN total se

Materiales y métodos

centrifugó 1 mL de mosto por cinco minutos a 13,000 rpm, el sobrenadante se retiró con una micropipeta y se resuspendió el botón precipitado en 500 μ L de buffer de sorbitol (sorbitol 1 M, EDTA sódico 100 mM, β -Mercaptoetanol 14 mM) al que se agregaron 40 μ L de liticasa (5000 U/ μ L) y se incubó a 37° C por 30 minutos. La preparación se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 mL de solución salina fisiológica para después centrifugarlo a 12,000 rpm durante 5 minutos y retirar el sobrenadante. Se añadieron 300 μ L de solución de lisis celular para levaduras (del kit) y se agitó la mezcla en vortex hasta homogeneizar la solución que se incubó a 65 °C durante 15 minutos y posteriormente los tubos se colocaron en hielo por 5 minutos. Se agregaron 150 μ L de reactivo de precipitación de proteínas MPC (del kit) y el tubo se centrifugó por 10 minutos a 12,000 rpm transfiriéndose el sobrenadante a un tubo limpio, al cual se agregaron 100 μ L de polivinilpirrolidina (PVP) al 10 % y se agitó en Vortex durante 10 minutos. El tubo se centrifugó por 5 minutos a 12000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio al que se añadieron 100 μ L de isopropanol frío y se mezcló por inversión para posteriormente centrifugarlo a 12,000 rpm a 4 °C, durante 10 minutos y desechar el sobrenadante. Al botón obtenido se añadieron con 500 μ L de etanol al 70% y se centrifugó por 1 minutos a 12,000 rpm para eliminar al máximo el etanol. Se dejó evaporar el etanol a temperatura ambiente y se resuspendió el botón en 35 μ L de TE 1X (Tris-HCl a pH 8, 10 mM; EDTA a pH 8, 1 mM y NaCl, 10 mM) o de agua ultrapura estéril para almacenar a 4 °C hasta su utilización

7.2.4.- Extracción de ADN total de levaduras a partir de colonias aisladas.

Este método se realizó según Tapia-Tussell *et al.* (2006) a partir de colonias de levaduras aisladas sobre placas de agar YPD, que fueron sembradas por estrías e incubadas a 29 °C por 24-48 horas. Las colonias fueron resuspendidas con 1 mL de agua destilada estéril y se colectaron de 250 a 300 μ L de la suspensión celular que se centrifugó por 5 minutos a 13,000 rpm hasta obtener una pastilla de aproximadamente 0.05 mL que se resuspendió en agua destilada estéril y se mezcló con 0.15 mg de perlas de vidrio estériles de 0.5 mm de diámetro. La mezcla se agitó en Vortex a alta velocidad por 5 minutos y se congeló a -80 °C por 10 minutos, posteriormente se descongeló a 65 °C durante tres minutos y se agitó nuevamente en Vortex. Se transfirieron 300 μ L de la suspensión celular a dos tubos limpios de 1.5 mL y se adicionaron 800 μ L de buffer de lisis (Tris base, 50 mM; NaCl, 250 mM; EDTA pH 8, 50 mM; SDS 0.3 %w/v y 5 mL de RNAsa (Sigma) por cada 1 mL de buffer antes de su uso); la mezcla se incubó a 65 °C, y al cabo de este tiempo se añadieron 500 μ L de cloroformo y se centrifugó por 10 minutos a 13,000 rpm. Se colectaron 700 μ L de la capa superior acuosa, que fueron depositados en un tubo limpio de 1.5 mL al que se añadieron 700 μ L de isopropanol frío, se agitó suavemente por inversión y se incubó por 10 minutos a -80 °C. Enseguida se centrifugó a 13,000 rpm durante cinco minutos descartándose el sobrenadante. La pastilla de ADN obtenida se lavó, añadiendo 500 μ L de etanol frío al 70% y centrifugándose a 13,000 rpm durante cinco minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar a temperatura

ambiente durante una hora con el tubo invertido sobre papel absorbente para finalmente resuspender la pastilla de ADN en 50 mL de buffer TE 1X.

Después de la extracción, las muestras se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) al 1% disuelta en buffer TAE 1X (Tris base, 40 mM; Ácido acético glacial, 20mM y EDTA al 0.5 M a pH 8, 1mM) conteniendo 3 mL de bromuro de etidio (10 mg/mL). Se depositaron en las cavidades del gel 5 μ L de muestra mezclados con 2 μ L de buffer de carga para electroforesis 6X (Xylen cianol, 0.25%; azul de bromofenol, 0.25%; glicerol, 30% y TAE 10X, 10%) y el corrimiento se realizó a 80 V por 50 minutos en una cámara de electroforesis Wide Mini-Sub Cell GT System (BioRad) y las Bandas se visualizaron bajo luz UV con un transiluminador GelDoc (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

7.2.5.- Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de la región 5.8S-ITSs.

Las levaduras se colectaron directamente por picadura a partir de una colonia aislada y se suspendieron en el tubo de reacción de PCR del Kit Pure Taq Ready-To-Go (GE Healthcare), que contiene una perla, que al disolverla en 25 μ L de agua desionizada la concentración final de los componentes es: 1 U/mL de PuRe Taq DNA polimerasa, 200 μ M de cada dNTP, 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl y 1.5 mM de MgCl₂. Para la amplificación de la región ITS-5.8S del rDNA, se utilizaron los cebadores ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). Las condiciones de la reacción fueron las descritas

por Esteve-Zarzoso *et al.* (1999): Desnaturalización a 95 °C durante 25 minutos; 35 ciclos de 94 °C durante un minuto, 55 °C por dos minutos, 72 °C por dos minutos y una extensión final a 72 °C durante 10 minutos, en un termociclador Veriti 96 well (Applied Biosystem). La digestión enzimática se llevó a cabo usando las enzimas de restricción HhaI, HaeIII e HindI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Los fragmentos de restricción fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 3.0% (w/v) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), mezclando 3 µL de material amplificado con 1 µL de buffer de carga 6X (Anexo 1). El perfil de migración se alcanzó a 100 V por 1 hora. Los gels se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg/mL), se visualizaron bajo luz UV con un transiluminador GelDoc (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y se analizaron por comparación con las bandas proporcionadas por el marcador de peso molecular TrackIt 100 pb DNA Ladder (Invitrogen) usando el software QuantityOne (Biorad).

7.2.6.- Secuenciación de la región D1/D2 del gen ribosomal 26S.

La identificación de las levaduras se confirmó por la secuenciación del dominio D1/D2 en el extremo 5' de la subunidad grande ribosomal (26S) (Kurtzman y Robnett, 1998). Para lo cual las muestras se amplificaron con los cebadores NL1 (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3') y NL4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3'), a una concentración de 10 mM cada uno y 1 µL de ADN de muestra, utilizando perlas de PCR (PuRe Taq Ready-To-Go) (GE Healthcare) en un volumen final de reacción de 25 µL; la reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Veriti 96 Well (Applied Biosystem) con las siguientes condiciones: 5 minutos de

desnaturalización inicial a 94 °C, seguidos por 36 ciclos de desnaturalización a 94 °C por un minuto, alineamiento a 55 °C por 0.5 minutos y extensión a 72 °C por dos minutos; con 10 minutos de extensión final a 72 °C. La amplificación de los fragmentos se comprobó por el corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) teñido con bromuro de etidio (10 mg/mL). Los fragmentos amplificados fueron enviados a Macrogen (Rockville, MD, USA), para secuenciación, y las secuencias resultantes se alinearon en el GenBank con el programa BLAST de la NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para la identificación de las levaduras.

7.2.7.- Electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente de desnaturalización (DGGE).

La región D1 del gen RNAr 26S fue amplificada usando los cebadores NL1GC (5'-GCG GGC CGC GCG ACC GCC GGG ACG CGC GAG CCG GCG GCG GGC CAT ATC AAT AAG CGG AGG AAA AG-3') (La grapa GC está subrayada) y el cebador inverso LS2 (5'-ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3'), con base en las condiciones descritas por Cocolin *et al.* (2001): desnaturalización inicial a 95 °C por 25 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por un minuto, alineamiento a 55 °C por 45 segundos y extensión a 72 °C por un minuto, con una extensión final a 72 °C por 7 minutos en un termociclador Veriti 96 Well (Applied Biosystem). La mezcla de reacción de PCR (25 µL de volumen final) se preparó con una perla de PCR (PuRe Taq Ready-To-Go) (GE Healthcare) suspendida en 1.25 µL de cada cebador, agua ultrapura estéril y 1 µL de ADN extraído

directamente de las muestras de mosto, según el método del kit MasterPure Yeast Purification (Epicentre Biotechnologies).

Para el análisis DGGE se utilizó el Sistema Universal de Detección de Mutaciones Dcode™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La electroforesis de los amplicones producidos por PCR se realizó en geles de poliacrilamida [8% (w/v) acrilamida:bisacrilamida 37.5:1] con gradiente desnaturizante de 45 a 75% que incrementó en la dirección del corrimiento electroforético. El gradiente se generó mezclando una solución de baja concentración que contiene 3.6 mL de formamida y 3.78 g de urea para electroforesis, con una solución de alta concentración conteniendo 6 mL de formamida y 6.3 g de urea para electroforesis; a cada solución se añaden 0.4 mL de TAE 50X, 4 mL de acrilamida:bisacrilamida (19:1) al 40 % (Sigma-Aldrich) y se completa con agua destilada un volumen de 20 mL. Se calienta a baño maría a 50 °C para la disolución completa y es recomendable refrigerar las soluciones antes de utilizarlas. Justo antes de inyectar las soluciones a la cámara, se añadieron 18 µL de TEMED y 100 µL de persulfato de amonio (PSA) al 10% para la polimerización.

Para la construcción del marcador de las especies aisladas, se amplificaron y reamplificaron las cepas puras, bajo las mismas condiciones ya descritas. Posteriormente se les añadió a cada reamplificado 8 µL de buffer de carga 6X y se preparó una mezcla con 8 µL de cada cepa pura; en el gel del marcador se inyectaron 15 µL de mezcla y 5 µL de cada cepa pura reamplificada. En el gel

para evaluar la dinámica de los mostos, se inyectaron 15 μL de la mezcla y 10 μL de cada mosto amplificado, con lo que se obtuvieron bandas nítidas.

El corrimiento se llevó a cabo a una temperatura constante de 60°C en TAE 1X a 100 V por 16 horas. Después de la electroforesis, los geles se tiñeron por 10 minutos en TAE 1X con 0.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de bromuro de etidio, se visualizaron bajo luz UV con un transiluminador GelDoc (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y se analizaron con el software QuantityOne (Biorad).

7.3.- ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DE LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE AMPLIFICACIÓN (AFLP).

Para esta etapa del trabajo es necesario contar con ADN genómico, que se extrajo a partir de cepas puras mediante el método de Tapia-Tussell *et al.* (2006) y se conservó en refrigeración con 50 μL de buffer TE 1X hasta su uso. El ADN extraído se cuantificó en un espectrofotómetro nanodrop 1000 (Thermo Scientific) y se realizaron diluciones para homogeneizar la concentración de ADN en las muestras a 25 ng/ μL .

El análisis AFLP se realizó según las especificaciones del fabricante del Kit AFLP Analysis System I, AFLP Starter Primer kit (Gibco BRL Life Technologies), como lo reportó Flores Berrios *et al.* (2005). Se usaron 12 aislados de *S. cerevisiae*, 7 de *K. marxianus* y 9 de *T. delbrueckii* correspondientes a las tres especies mayoritarias aisladas de los dos procesos fermentativos. Se utilizaron dos pares de cebadores (E-AC/M-C y E-C/M-A) para cada especie y los perfiles de marcadores generados fueron registrados en una matriz binaria

(1=presencia/0=ausencia) que fue usada como base para la creación de 100 pseudo réplicas con el programa SeqBoot. Se calculó la Distancia genética de Nei (Piñero *et al.* 2008) con el programa Gendist que generó una matriz de similitud que sirvió para la construcción de los dendogramas mediante el algoritmo de agrupación UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) después de haber realizado un consenso de los 100 árboles obtenidos, con el programa Consense; todos los programas usados, corresponden al paquete Phylip 3.68 (Felsenstein, 2008).

7.4.- ÍNDICES DE DIVERSIDAD

A partir de los resultados obtenidos del conteo en placa y la identificación de los aislados, se determinó el índice de Shannon-Wiener (Margalef, 1998).

$$H' = - \sum p_i \ln p_i$$

Donde $p_i = \frac{N_i}{N}$; N_i es el número de individuos de la especie i y N es el total de individuos de la muestra.

Con los resultados del análisis de AFLP se determinó el porcentaje de polimorfismo (%P) (Freeland *et al.* 2011) para cada par de cebadores y para cada especie mayoritaria; así mismo se calculó la Heterocigosidad esperada (H_e) (Freeland *et al.* 2011) para cada especie de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\%P = \frac{\text{No. De loci polimórficos}}{\text{No. Total de loci}} \times 100$$

$$He = 1 - \sum_{i=1}^m Xi^2$$

Donde Xi es la frecuencia del alelo i y m es el número de alelos por locus

7.5.- EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO FISIOLÓGICO DE LAS PRINCIPALES LEVADURAS DEL MEZCAL

7.5.1.- Cinética de fermentación de las levaduras

7.5.1.1.- Reactivación de las levaduras para la obtención del inóculo

Se reactivaron las células de levadura a partir de un cultivo conservado en glicerol a -80° C, inoculándolo en 50 ml de caldo YPD (Extracto de levadura, 10 g/L; peptona, 20 g/L; Dextrosa, 20 g/L) durante toda la noche a 30° C a 250 rpm. Al cabo de este tiempo, se realiza un conteo directo para conocer la población presente en el medio de cultivo.

Se desarrolló un pre-inóculo transfiriendo 1×10^7 cel/mL del cultivo anterior a un medio fresco para la determinación de la cinética de crecimiento; tomando muestras del cultivo cada 2 horas, hasta las 8 horas de desarrollo y luego cada cuatro horas hasta completar 24 horas de fermentación. Una vez determinada la cinética de crecimiento, se transfirió una vez más 1×10^7 cel/mL a medio fresco del que se obtuvo el inóculo al cosechar las células en la fase exponencial. En las mismas condiciones de incubación que se emplearon para la reactivación celular.

7.5.1.2.- Fermentaciones controladas en matraz

Se inocularon 1×10^7 cel/mL en 100 mL de jugo de agave (*A. salmiana*) suplementado con 1g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, a pH 4.5. Se incubó a 30° C con agitación de 50 rpm y se tomaron muestras cada tres horas desde el tiempo cero hasta las 12 horas, posteriormente cada seis horas, hasta completar un total de 24 horas de fermentación; tomando cada vez 5 mL para realizar el conteo directo y los métodos analíticos.

7.6.- MÉTODOS ANALÍTICOS

Para la realización de los métodos analíticos, las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante se distribuyó según el método; 1 mL para la determinación de azúcares reductores totales y 2 mL para la determinación de etanol por el método enzimático, y 1 mL para la determinación de volátiles mayoritarios.

7.6.1.- Determinación de azúcares reductores directos

La concentración de los azúcares reductores directos se determinó por el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959) usando fructosa como estándar. Esta técnica se basa en la reducción del DNS con la correspondiente oxidación de los grupos aldehído de los azúcares, generándose una coloración amarilla proporcional a la concentración de dichas moléculas.

7.6.2.- Determinación enzimática de etanol

Se colectó un mililitro de sobrenadante de la muestra tomada en cada punto de la fermentación y se diluyó hasta obtener un máximo de 3 g/L de etanol y la

determinación se realizó mediante un sistema enzimático, utilizando el equipo YSI (Yellow Spring Instrument) modelo 2700 Select, en el cual la enzima etanol oxidasa, descompone el etanol presente en la muestra convirtiéndolo en peróxido de hidrógeno y acetaldehído. El peróxido de hidrógeno pasa a través de una membrana de acetato de celulosa hacia un electrodo de platino en el cual es oxidado. La cantidad de electrones detectados es proporcional a la concentración de etanol. El método requiere el empleo de una solución buffer YSI 2787, el cual se diluye en 450 mL de agua destilada, además de una solución patrón de etanol a 3 g/L.

7.6.3.- Determinación de compuestos volátiles mayoritarios

Para la determinación de compuestos volátiles, las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard Head-space HP 7694E, conectado con un detector de ionización de flama (FID) Hewlett-Packard 6890, y con una columna capilar HP-Innowax de 60 m X 320 μm X 0.25 μm . Las condiciones del análisis fueron las siguientes: 45 °C por 7 minutos, incrementándose 10 °C por minuto hasta alcanzar los 160 °C, 20 °C por minuto, hasta 220 °C, y manteniéndose a esta temperatura durante 8 minutos; se utilizó helio como gas acarreador a una velocidad de flujo de 1.8 mL/min, y 250 °C de temperatura del inyector y del detector.

7.7.- DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS

Después de obtenidos los resultados de los métodos analíticos y del conteo directo de los cultivos, se calcularon los siguientes parámetros: velocidad

específica máxima de crecimiento para cada levadura (μ_{\max}), tasa de consumo específico máximo de sustrato ($q_{s_{\max}}$), tasa de generación específica máxima de producto ($q_{p_{\max}}$) obteniendo los valores máximos a partir de las curvas generadas con el programa CurveExpert 1.3. Se calcularon también el rendimiento de biomasa con base a sustrato ($Y_{x/s}$) y rendimiento de producto con base a sustrato ($Y_{p/s}$). Todos los parámetros se determinaron aplicando las fórmulas propuestas por Quintero (1987).

$$\mu = \frac{\ln(X_2/X_1)}{t_2 - t_1}$$

Donde μ es la velocidad específica de crecimiento celular, X es la biomasa y t es el tiempo.

$$q_s = \frac{r_s \ln(X_2/X_1)}{X_2 - X_1} \qquad r_s = \frac{\Delta ART}{\Delta t}$$

Donde q_s es la tasa de consumo específico de sustrato, r_s es la velocidad instantánea de consumo de sustrato en un tiempo determinado.

$$q_p = \frac{r_p \ln(X_2/X_1)}{X_2 - X_1} \qquad r_p = \frac{\Delta E_{\text{etanol}}}{\Delta t}$$

Donde q_p es la tasa de generación específica de producto; r_p es la velocidad instantánea de formación de producto y X es la biomasa.

$$Y_{p/s} = \frac{[Etanol]_f - [Etanol]_i}{[Azúcar]_i - [Azúcar]_f} \quad Y_{x/s} = \frac{X_f - X_i}{[Azúcar]_i - [Azúcar]_f}$$

Donde $Y_{p/s}$ es el rendimiento de producto con base a sustrato, $[]_i$ y $[]_f$ son las concentraciones de etanol y azúcar inicial y final. $Y_{x/s}$ es el rendimiento de biomasa con base a sustrato, X_i y X_f son los valores de biomasa inicial y final.

7.8.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar la cinética de las dos fermentaciones, se aplicó un análisis de regresión al 95% de confianza con el programa JMP versión 5.1 y un análisis de correlación canónica con el 95% de confianza por medio del programa Statgraphics Plus versión 5.1.

Para la evaluación del comportamiento fisiológico de las principales levaduras del mezcal, se montó un diseño categórico con un solo factor completamente aleatorizado, con 3 repeticiones. El factor que se probó fue la levadura, con seis niveles correspondientes a las cepas en estudio (*K. marxianus*, 0608; *T. delbrueckii*, 0620; *S. cerevisiae*, 0902; *K. marxianus*, 1424; *S. cerevisiae*, 2114 y *T. delbrueckii*, 1423). Las variables de respuesta fueron los parámetros cinéticos determinados y los compuestos volátiles generados (alcoholes superiores, acetato de etilo y acetaldehído) y fueron analizados con un Análisis de Varianza (ANOVA) de una sola vía con el 95% de confianza y con la Prueba de rangos múltiples con el método LSD utilizando el programa Statgraphics Plus versión 5.1.

8.- RESULTADOS

8.1.- DIVERSIDAD DE LAS LEVADURAS EN LA FERMENTACIÓN.

8.1.1.- Caracterización morfológica de las levaduras cultivadas en placa

En la primera etapa del proyecto se trabajó sobre la identificación de las levaduras a partir de colonias aisladas en caja sobre agar WL, en las que se identificaron diferentes morfologías a partir de una sola placa de agar (Fig. 12). En total se identificaron 26 diferentes morfologías que sirvieron como base para la formación de cinco grupos de levaduras, que se presentan en el Cuadro 2.

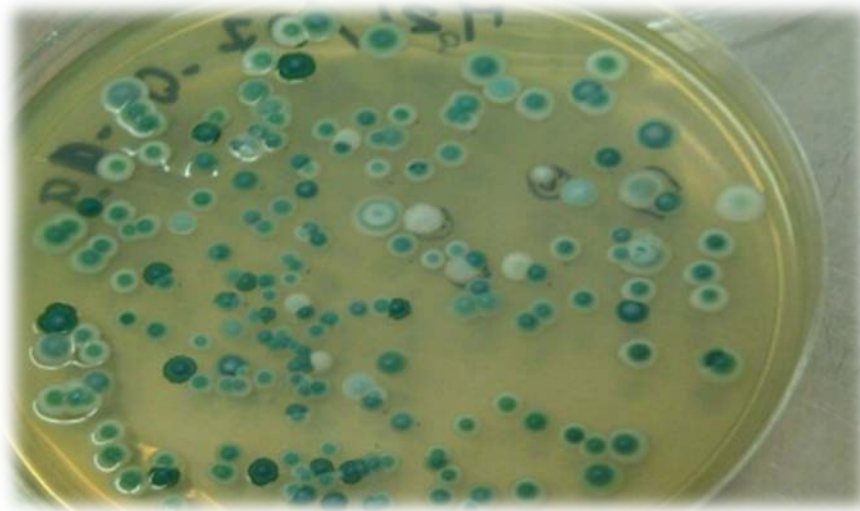

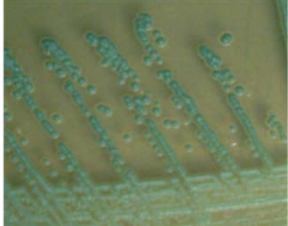
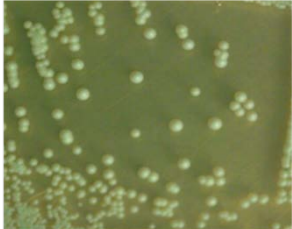
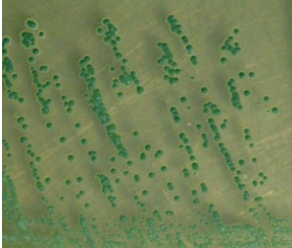



Figura 12.- Diferentes tipos coloniales desarrollados sobre una misma placa de agar WL suplementado con 0.01% de cloranfenicol.

Resultados

Cuadro 2.- Grupos morfológicos de las colonias aisladas por siembra en placa sobre agar WL.

GRUPO	CARACTERÍSTICAS	COLONIAS
I	Colonias blancas, con superficie y borde irregular, elevadas en forma de volcán.	
II	Colonias verdes de aspecto cremoso, borde regular, ligeramente elevadas, que por el revés presentan color crema, tienen el borde más claro y son de 1-3 mm de diámetro.	
III	Colonias verde pálido, casi blancas, elevadas, con borde regular, diámetro de 2 mm, aspecto cremoso y opaco, superficie lisa.	
IV	Colonias color verde intenso, de superficie lisa y brillante, con el borde transparente, elevadas y con 2 mm de diámetro.	
V	Colonias de color rosa, superficie lisa y brillante, aspecto cremoso y diámetro de 2 mm.	

8.1.2.- Identificación molecular de levaduras por métodos convencionales

Una vez realizada la clasificación morfológica, se llevaron a cabo 192 análisis de RFLP de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr a partir de las 26 morfologías encontradas, y se identificaron ocho especies. En el Cuadro 3 se muestran los tamaños (pb) de los fragmentos de nucleótidos obtenidos de la región amplificada por PCR y digerida con las endonucleasas de restricción HhaI, HaeIII e HinfI. y en las Figs. 13 y 14 se presentan los perfiles de bandas para cada una. La identificación se llevó a cabo comparando los patrones de bandas con patrones publicados previamente (Guillamón *et al.* 1998; Esteve-Zarzoso *et al.* 1999; Arias *et al.* 2002), de los cuales se eligió una colonia para confirmar la identidad por secuenciación de la región D1/D2 del gen 26S del rDNA. Las levaduras identificadas son *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kluyveri*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Clavispora lusitaniae*, *Torulaspota delbrueckii*, *Candida ethanolica*, y *Saccharomyces exiguus*.

Resultados

Cuadro 3.- Levaduras identificadas y longitud en pares de bases de la región ITS-5.8S amplificada por PCR y de los fragmentos obtenidos después de la digestión con las endonucleasas de restricción HhaI, HaeIII e HinfI.

Levaduras identificadas	No. de Acceso GenBank	AP (PB)	Fragmentos de restricción			Autor de Referencia
			HhaI	HaeIII	HinfI	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JF715188	875	373-347-138	321-241-180-133	374-127	Esteve-Zarzoso <i>et al.</i> 1999
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	AY894819	784	298-196-171-90	644-85	256-190-118-87	Esteve-Zarzoso <i>et al.</i> 1999
<i>Clavispora lusitaniae</i>	FJ627988	380	165-99	379	257-217	Arias <i>et al.</i> 2002
<i>Saccharomyces exiguus</i>	AY007906	658	361-297	496-246	354-248-137	Esteve-Zarzoso <i>et al.</i> 1999
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	EF063124	800	325-220-153-100	795	410-378	Esteve-Zarzoso <i>et al.</i> 1999
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	GU080052	723	321-284-94-94	700	339-226-158	Esteve-Zarzoso <i>et al.</i> 1999 Guillamón <i>et al.</i> 1998
<i>Pichia kluyveri</i>	AJ746339	465	168-108-86	316-95	257-207	Esteve-Zarzoso <i>et al.</i> 1999 Guillamón <i>et al.</i> 1998
<i>Candida ethanolica</i>	EF550225	450	152-101	301	250-201	Esteve-Zarzoso <i>et al.</i> 1999 Guillamón <i>et al.</i> 1998

Resultados

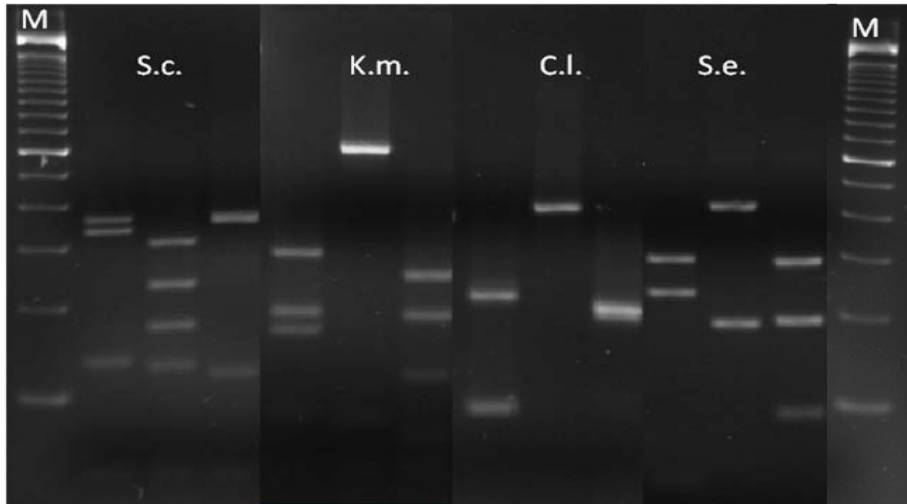


Figura 13.- Patrón de bandas obtenido de las colonias aisladas, después de digerir los amplicones de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr, con las enzimas de restricción HhaI, HaeIII e HinfI. Abreviaturas: M; marcador de peso molecular de 100 pb; S.c., *S. cerevisiae*; K.m., *K. marxianus*; C.l., *C. lusitaniae* y S.e., *S. exiguus*.

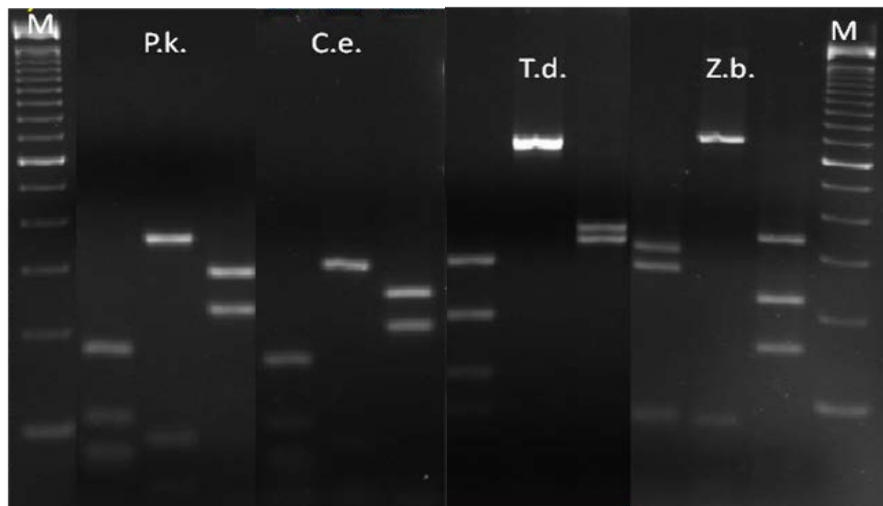


Figura 14.- Patrón de bandas obtenido de las colonias aisladas, después de digerir los amplicones de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr, con las enzimas de restricción HhaI, HaeIII e HinfI. Abreviaturas: M; Marcador de peso molecular de 100 pb; P.k., *P. kluyveri*; C.e., *C. ethanolica*; T.d., *T. delbrueckii* y Z.b., *Z. bailii*.

8.1.3.- Distribución y sucesión de levaduras en los procesos fermentativos

Se muestrearon dos procesos fermentativos (fermentación 1 y 2; 7 puntos en cada una), y se aislaron levaduras de diferentes lugares de la fábrica como se muestra en el Cuadro 4: el “lavadero” --donde el agave cocido y molido es mezclado con agua--, el tanque del cultivo iniciador (inóculo) y del jugo de agave cocido antes de la inoculación. Se detectaron *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *S. exiguus* y *T. delbrueckii* en todos los sitios muestreados, *C. ethanolica* solamente en el cultivo iniciador, mientras que *P. kluyveri* y *Z. bailii* únicamente en el jugo de agave sin inocular. La población de levaduras varió desde 1.3×10^6 cel/mL (en el lavadero) hasta 4.0×10^7 cel/mL al final del desarrollo del inóculo.

Cuadro 4. Levaduras aisladas a partir de diferentes lugares de la fábrica Laguna Seca en el Estado de San Luis Potosí, México.

Sitio de aislamiento	Levaduras totales	Especies aisladas
“Lavadero”	1.3×10^6 cel/mL	<i>S. cerevisiae</i> <i>K. marxianus</i> <i>S. exiguus</i> <i>T. delbrueckii</i>
Tina con jugo sin inocular	1.8×10^6 cel/mL	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. exiguus</i> <i>K. marxianus</i> <i>T. delbrueckii</i> <i>P. kluyveri</i> <i>Z. bailii</i>
Inóculo	4.0×10^7 cel/mL	<i>S. cerevisiae</i> <i>K. marxianus</i> <i>S. exiguus</i> <i>T. delbrueckii</i> <i>C. ethanolica</i>

Resultados

En la Fig. 15 se describe la sucesión de las poblaciones de las diferentes especies en los dos procesos de fermentación (La fermentación 1 se llevó a cabo con 49.34 g/L de azúcar y la fermentación 2 con 37.62 g/L). En las dos fermentaciones fueron encontradas todas las especies descritas en el Cuadro 4, excepto *Candida ethanolica*. *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura predominante, el desarrollo de la población de no-*Saccharomyces* muestra diferencia entre las fermentaciones 1 y 2. En general, la población de no-*Saccharomyces* es más alta en la fermentación 2 que en la fermentación 1. Al final de la fermentación 1 solamente *K. marxianus* y *T. delbrueckii* fueron detectadas, mientras que en la fermentación 2, se encontró a *K. marxianus*, *P. kluyveri*, *Z. bailii*, *C. lusitaniae*, *T. delbrueckii*, *S. exiguus*, y *Z. bailii*.

La distribución de las especies de levaduras (%) al inicio y al final de las dos fermentaciones es mostrada en el Cuadro 5 y se comprueba en los cuadros 6 y 7 en donde se observa que la diversidad según el índice de Shannon-Wiener es mayor en los primeros muestreos tomados durante la fermentación 1, mientras que en la fermentación 2, la diversidad es más alta al final del proceso.

Resultados

Cuadro 5.- Ocurrencia de poblaciones de levaduras en las tinas de fermentación a diferentes etapas del proceso durante las fermentaciones 1 y 2 de la Fábrica Laguna Seca, en San Luís Potosí, México.

Especies	Etapas de fermentación	
	% Inicial	% Final
Fermentación 1		
<i>S. cerevisiae</i>	94.00	96.22
<i>S. exiguus</i>	0.90	0.38
<i>K. marxianus</i>	2.20	2.00
<i>T. delbrueckii</i>	0.50	1.40
<i>P. kluyveri</i>	0.50	
<i>Z. bailii</i>	1.40	
<i>C. lusitaniae</i>	0.50	
Fermentación 2		
<i>S. cerevisiae</i>	97.63	77.26
<i>S. exiguus</i>	0.18	
<i>K. marxianus</i>	2.19	1.68
<i>T. delbrueckii</i>		1.43
<i>P. kluyveri</i>		0.67
<i>Z. bailii</i>		13.68
<i>C. lusitaniae</i>		5.28

Resultados

Cuadro 6.- Diversidad según el índice de Shannon-Wiener en la fermentación 1.

Muestreo	Riqueza	Abundancia	Diversidad H'
1	7	4.615175	0.49822234
2	6	5.813166	0.64093897
3	5	5.813166	0.31368392
4	5	7.283966	0.23669403
5	5	4.483032	0.28850364
6	4	4.282699	0.22313819
7	4	6.017232	0.20279038

Cuadro 7.- Diversidad según el índice de Shannon-Wiener en la fermentación 2.

Muestreo	Riqueza	Abundancia	Diversidad H'
1	3	3.6534	0.11850994
2	4	5.18	0.36750901
3	5	7.9	0.28596644
4	4	13.2	0.23546859
5	5	13.8	0.37143817
6	6	8.16	0.47035757
7	6	7.9412	0.78954891

Resultados

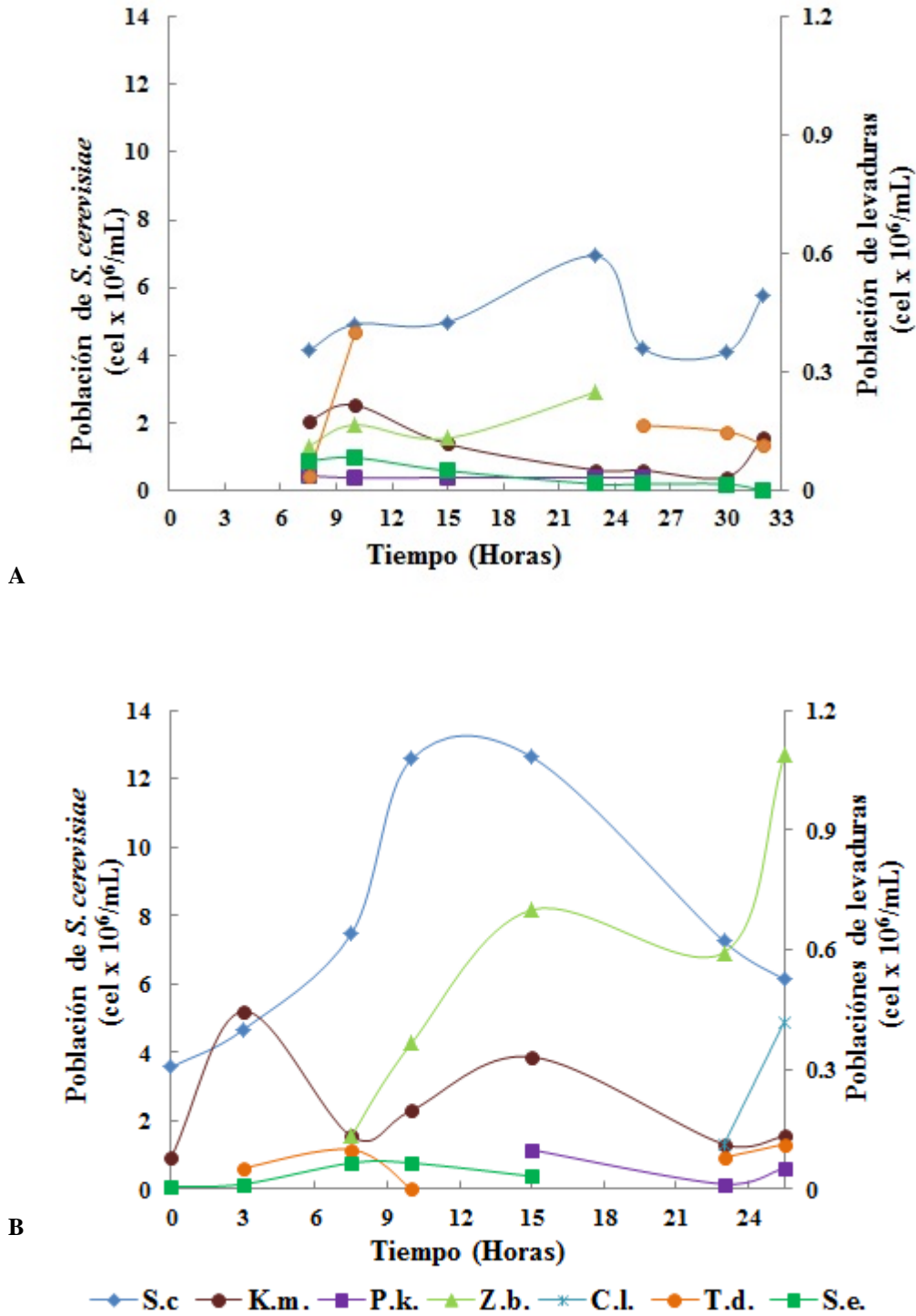


Figura 15.- Sucesión de especies de levaduras en las fermentaciones 1 (A) y 2 (B) de la mezcalera Ex-Hacienda "Laguna Seca" en el Estado de San Luis Potosí, México. Abreviaturas: S.c., *S. cerevisiae*; K.m., *K. marxianus*; P.k., *P. kluyveri*; Z.b., *Z. baillii*; C.l., *C. lusitaniae* S.e., *S. exiguus* y T.d., *T. delbrueckii*.

Resultados

La sucesión de especies durante la fermentación se analizó también mediante los perfiles de PCR-DGGE obtenidos a partir del ADN extraído directamente de las muestras de mosto, los cuales son mostrados en la Fig. 16 y comparados con los perfiles del DNA de cultivos puros de las diferentes cepas aisladas. Las bandas correspondientes a *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* son claramente detectadas, mientras que las bandas de *S. exiguus* se pueden observar de manera muy débil en el gel al igual que las bandas de *Z. bailii*, que migró junto con *C. lusitaniae* en el marcador. Esto confirma los resultados obtenidos del aislamiento en caja en donde las levaduras más abundantes fueron *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii*. Además aparecieron algunas bandas que no corresponden a ninguna de las levaduras aisladas en el medio WL; sin embargo, dichas bandas fueron secuenciadas y los resultados arrojaron que se trata de fragmentos de hongos filamentosos no cultivables (Número de Acceso en el GenBank:JX17487.1).

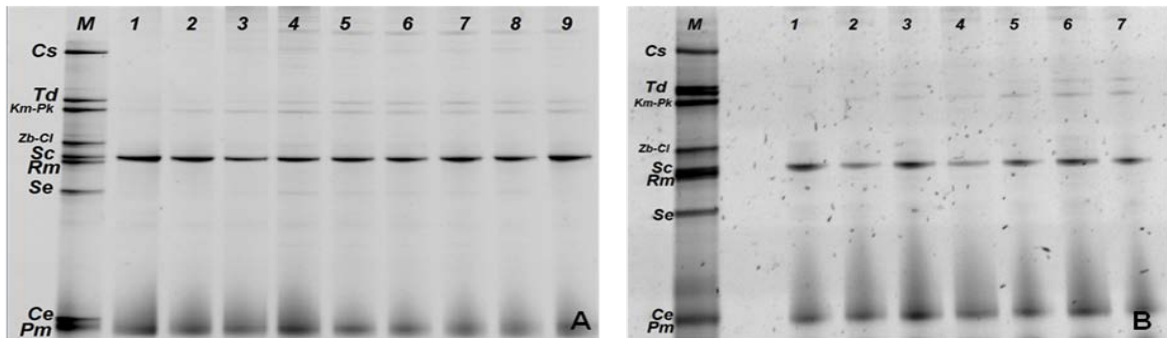


Figura 16.- Perfil de migración de PCR-DGGE a partir de los procesos fermentativos 1(A) y 2(B). La línea M corresponde a la mezcla de las cepas puras aisladas sobre medio WL e identificadas por RFLP; líneas 1-9, perfiles DGGE de los DNA amplificados obtenidos

8.2.- RELACIÓN ENTRE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA Y LA CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES

Las Fig. 17 y 18 muestran las características del desarrollo de las fermentaciones. Los parámetros de etanol y azúcar considerados en la Fig. 17 se comportaron de manera lineal sin diferencia significativa a un 95% de confianza. El rendimiento de etanol con base en el consumo de azúcar fue similar en los dos procesos, de 0.39 g/g en la fermentación 1 y de 0.39 g/g en la fermentación 2. Respecto a la diversidad, en la fermentación 1 (Fig. 17 A) se ajustó a un modelo polinomial, y en la fermentación 2 (Fig. 17 B) se comportó de manera lineal con valores desde 0.498 hasta 0.790

La Fig. 18 presenta la variación de la concentración de los principales compuestos volátiles encontrados en el mosto. De estos compuestos, los alcoholes superiores (suma de la concentración de los alcoholes amílicos, isobutanol y 1-propanol) y el acetato de etilo en ambas fermentaciones se comportaron linealmente sin diferencia significativa a un 95% de confianza. Por otra parte, en la fermentación 1 (Fig. 18 A) el acetaldehído se ajustó a un modelo polinomial, mientras que en la fermentación 2 (Fig. 18 B) el comportamiento fue de tipo cuadrático, alcanzando su valor máximo a las 15 horas de iniciado el proceso.

Resultados

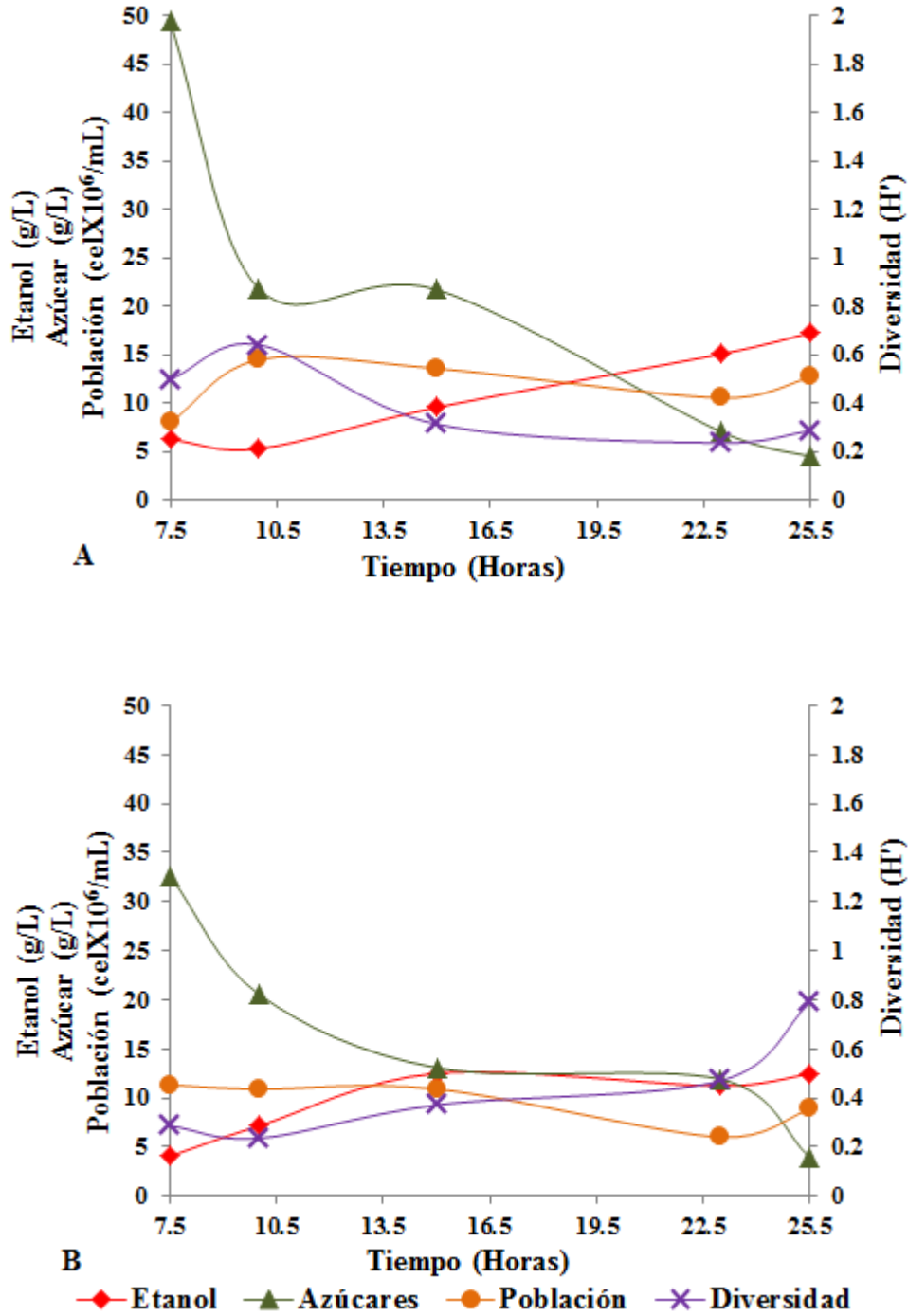


Figura 17.- Variación de concentraciones de azúcar, etanol, población total de levaduras y diversidad en los procesos fermentativos 1(A) y 2(B) durante la producción de mezcal en la fábrica Ex-Hacienda “Laguna Seca”, San Luís Potosí, México.

Resultados

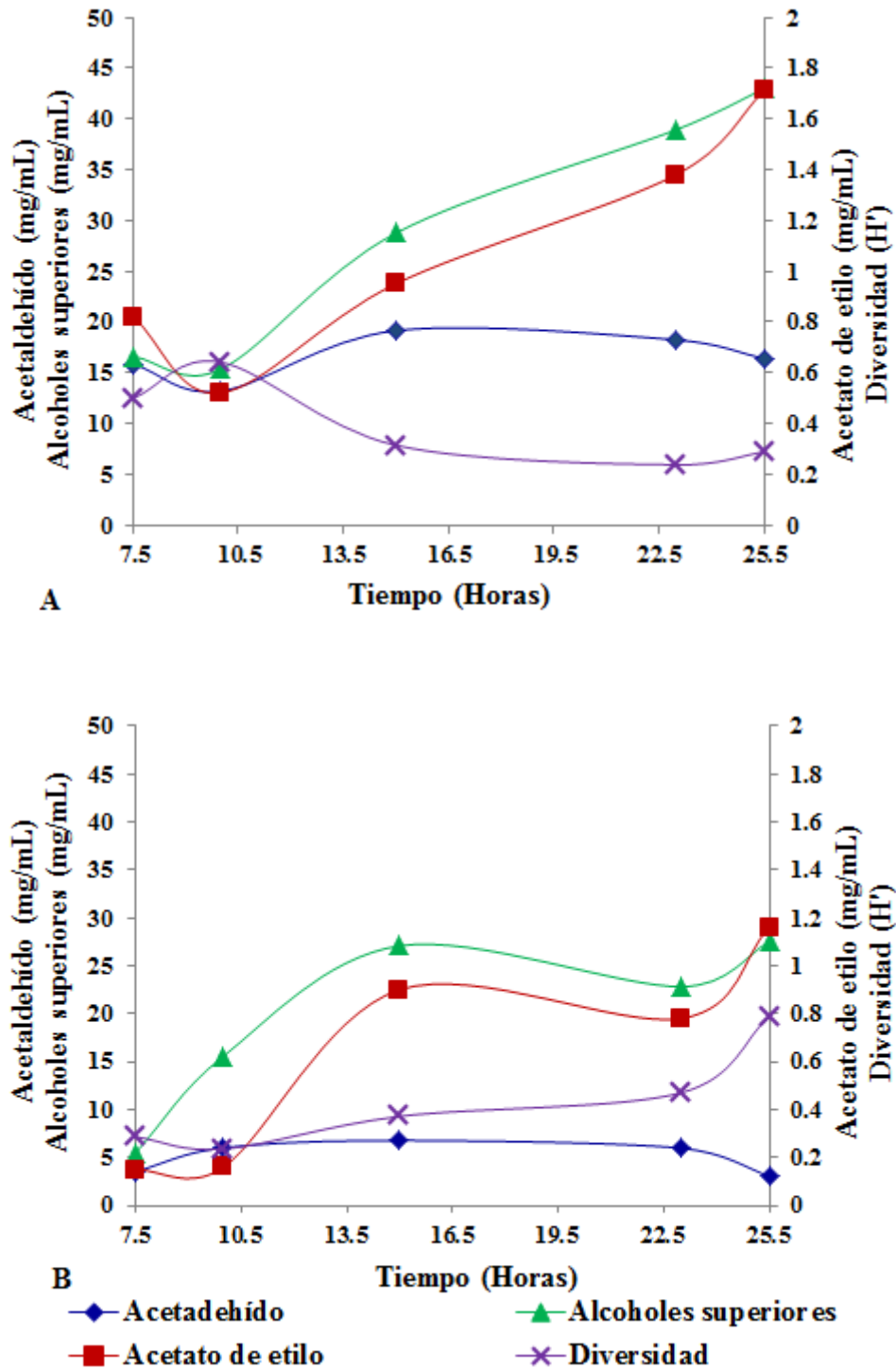


Figura 18.- Concentración de los compuestos volátiles producidos en los procesos fermentativos 1(A) y 2(B) durante la producción de mezcal en la fábrica Ex-Hacienda “Laguna Seca”, San Luís Potosí, México.

Resultados

Los resultados del análisis de correlación mostraron que en ambos procesos (Cuadros 8 y 9) se observó correlación directa entre la concentración de etanol y acetato de etilo y entre etanol y alcoholes superiores. Así mismo, en ambas fermentaciones, el acetato de etilo y los alcoholes superiores estuvieron correlacionados de manera directa.

Respecto a la diversidad, únicamente en la fermentación 1 (Cuadro 8) se correlacionó de manera inversa con los alcoholes superiores. El valor de correlación inversa entre diversidad, etanol, acetaldehído y acetato de etilo, es alto pero sin llegar a ser estadísticamente significativo; como ocurrió también con la fermentación 2 (Cuadro 9).

Cuadro 8.- Resultados del análisis de correlaciones entre las variables observadas durante la fermentación 1. Los valores con (*) son los que tienen correlación estadísticamente significativa con un 95% de confianza

CORRELACIONES EN LA FERMENTACIÓN 1						
	Etanol	Acetaldehído	Acetato de etilo	Alcoholes superiores	Azúcar	Diversidad
Etanol	1.000	0.500	0.980*	0.991*	-0.795	-0.861
Acetaldehído		1.000	0.488	0.586	-0.249	-0.869
Acetato de etilo			1.000	0.958*	-0.671	-0.845
Alcoholes superiores				1.000	-0.816	-0.903*
Azúcar					1.000	0.584
Diversidad						1.000

Resultados

Cuadro 9.- Resultados del análisis de correlaciones entre las variables observadas durante la fermentación 2. Los valores con (*) son los que tienen correlación estadísticamente significativa con un 95% de confianza

CORRELACIONES EN LA FERMENTACIÓN 2						
	Etanol	Acetaldehído	Acetato de etilo	Alcoholes superiores	Azúcar	Diversidad
Etanol	1.000	0.274	0.935*	0.993*	-0.945*	0.670
Acetaldehído		1.000	-0.061	0.283	-0.076	-0.516
Acetato de etilo			1.000	0.910*	-0.912*	-0.854
Alcoholes superiores				1.000	-0.957*	0.657
Azúcar					1.000	-0.802
Diversidad						1.000

8.3.- DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS LEVADURAS PERSISTENTES DURANTE LA FERMENTACIÓN

Con el análisis AFLP, se obtuvieron 103 marcadores para los 12 aislados de *S. cerevisiae*; 79 para los 7 genotipos de *K. marxianus* y 103 para los 9 aislados de *T. delbrueckii*. Con estos marcadores se determinó la variabilidad genética, con base en el porcentaje de polimorfismo (%) encontrado por cada par de cebadores y de la Heterocigosidad esperada (H_e) para cada una de las especies que persistieron a lo largo de las dos fermentaciones, cuyos valores se presentan en el Cuadro 10.

Resultados

Cuadro 10.- Porcentaje de polimorfismo y heterocigosidad esperada en las tres especies mayoritarias que formaron el consorcio durante el proceso fermentativo de la mezcalera Laguna Seca, San Luis Potosí, México.

Especie	Cebadores	% Polimorfismo (P)	Prom. P	He
<i>S. cerevisiae</i>	E-AC/M-C	70.00%	66.50%	0.989
	E-C/M-A	63.00%		
<i>K. marxianus</i>	E-AC/M-C	62.50%	63.00%	0.984
	E-C/M-A	63.49%		
<i>T. delbrueckii</i>	E-AC/M-C	90.38%	88.33%	0.988
	E-C/M-A	86.27%		

Con la combinación de los dos pares de cebadores en cada especie, después del análisis de la distancia genética de Nei, se obtuvieron los dendogramas para cada especie (Fig. 19, *S. cerevisiae*; Fig. 20, *K. marxianus* y Fig. 21, *T. delbrueckii*) mediante el agrupamiento por el método UPGMA. Los valores de bootstraps de hasta 100%, que se observan en las ramas de los dendogramas, indican la robustez de los agrupamientos.

En el dendograma obtenido con los genotipos de *S. cerevisiae* (Fig. 19) se formaron dos grupos, el primero incluye al genotipo 2114 aislado a las 11 horas en la fermentación 2, que corresponde al periodo de crecimiento más importante del proceso, con respecto al incremento poblacional (10.9×10^6 cel/mL) y en el que la concentración de etanol alcanzó su nivel máximo, al igual que los alcoholes superiores y el acetaldehído. En este punto de la fermentación se aislaron 20 colonias del genotipo 2114, de un total de 70 colonias.

Resultados

El segundo grupo del dendograma se separó en dos subgrupos que muestran varias ramificaciones.

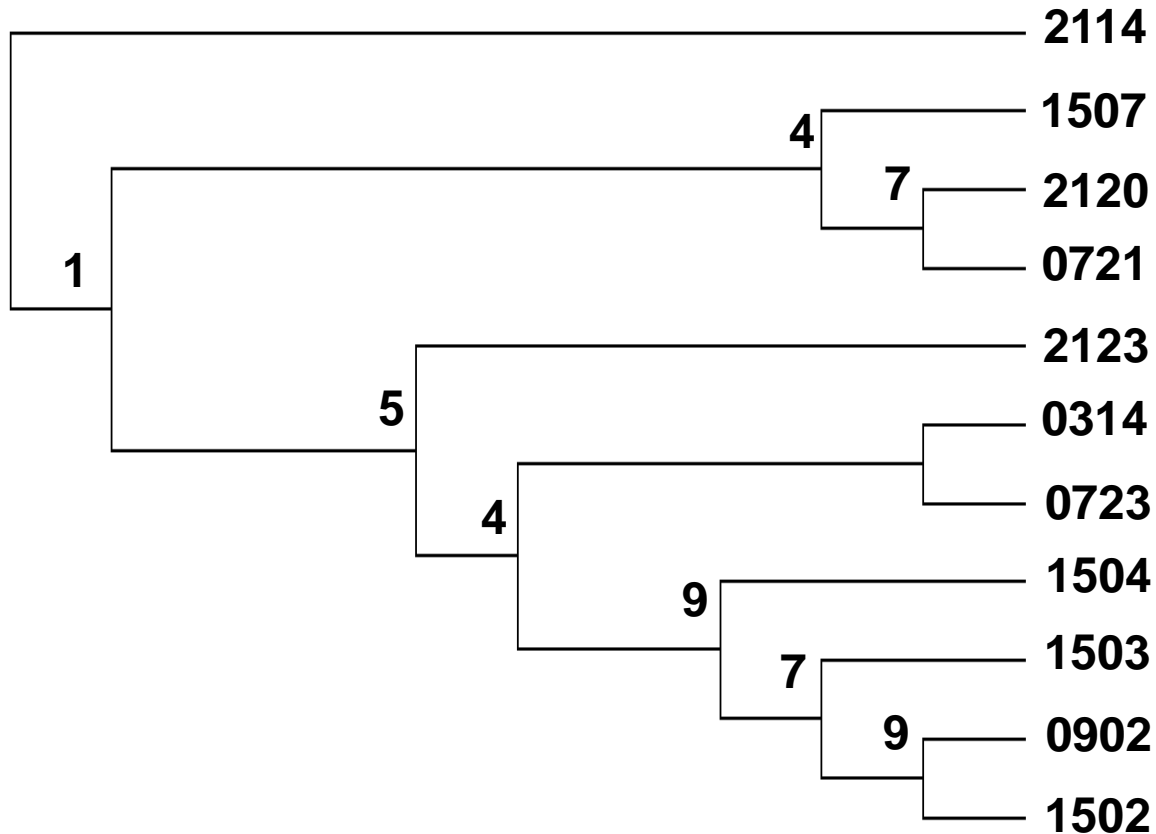


Figura 19.- Dendograma resultante de las cepas de *S. cerevisiae* después del agrupamiento según el algoritmo UPGMA a partir de la matriz de Distancia Genética de Nei, con los 103 marcadores AFLP.

El dendograma obtenido con las distancias de los genotipos de *K. marxianus* (Fig. 20) muestra también la alta variabilidad; los aislados de ésta especie se dividieron en dos grupos, en uno de ellos se ubicó la cepa 2124 y en el otro, la cepa 1424 se separó del resto, estos dos genotipos comparten características morfológicas pero se aislaron de la tina de la fermentación 2 y del lavadero, respectivamente, esto puede explicar su separación en el dendograma a diferencia del resto de los genotipos que se aislaron del inóculo (0115) y de los

Resultados

procesos fermentativos. En esta especie, el agrupamiento fue en función de las características morfológicas.

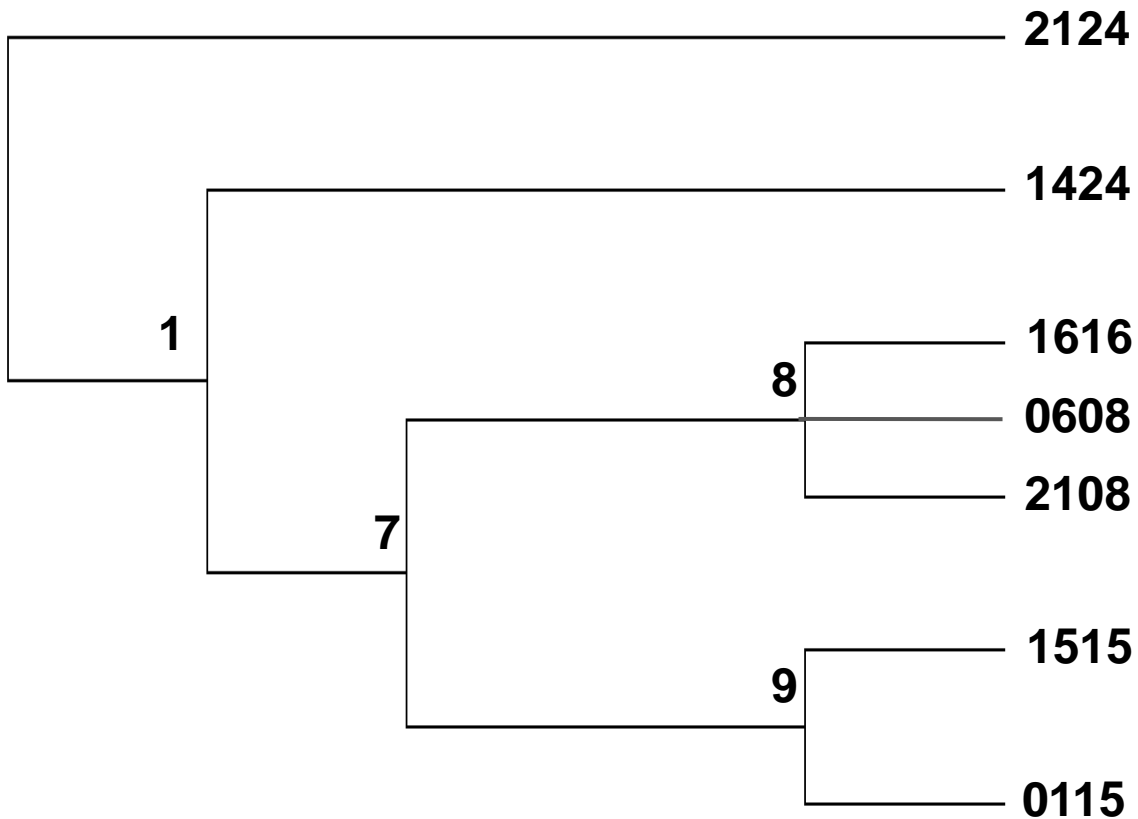


Figura 20.- Dendrograma de las cepas de *K. marxianus* obtenido por agrupamiento según el algoritmo UPGMA a partir de la matriz de Distancia Genética de Nei, con los 79 marcadores AFLP.

En el caso de los aislados de *T. delbrueckii* (Fig. 21), el genotipo 1607 se aisló de la tina con jugo fresco sin inocular, en donde se llevó a cabo la fermentación 2. Esta especie fue la que tuvo mayor porcentaje de polimorfismo y los valores de distancias genéticas a su vez fueron más altos que en las otras dos

Resultados

especies analizadas. El agrupamiento ocurrió según el lugar en el que fueron aisladas las levaduras, en el subgrupo superior del dendograma se asociaron las levaduras aisladas de la fermentación 1 y del inóculo, y en el subgrupo inferior se ubicaron las levaduras aisladas de la fermentación 2 y del “lavadero”.

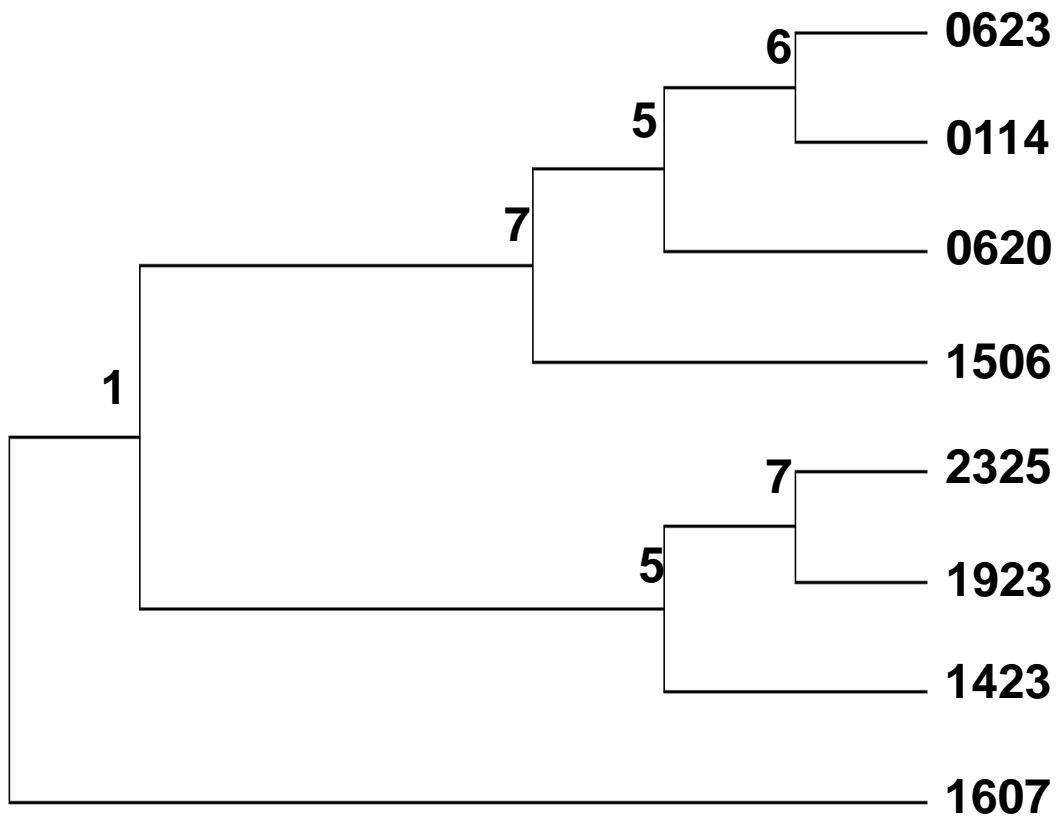


Figura 21.- Dendograma de las cepas de *T. delbrueckii* obtenido por agrupamiento según el algoritmo UPGMA a partir de la matriz de distancia Genética de Nei, con los 103 marcadores AFLP.

8.4.- EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LAS LEVADURAS A NIVEL MATRAZ

8.4.1.- Cinética de crecimiento y producción de etanol.

Para esta parte del proyecto se eligieron dos cepas de cada una de las levaduras que estuvieron presentes durante todo el proceso fermentativo del mezcal, la elección de dichas cepas fue a partir de diferentes grupos en los dendogramas obtenidos del análisis AFLP (Figs. 19, 20 y 21). La distancia genética entre las cepas de *S. cerevisiae* 902 y 2114 fue de 0.4758; entre las cepas de *K. marxianus* 608 y 1424, de 0.2586 y entre las cepas de *T. delbrueckii* 620 y 1423, la distancia genética fue de 0.7635.

El comportamiento de las distintas levaduras [*S. cerevisiae* --cepa 902 y 2114--Fig.22 (A) y (B); *K. marxianus* --cepas 608 y 1424--Fig. 23 (A) y (B); *T. delbrueckii* --cepas 620 y 1423--Fig. 24 (A) y (B), respectivamente] muestra que existe diferencia entre las especies de levadura estudiadas respecto a la síntesis de etanol (qp_{max}) y la utilización de los azúcares para la generación de biomasa ($Y_{x/s}$). Estos resultados fueron confirmados por un ANOVA, en el que con un 95% de confianza se encontraron diferencias significativas en los parámetros de $Y_{x/s}$ y qp_{max} (Anexo I). Después de la aplicación de la prueba de rangos múltiples con el método LSD, se encontró que la mayor diferencia se presenta entre las cepas *S. cerevisiae* 902 y *T. delbrueckii* 620 para $Y_{x/s}$; y para el caso de qp_{max} , la mayor diferencia se encontró entre las cepas *T. delbrueckii* 620 y *S. cerevisiae* 2114, sin

Resultados

embargo también hubieron diferencias entre las cepas de *S. cerevisiae* (Anexo II, Cuadro 11).

Respecto a los parámetros de velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}), velocidad específica de consumo de sustrato ($q_{s,max}$) y rendimiento de producto con base al sustrato ($Y_{p/s}$), el ANOVA arrojó que con el 95% de confianza, no hubo diferencia significativa entre las cepas estudiadas.

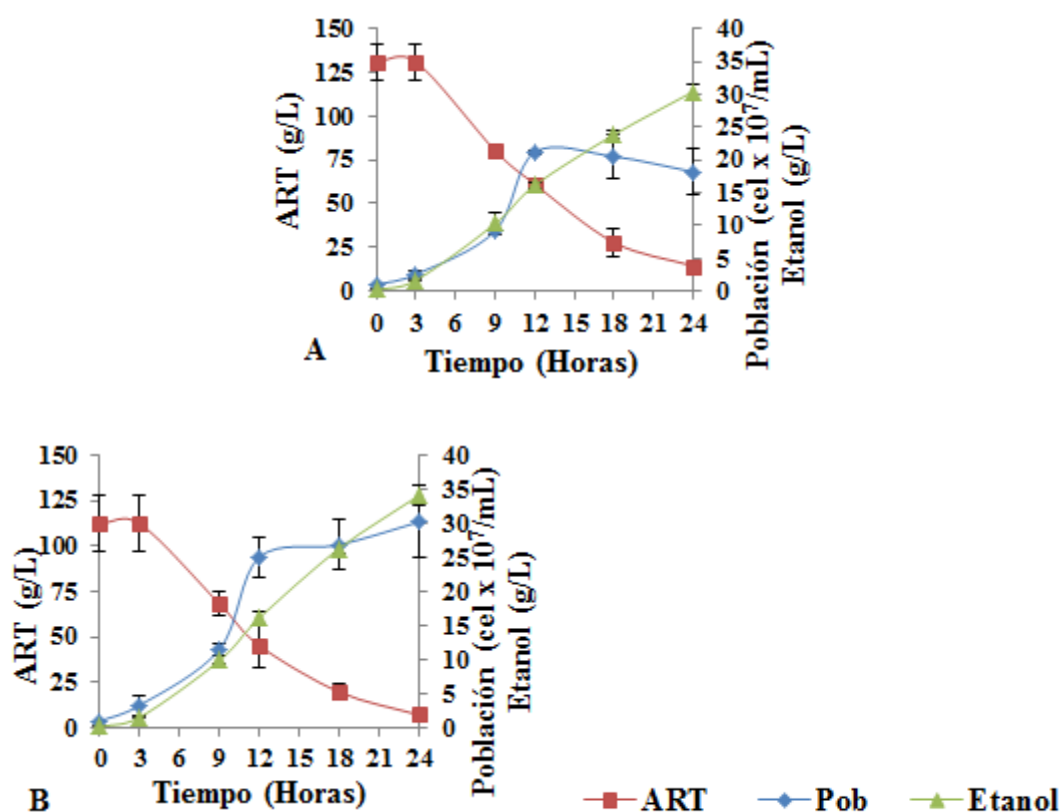


Figura 22.- Población, producción de etanol y consumo de azúcares reductores totales por *S. cerevisiae*; (A) cepa 902 y (B) cepa 2114; desarrolladas en medio de jugo de *Agave salmiana* suplementado con 1g/L de $(NH_4)_2PO_4$, a pH 4.5 a 30° C y 50 rpm.

Resultados

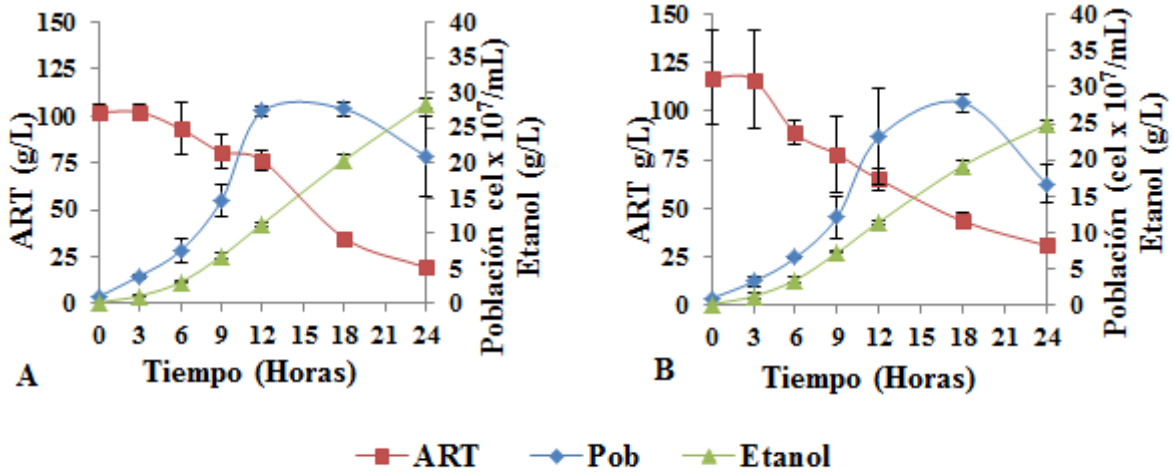


Figura 23.- Población, producción de etanol y consumo de azúcares reductores totales por *K. marxianus*; (A) cepa 608 y (B) cepa 1424; desarrolladas en medio de jugo de *Agave salmiana* suplementado con 1g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, a pH 4.5 a 30° C y 50 rpm.

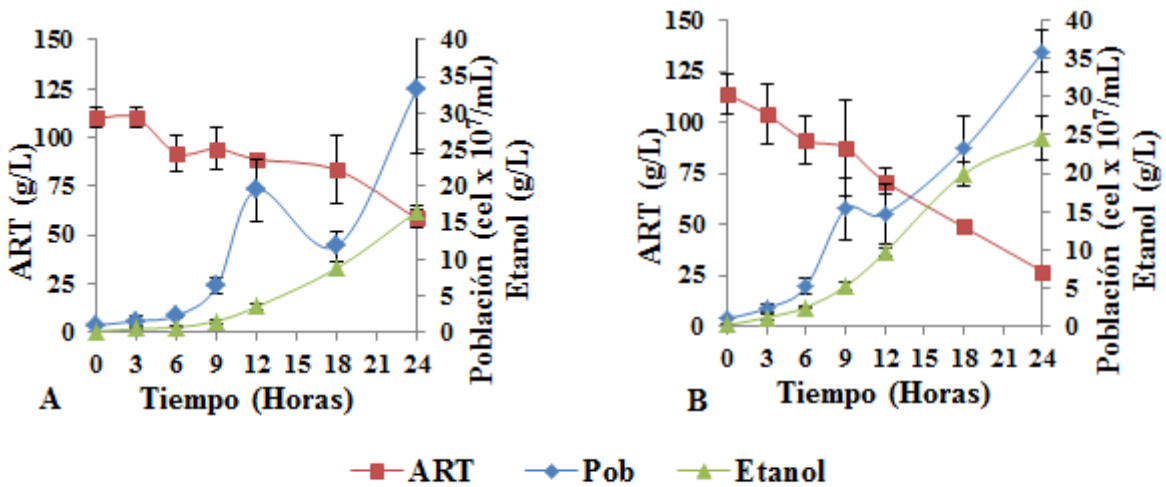


Figura 24.- Población, producción de etanol y consumo de azúcares reductores totales por *T. delbrueckii*; (A) cepa 620 y (B) cepa 1423; desarrolladas en medio de jugo de *Agave salmiana* suplementado con 1g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, a pH 4.5 a 30° C y 50 rpm.

Resultados

Cuadro 11.- Parámetros cinéticos del consorcio de levaduras aisladas del mezcal. Abreviaturas: μ_{\max} , Velocidad específica máxima de crecimiento; $q_{s\max}$, tasa de consumo específico máximo de sustrato; $q_{p\max}$, tasa específica máxima de generación de producto; $Y_{p/s}$, rendimiento de producto con base al sustrato y $Y_{x/s}$, rendimiento de biomasa con base al sustrato.

Cepas		μ_{\max} (h ⁻¹)	$q_{s\max}$ (g/g h ⁻¹)	$q_{p\max}$ (g/g h ⁻¹)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$Y_{x/s}$ (g/g)
<i>S. cerevisiae</i>	2114	0.53	5.52	0.72	0.34	0.30
<i>S. cerevisiae</i>	902	0.39	3.96	0.38	0.25	0.16
<i>K. marxianus</i>	608	0.54	1.44	0.21	0.35	0.28
<i>K. marxianus</i>	1424	0.39	2.56	0.25	0.30	0.23
<i>T. delbrueckii</i>	620	0.32	1.66	0.10	0.35	0.63
<i>T. delbrueckii</i>	1423	0.47	2.11	0.13	0.29	0.41

8.4.2.- Generación de compuestos volátiles mayoritarios

Las levaduras evaluadas en esta parte del estudio generaron los mismos compuestos volátiles entre sí, aunque en cantidades significativamente diferentes, como se presenta en las tablas de ANOVA y pruebas de rangos múltiples obtenidas con el método LSD (Anexo I y II, respectivamente).

Las cepas que exhibieron la mayor producción de los tres alcoholes superiores fueron las de *K. marxianus*. Contrariamente a la cepa 620 de *T. delbrueckii* que fue la que produjo menor concentración de cada uno de los compuestos (Fig. 25). En todos los casos, la presencia de isobutanol se hizo más evidente a partir de las 12 horas de cultivo. El comportamiento de cada uno de los alcoholes superiores fue lineal, como se pudo evidenciar con el análisis de regresión al 95% de confianza (Anexo IV).

Resultados

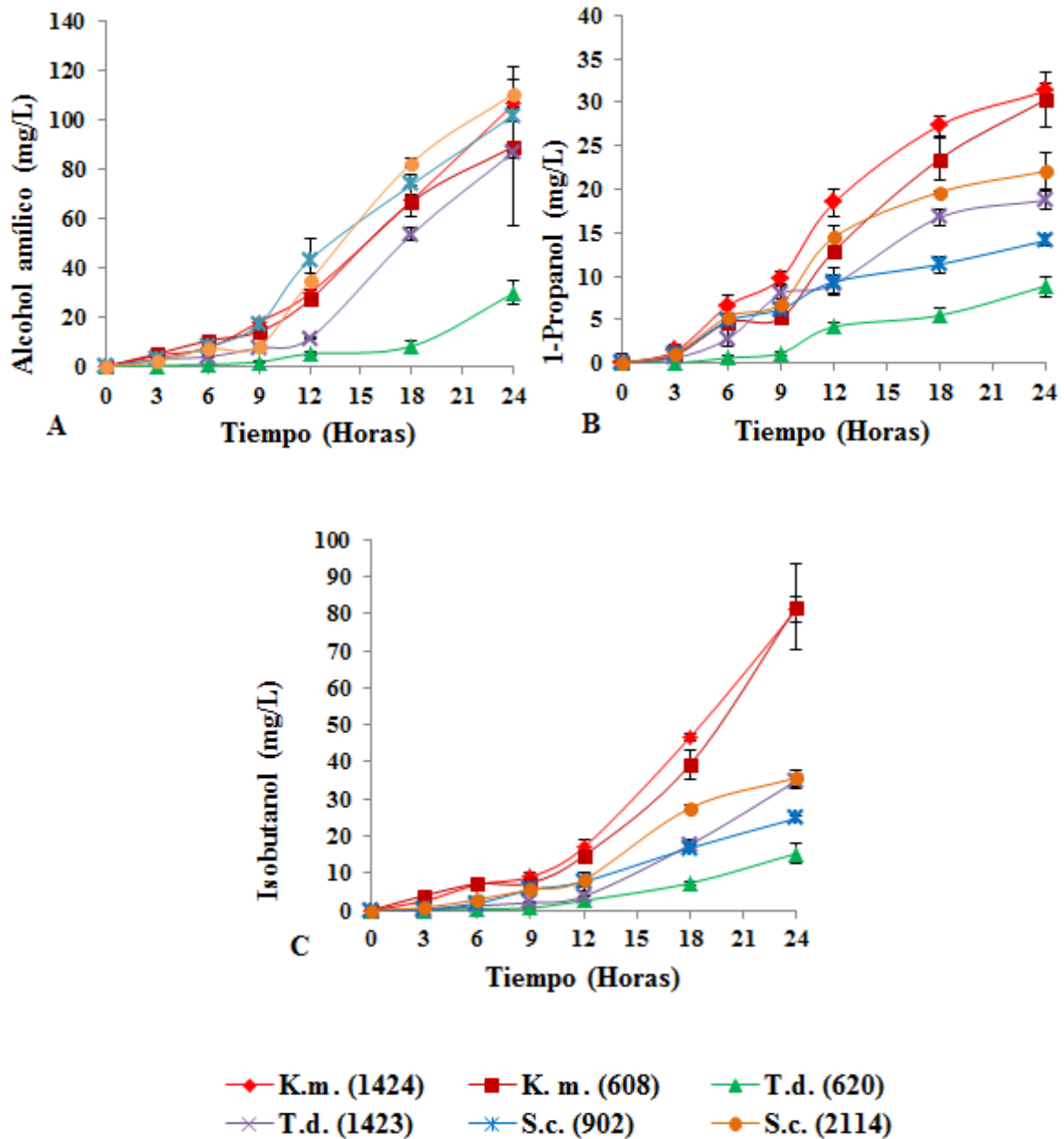


Figura 25.- Producción de alcoholes superiores en medio de jugo de *Agave salmiana* suplementado con 1g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, a pH 4.5 a 30° C y 50 rpm .A) Alcohol amílico, B) 1-Propanol, C) Isobutanol.

Resultados

Con respecto a los ésteres (Fig. 26), *S. cerevisiae* 902 produjo mayor cantidad de acetaldehído, que como en el caso de las fermentaciones en la fábrica, su comportamiento se ajustó a un modelo cuadrático. El acetato de etilo se comportó linealmente y las dos cepas de *K. marxianus* resultaron ser mejores productoras, ya que generaron tres veces más que el resto de las cepas.

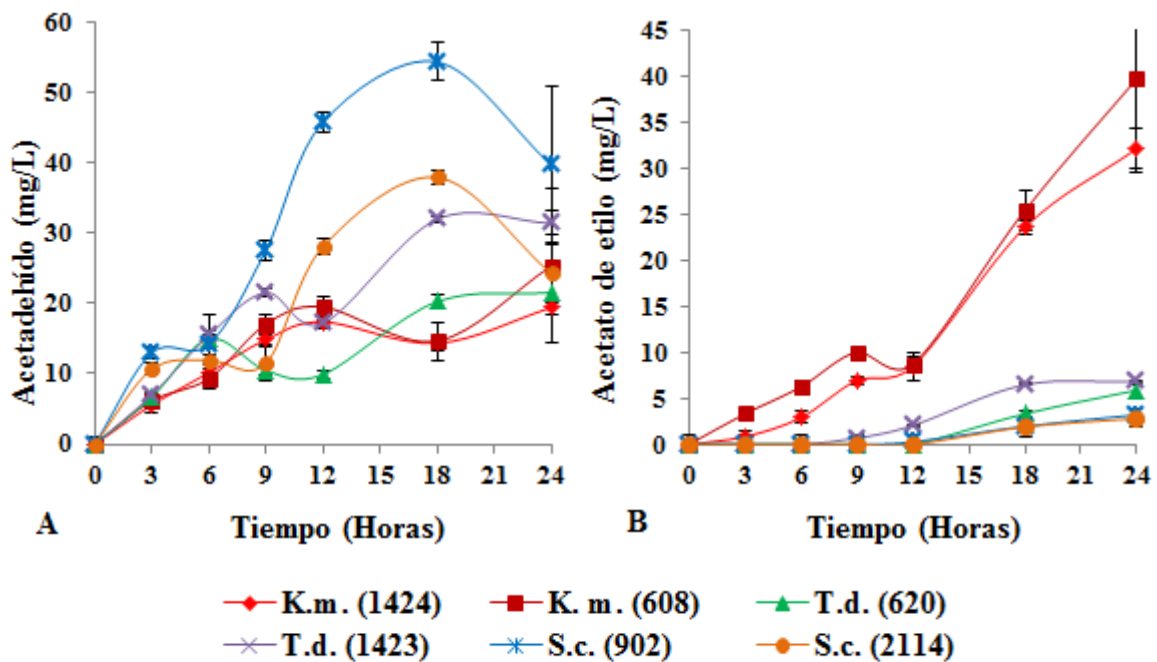


Figura 26.- Producción de acetaldehído (A) y acetato de etilo (B) por las diferentes cepas de levadura, desarrolladas en medio de jugo de *Agave salmiana* suplementado con 1g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, a pH 4.5 a 30° C y 50 rpm

9.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

9.1.- COMPOSICIÓN Y DIVERSIDAD DE LAS LEVADURAS

El proceso de caracterización morfológica facilitó la identificación molecular de las colonias aisladas. Con el empleo del medio WL se distinguieron más fácilmente las diferentes especies cultivables en las muestras, gracias a los distintos colores que adquieren las colonias, como lo documentan diversos autores (Pallman *et al.* 2001; Urso *et al.* 2008; Li *et al.* 2010).

Las técnicas moleculares han demostrado ser una herramienta útil en los estudios de taxonomía, ya que pueden generar información de los individuos hasta el nivel de especie, como es el caso del análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP).

En el caso de las levaduras, la región 5.8S-ITS ha sido ampliamente utilizada en estudios de identificación y caracterización de especies. Los patrones de restricción de esta región se han obtenido por la digestión con las enzimas CfoI (y recientemente su equivalente HhaI), HaeIII e HinfI, (González *et al.* 2006; Pando Bedriñana *et al.* 2010; Bautista-Gallego *et al.* 2011). En este trabajo, usando esta estrategia de identificación se encontró que la microbiota levaduriforme estuvo compuesta por ocho especies, pertenecientes a seis géneros, todos ellos del Orden taxonómico Saccharomycetales Kudryavtsev: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kluyveri*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Clavispora lusitaniae*, *Torulaspota delbrueckii*, *Candida ethanolica*, y *Saccharomyces exiguus*.

Se determinó la diversidad de los microorganismos encontrados en términos del Índice de Shannon-Wiener (H'), como lo reportaron también Luna-Pabello *et al.* (1996), Ben Omar y Ampe (2000) en muestras de pozol y Cordero-Bueso *et al.* (2011) quienes encontraron nueve especies de levaduras en dos tipos de viñedo (orgánico y convencional) cuyos índices de diversidad de Shannon-Wiener fueron de 1.64 y 1.62 respectivamente. En el caso de la fermentación 1 el valor más alto de diversidad fue de 0.641 en la etapa inicial del proceso, y al final disminuyó hasta 0.203, contrariamente a lo que ocurrió en la fermentación 2, donde en la etapa inicial el valor fue de 0.119 y este proceso terminó con un índice de Shannon-Wiener de 0.790.

El comportamiento de la diversidad se comprobó al realizar el análisis de regresión, en el que resultó que la diversidad en la fermentación 1 siguió un modelo cuadrático mientras que en el caso de la fermentación 2, el comportamiento fue lineal con respecto al tiempo de fermentación.

Los estudios que se han realizado con la intención de conocer la diversidad de las levaduras, se han enfocado a describir este parámetro con base en la composición de estos microorganismos en cada proceso. Desde este enfoque, numerosos autores han empleado una combinación de métodos dependientes e independientes de cultivo, con el propósito de estudiar el comportamiento de la microbiota que participa en la elaboración de productos fermentados y para entender la relación ecológica entre los microorganismos y cuál es su influencia sobre las características del producto final (Andorrà *et al.* 2010; Lacerda Ramos *et al.* 2010).

Zott *et al.* (2008) encontraron 19 especies de levaduras en el proceso de elaboración de vino en Francia, el cual incluye una maceración en frío antes de la fermentación; y reportaron como levaduras predominantes a *H. uvarum* y *C. zemplinina*.

Ocón *et al.* (2009) encontraron que en vinos provenientes de cuatro bodegas de la región de Rioja, en España; las levaduras no-*Saccharomyces* predominantes pertenecían a los géneros *Cryptococcus* y *Pichia*.

En otros trabajos con productos fermentados de interés comercial, por ejemplo en un estudio sobre la fermentación de aceitunas; a partir de la salmuera, Abriouel *et al.* (2011) encontraron *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida apicola*, *Pichia sp.* y *Pichia manshurica/Pichia galeiformis*, mientras que Bautista-Gallego *et al.* (2011) aislaron cepas de *Candida diddensiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranifaciens*, *Candida tropicalis*, *Pichia galeiformis*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Debaryomyces etchellsii*, *C. tropicalis*, *P. galeiformis* y *Kluyveromyces lactis* a partir de diferentes variedades de aceitunas.

En un trabajo previo a este, Escalante-Minakata *et al.* (2008) reportaron solamente la identificación de *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia fermentans* y *Clavispora lusitaniae* durante el proceso de fermentación de *Agave salmiana* ssp. *crassispina* en otra destilería en San Luís Potosí, usando también el análisis RFLP de la misma región, pero únicamente con una enzima de restricción; HaeIII, mientras que en este estudio, fueron identificadas ocho especies de levadura: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kluyveri*,

Saccharomyces exiguus, *Torulaspota delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Clavispora lusitaniae* y *Candida ethanolica*. Otra diferencia importante entre estos dos trabajos fue el medio de cultivo usado para el aislamiento de levaduras en placa; Escalante-Minakata *et al.* (2008) emplearon diferentes tipos de medio sólido, pero no utilizaron el medio WL. Así que las diferencias observadas entre los dos trabajos puede ser asociada al hecho de que las dos fábricas tienen diferente población de levaduras y/o al tipo de medio usado para el paso de aislamiento, en el que algunas de las levaduras no fueron detectadas.

En tequila Lachance (1995), encontró como especies dominantes en una fermentación espontánea a *S. cerevisiae*, *Z. bailii*, *Candida milleri* y *Brettanomyces anomala*; y como levaduras secundarias a *B. bruxellensis*, *Hanseniaspora guillermondii*, *H. vineae*, *P. membranifaciens*, *T. delbrueckii* y *K. marxianus*. Por lo tanto, con base en el estudio de Lachance (1995), hubo una mayor riqueza de levaduras en la fermentación de *Agave tequilana* que en la fermentación del *Agave salmiana*, esto tal vez está asociado a las características de la materia prima, por ejemplo, en lo que se refiere al contenido de saponinas, ya que son inhibidoras del crecimiento de las levaduras (Miyakoshi *et al.* 2000), y Pinos-Rodríguez *et al.* (2008) reportaron que las hojas de *Agave salmiana* en la edad madura contienen 11.1 g de saponinas por Kg de materia seca, esto es reforzado por Zamora *et al.* (2010) quienes mencionan que este agave posee un alto contenido de saponinas. Además de las características propias de la materia prima, también los factores ambientales de la región y las técnicas de manufactura influyen sobre la riqueza de levaduras, como lo mencionan Barata *et*

al. (2012), y que concuerda también con los resultados obtenidos por Segura-García (2010) quien en un estudio sobre la diversidad de las levaduras en el proceso de fermentación del mezcal de Oaxaca, que se elabora a partir de *Agave angustifolia*, encontró 26 especies de levaduras pertenecientes a 18 géneros, entre las que *S. cerevisiae* fue la especie más abundante, encontrando a lo largo del proceso de fermentación levaduras no-*Saccharomyces*. En la fábrica “Laguna Seca”, las tinas de fermentación son lavadas y cubiertas con cal antes de ser llenadas con el jugo de agave recién extraído, generándose así un hábitat poco adecuado para la proliferación de microorganismos que pudieran haber en el ambiente o que no sean resistentes a esas condiciones, aunque se encuentren presentes en el inóculo, como pudo haber ocurrido con *C. ethanolica*, aislada únicamente a partir de las muestras tomadas del contenedor en donde se desarrollaba el inóculo, pero que no se logró recuperar de ningún punto durante el proceso fermentativo.

En general la composición de levaduras es mayor en la fermentación del vino y otros productos fermentados, aún derivados de diferentes especies de *Agave*; que en el proceso de fermentación del mezcal caracterizado en este trabajo. En el proceso de elaboración del mezcal, las piñas de agave son sometidas a una etapa de cocción, y este tratamiento elimina todos los microorganismos presentes en la materia prima. Por el contrario, en el caso del vino la principal fuente de levaduras no-*Saccharomyces* son las uvas, las cuales son únicamente molidas y prensadas; así que los microorganismos presentes permanecen vivos y se inoculan al mosto fresco de vino.

Kluyveromyces, *Zygosaccharomyces* y *Torulaspota*; las principales levaduras no-*Saccharomyces* encontradas en este estudio han sido detectadas también en las fermentaciones de vinos, pero como no-*Saccharomyces* minoritarias y como posibles contaminantes (Ocón *et al.* 2010).

Kluyveromyces marxianus, la levadura mayoritaria no-*Saccharomyces* ha sido aislada de una gran variedad de hábitat y tiene un alto potencial en aplicaciones biotecnológicas, particularmente en la producción de enzimas (Fonseca *et al.* 2008). Pérez-Brito *et al.* (2007) reportaron a *K. marxianus* en plantas y mosto de henequén (*Agave fourcroydes*); Lachance, (1995) la encontró en la fermentación de tequila; Lappe y Ulloa (1993) en pulque, que resulta de la fermentación espontánea del aguamiel de diferentes especies de *Agave*. Así que *K. marxianus* se encuentra muy relacionada con las fermentaciones que se llevan a cabo usando *Agave* como materia prima.

Respecto al empleo de un método independiente de cultivo para conocer la diversidad de levaduras en este proceso, se tomaron en consideración los numerosos reportes sobre ecología microbiana de productos tales como el vino (Hesham *et al.* 2006; Di Maro *et al.* 2007; Andorrà *et al.* 2010); pozol (Ben Omar y Ampe, 2000), salami y salchichas italianas (Rantsiou *et al.* 2005; Aquilanti *et al.* 2007; Cocolin *et al.* 2011); fermentación de granos de café (Masoud *et al.* 2004) y cacao (Nielsen *et al.* 2005; Lefeber *et al.* 2011); productos tradicionales como el *cauim* --bebida fermentada a base de diversos granos producida artesanalmente en Brasil-- (Lacerda Ramos *et al.* 2010); queso (Dolci *et al.* 2010), aceitunas (Abriouel *et al.* 2011); entre otros, en los que se señala que el empleo del análisis

por DGGE es ventajoso ya que el número de especies encontradas incrementa respecto al obtenido por métodos tradicionales (i.e., dependientes de cultivo), y también es un método ideal para estudiar cualitativamente la variación espacial y temporal en una comunidad microbiana (Randazzo *et al.* 2009), como lo reportaron también Cocolin *et al.* (2011) en su revisión de la biodiversidad y dinámica de carnes fermentadas y recientemente para determinar el origen geográfico de algunas frutas. Sin embargo, a diferencia de estos estudios, en nuestro caso el número de especies detectadas por PCR-DGGE fue ligeramente menor al número de especies aisladas en placa; esto puede deberse a que en poblaciones mixtas de levaduras, por PCR-DGGE se detectan especies presentes en proporción 10-100 veces menos que otras, pero no cuando la proporción excede de 100 veces (Prakitchaiwattana *et al.* 2004; Cocolin *et al.* 2011), o cuando la población de levaduras desciende por debajo de 10^4 UFC/mL las bandas de DGGE empiezan a debilitarse o desaparecen. El hecho de que en el caso de las levaduras minoritarias *S. exiguus*, *P. kluyveri* y *Z. bailii*, las bandas detectadas fueron muy débiles puede explicarse por lo reportado por Mills *et al.* (2002) quienes mencionan que esto es aparentemente el resultado de una gran cantidad de ADN de *Saccharomyces* en este tipo de muestra, que compite con las pequeñas cantidades de templado proveniente de la amplificación de las levaduras no-*Saccharomyces*, como ocurrió en nuestro caso, donde la alta concentración de ADN templado de *S. cerevisiae* proviene de las muestras y no son producto del proceso de extracción, como podría suponerse en el caso de que esto se hubiera realizado con un kit especial para esta especie, ya que como lo demuestran Evans y Seviour (2012) en su estudio sobre diversidad de hongos en

lodos activados, se obtuvieron 10 ± 2 bandas con los cebadores NS1/GC y 7 ± 2 bandas con los cebadores FF390/FR1-GC cuando emplearon este kit para la extracción de ADN.

Por los resultados obtenidos con el método de PCR-DGGE, se deberá considerar como una perspectiva para el estudio más detallado de la composición de especies en este tipo de procesos, el empleo de otros métodos como el análisis metagenómico, que consiste en la clonación de ADN en un vector y el posterior análisis de los clones con marcadores filogenéticos mediante el empleo de sondas de hibridación o por la expresión de caracteres específicos tales como actividad enzimática (Randazzo *et al.* 2009; Temperton y Giovannoni, 2012; Vacharaksa y Finlay, 2012), u otras estrategias como la construcción de una librería de clonas (Li *et al.* 2010; Evans y Seviour, 2012).

9.2.- RELACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE LEVADURAS CON LA GENERACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN LA FERMENTACIÓN

La fermentación del jugo de *Agave* cocido para la producción del mezcal “Real de Magueyes” en la fábrica Laguna Seca en San Luís Potosí, como en el resto de las regiones mezcaleras; es un proceso complejo en el que se involucran una serie de factores tales como la calidad de la materia prima, las condiciones de la fábrica y desde luego, la composición de la microbiota presente en la misma.

Se han realizado pocos estudios acerca del comportamiento de levaduras aisladas específicamente a partir de fermentaciones de *Agave* y su papel en la generación de compuestos volátiles. En este sentido, Arrizon *et al.* (2006)

demonstraron que existen diferencias entre las levaduras aisladas de *Agave* y las levaduras aisladas de uva.

Los compuestos generados en el proceso fermentativo fueron desde luego el etanol, que se formó dependiente del consumo de azúcar en el mosto, y sin evidenciar diferencia significativa entre los dos procesos muestreados. El resto de los compuestos volátiles mayoritarios encontrados en estas muestras de mosto fermentado, fueron los mismos que reportaron De León–Rodríguez *et al.* (2006). Los alcoholes superiores también tuvieron correlación inversa con el consumo de azúcar, siendo estos compuestos los que alcanzaron la mayor concentración del resto de los volátiles (42.96 mg/mL y 27.51 mg/mL fermentación 1 y 2 respectivamente), igual que en los resultados reportados por estos autores en cuatro de los mezcales analizados (blanco, blanco con gusano, reposado, reposado con gusano y añejo) en su estudio, De León–Rodríguez *et al.* (2006) encontraron que el mezcal de *A. salmiana* reposado con gusano contuvo mayor cantidad de alcoholes superiores (0.8 mg/mL). La generación de estos altos niveles puede explicarse por el hecho de que estos compuestos se generan tanto por el anabolismo de aminoácidos que genera alcoholes superiores por transaminación como por el catabolismo de los azúcares por las levaduras (Usseglio-Tomasset, 1995; Voet *et al.* 1999).

El acetato de etilo fue otro de los compuestos mayoritarios que también encontraron De León–Rodríguez *et al.* (2006), y en este estudio se observó que la concentración de acetato de etilo aumentó conforme aumentó la asimilación de

azúcar, a partir del cual se genera directamente el etanol y acetil-CoA, que son los precursores del acetato de etilo.

En esta fábrica, los productores adicionan una fuente de nitrógeno inorgánico ($(\text{NH}_4)_2 \text{PO}_4$), lo que incrementa el consumo de azúcar y la velocidad de fermentación, de manera que se genera una gran cantidad de piruvato que luego es transformado a acetaldehído (Arrizon *et al.* 2007), y posteriormente es metabolizado por la enzima alcohol deshidrogenasa para la síntesis de etanol (Usseglio-Tomasset, 1995; Voet *et al.* 1999).

Es necesario tomar en cuenta que en este proceso, no solo participan las levaduras, sino que también se observó una cantidad considerable de bacterias durante el conteo directo al microscopio durante el muestreo, lo cual puede ser un factor importante en la generación de compuestos volátiles; dado que estudios previos han demostrado la presencia de bacterias lácticas tales como *Lactobacillus brevis*, *L. composti*, *L. plantarum*, *L. parvulus*, y *L. parabuchneri*, *L. pontis*, *L. kefir*, *L. plantarum* y *L. farraginis*; así como de *Zymomonas mobilis* en este tipo de fermentaciones (Escalante-Minakata *et al.* 2008; Narváez-Zapata *et al.* 2010).

Respecto al efecto que ejercen los compuestos generados en la fermentación sobre la diversidad de levaduras, se puede comentar que al inicio del proceso, los microorganismos presentes en el inóculo se desarrollan de manera conjunta, sin la generación significativa de etanol ni otros compuestos volátiles. Cuando hay una elevada concentración de azúcar, como es el caso de la

fermentación 1 (49.34 g/L), después de la fase de adaptación, el desarrollo de *S. cerevisiae* se dispara. Dado que esta levadura tiene alta capacidad fermentativa, la concentración de etanol y subproductos derivados de su metabolismo, aumenta; provocando la disminución de la diversidad, desde 0.641 hasta 0.203. Contrariamente a lo que sucedió en la fermentación 2, donde la producción de etanol y volátiles fue menor debido a la menor cantidad de fuente de carbono presente en este lote de materia prima, por lo tanto, en esta fermentación la diversidad aumentó al final del proceso hasta un valor de 0.790.

Es bien sabido que las levaduras no-*Saccharomyces* presentan baja tolerancia al etanol, esto explica el hecho de que *Z. bailii* y *C. lusitaniae* que son capaces de crecer hasta concentraciones de etanol de 12 g/L, en la fermentación 1 no sobrevivieron hasta el final del proceso (17.27 g/L). Aunado a lo anterior, según los resultados obtenidos, los alcoholes superiores (42.96 g/L y 27.51 g/L, en fermentación 1 y 2 respectivamente) también podrían ejercer un efecto negativo sobre el desarrollo de las levaduras no-*Saccharomyces*. Por otro lado, Zott *et al.* (2008) propusieron que hay alguna interacción negativa entre *S. cerevisiae* y las levaduras no-*Saccharomyces*, igual que otros autores lo señalaron antes (Nissen *et al.* 2003; Pérez-Nevado *et al.* 2006).

9.3.- VARIABILIDAD GENÉTICA DE LAS ESPECIES DE LEVADURAS PERSISTENTES DURANTE LA FERMENTACIÓN DEL MOSTO DE *A. salmiana* EN LA FÁBRICA “LAGUNA SECA”.

Un aspecto importante a considerar respecto de la diversidad, es lo referente a la variabilidad genética de cada especie, ya que en función de esta característica, será su capacidad de adaptación y de resistencia a los cambios ambientales. Se realizó el análisis AFLP a colonias de *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* que fueron las levaduras que persistieron durante todo el proceso en ambas fermentaciones y se construyeron tres dendogramas con las distancias genéticas de Nei (Piñero *et al.* 2008) entre los genotipos de cada una de ellas.

Los resultados muestran que la diversidad en términos de Heterocigosidad esperada (H_e) es elevada y además es la misma para las tres especies. Con la construcción de los dendogramas, se observó que algunas levaduras se agruparon de acuerdo a sus características morfológicas y al momento en el que fueron aisladas en el proceso fermentativo, lo cual coincide con Cocolin *et al.* (2006), quienes caracterizaron cepas de *Debaryomyces hansenii* provenientes de diferentes etapas de maduración de salchichas italianas, y encontraron que las cepas de *D. hansenii* presentes al inicio del proceso no son las mismas que se encuentran al final de la maduración. Aunque no se encontraron estudios para comparar la H_e en levaduras, si fue posible comparar los valores obtenidos en términos de polimorfismo en el caso de *S. cerevisiae*, nosotros encontramos un valor más alto de (66.5% en promedio con los dos marcadores) al comparar con los resultados de Flores-Berrios *et al.* (2005) quienes en su estudio sobre la diversidad genética entre levaduras de diferentes orígenes, emplearon como marcador de diversidad a los AFLP y al utilizar a los mismos cebadores que nosotros, el polimorfismo fue de 14.5% en promedio, y aunque sin datos

numéricos, Siesto *et al.* (2012), reportaron que *S. cerevisiae* presenta un alto polimorfismo en diversos marcadores moleculares tales como análisis de restricción del ADN mitocondrial (mtDNA-RFLP), cariotipos por campos pulsados (PFGE) y amplificación de las regiones inter delta.

9.4.- COMPORTAMIENTO DE LEVADURAS BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE LABORATORIO

Las propiedades organolépticas y el bouquet de las bebidas alcohólicas derivadas de agave, están determinadas por una mezcla de alcoholes, esteroides, y otros compuestos (De León Rodríguez *et al.* 2006; Escalante-Minakata *et al.* 2006); dichos compuestos son responsables del aroma y son generados por los microorganismos durante el proceso fermentativo.

Debido a que el mezcal es una bebida tradicional, obtenida de diferentes especies de agave, sus características organolépticas varían de una especie a otra y también de una fábrica a otra, y como mencionan Oliva *et al.* (2006), para producirlo bajo condiciones controladas que permitan obtener un producto de características de calidad estándar, es importante estudiar a fondo su microbiología, para hacer una adecuada selección de cultivos iniciadores.

En el Estado de San Luis Potosí, particularmente en la mezcalera “Laguna Seca”, se encontró que *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* permanecen durante todo el proceso fermentativo.

Para esta parte del estudio se evaluaron bajo condiciones controladas de laboratorio y a nivel de matraz, el crecimiento y la producción de etanol y volátiles mayoritarios de dos cepas de cada uno de los géneros anteriores, con el fin de obtener sus parámetros cinéticos, que pueden ser utilizados como base para la comparación del comportamiento de cada cepa de levadura, debido a que la bioquímica de la fermentación está influenciada tanto por la composición del mosto, como por el genotipo y su expresión en el fenotipo de las cepas involucradas en el proceso fermentativo, como mencionan Boulton y Quain (2001) y Lachenheimer *et al.* (2006).

Según los resultados obtenidos en esta última etapa del trabajo, el comportamiento de las levaduras no-*Saccharomyces* confirmó la importancia de estas especies en las fermentaciones estudiadas, dado que se encontró que las cepas de *K. marxianus* y *T. delbrueckii* no exhibieron diferencia significativa respecto a la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{\max}), igual a lo que demostraron también Niessen *et al.* (2003) en su estudio con *S. cerevisiae*, *K. thermotolerans* y *T. delbrueckii*, ellos comprobaron también que cuando las levaduras no-*Saccharomyces* se desarrollan en cultivos mixtos, su crecimiento se detiene más rápido. Respecto a lo anterior, en este estudio se observó que efectivamente *T. delbrueckii* alcanzó valores de biomasa mucho más elevados a los observados durante la fermentación en la fábrica en donde se encontraba acompañada de otras levaduras y además *S. cerevisiae* se desarrollaba como especie dominante.

Discusión de resultados

En las curvas de crecimiento de ambas cepas de *S. cerevisiae* y *K. marxianus*, el valor máximo de población se alcanza alrededor de las 12 horas de cultivo, y con esto se observa también un aprovechamiento significativo de azúcar, con la consecuente generación de etanol, lo que se comprueba porque no hay diferencia significativa en los parámetros cinéticos velocidad específica de consumo de sustrato ($q_{s_{max}}$) y rendimiento de producto con base al sustrato ($Y_{p/s}$). En el caso del comportamiento de *T. delbrueckii* (Fig. 24), aunque estos parámetros no fueron estadísticamente diferentes respecto de las otras dos especies, en las gráficas si se observa un distinto comportamiento de las curvas de crecimiento, esto puede ser explicado por la diferencia en la asimilación de glucosa entre esta levadura y las otras dos, como lo manifiestan Alves-Araújo *et al.* (2005) quienes caracterizaron una permeasa de baja afinidad a glucosa presente en *T. delbrueckii*.

Respecto a la caracterización de *K. marxianus*, Fonseca *et al.* (2007) reportaron que la cepa ATCC 26548 tuvo $\mu_{max} = 0.56 \text{ h}^{-1}$ cuando creció con glucosa como única fuente de carbono, y su rendimiento de biomasa fue de 0.51 g/g, en el caso de este trabajo, la cepa 608 tuvo $\mu_{max} = 0.54 \text{ h}^{-1}$ y la cepa 1424 $\mu_{max} = 0.39 \text{ h}^{-1}$, mientras que los rendimientos de biomasa fueron de 0.28 g/g y 0.23 g/g, respectivamente. En el estudio de Fonseca *et al.* (2007) el acetato fue uno de los metabolitos mayoritarios excretados al medio, tal y como ocurrió en este trabajo (cepa-1424 32.09 mg/mL y cepa 608-39.70 mg/mL). Así mismo, Las dos cepas de *K. marxianus* generaron más alcoholes superiores, sobre todo isobutanol (cepa 1424-80.88 mg/mL y cepa 608-81.65 mg/mL), en comparación con *S. cerevisiae*

(cepa 902-24.74 mg/mL y cepa 2114-35.70 mg/mL) y *T. delbrueckii* (cepa 620-15.28 mg/mL y cepa 34.83 mg/mL). La síntesis de estos compuestos es beneficiosa, ya que confieren al producto características organolépticas deseables, particularmente notas frutales (Dickinson, 2004), y se ha demostrado que las levaduras aisladas de fermentaciones espontáneas los generan en mayor cantidad que aquellas utilizadas en la panificación (Lachenheimer *et al.* 2006).

Con respecto a *T. delbrueckii*, los valores de rendimiento de biomasa con base al consumo de sustrato son los más altos de las tres especies; lo cual puede ser importante para la interacción microbiana, tal como lo es para otros productos fermentados (Deak, 2009).

Por otra parte, es interesante señalar las diferencias entre las cepas de la misma especie respecto a la síntesis de etanol, en este caso, hubo diferencia entre las cepas de las tres especies. Las cepas de *S. cerevisiae* tuvieron diferencias en la concentración de acetaldehído, de 1-propanol y de $q_{p_{max}}$. Entre las dos cepas de *T. delbrueckii* hubo diferencia en la síntesis de los tres alcoholes superiores; reiterándose una vez más que cada cepa de levadura posee características particulares.

Por lo anterior, como coinciden también Oliva *et al.* (2006), es importante caracterizar las levaduras nativas y el papel que juegan durante la fermentación, para que sea posible la optimización del proceso de producción de estas bebidas.

10.-CONCLUSIONES

En este trabajo se hizo la caracterización de la dinámica de las levaduras y su diversidad durante el proceso fermentativo en la fabricación del mezcal “Real de Magueyes” elaborado en la fábrica Ex-Hacienda “Laguna Seca” de San Luís Potosí, México. Partiendo desde la diferenciación morfológica con base en técnicas tradicionales para la posterior identificación con métodos moleculares dependientes de cultivo, se encontró que la utilización del medio WL brinda un excelente criterio de discriminación debido a la coloración que adoptan las colonias en las placas.

La composición de la microbiota de levaduras se determinó a través del análisis de RFLP de la región ITS-5.8S del rRNA y se identificaron ocho especies de levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kluyveri*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Clavispora lusitaniae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Candida ethanolica* y *Saccharomyces exiguus*; cuyas identidades se confirmaron por la secuenciación de la región D1/D2 del gen 26S del rDNA. Así mismo, mediante la aplicación del análisis de PCR-DGGE se confirmó la persistencia de *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* y *Torulaspora delbrueckii* a lo largo de los dos procesos estudiados.

La concentración de azúcar inicial afecta indirectamente la diversidad de levaduras en términos del índice de Shannon-Wiener durante la fermentación, ya que la concentración de azúcar, determina la cantidad de etanol y volátiles. En la fermentación 1, los alcoholes superiores mostraron tener correlación inversa

Conclusiones

estadísticamente significativa sobre el índice de Shannon-Wiener. En la fermentación 2 el índice de Shannon-Wiener aumentó linealmente con respecto al tiempo.

En estos procesos la especie dominante en ambas fermentaciones fue *S. cerevisiae*.

Al analizar la diversidad genética entre las cepas de las especies que persistieron durante todo el proceso fermentativo, se obtuvieron valores elevados de porcentaje de polimorfismo y H_e cercanos a 1 con el análisis AFLP. Esto se manifestó en la diferente capacidad de síntesis de alcoholes superiores, de etanol y acetaldehído, así como en la diferencia de algunos parámetros cinéticos.

Las cepas de *S. cerevisiae* tuvieron diferente velocidad específica de generación de producto ($q_{p_{max}}$) y alcanzaron distinta concentración de etanol, 1-propanol y acetaldehído. Las cepas de *T. delbrueckii* sintetizaron diferente concentración de isobutanol, alcoholes amílicos y 1-propanol.

La cantidad de *S. cerevisiae* en la fermentación espontánea en la fábrica, ejerce una influencia negativa sobre el desarrollo poblacional de *K. marxianus* y de *T. delbrueckii*.

K. marxianus resultó ser mejor productora de alcoholes superiores y de ésteres y *T. delbrueckii* presentó el mayor rendimiento de biomasa con base en la asimilación de sustrato de todas las cepas, lo que confirma la importancia de las levaduras no-*Saccharomyces* en estos procesos.

Conclusiones

Los resultados encontrados en este trabajo, abren la perspectiva de seguir explorando sobre la diversidad de la microflora autóctona, ya que es posible que alguna de las cepas participantes posea potencial biotecnológico, ya sea para mejorar y/o estandarizar la producción del mezcal en ésta fábrica o para ser utilizada en otros procesos.

11.-BIBLIOGRAFÍA

Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Gálvez, A. (2011). Culture-independent study of the diversity of microbial populations in brines during fermentation of naturally-fermented Aloreña green table olives. *Int. J. of Food Microbiol.* 144: 487–496.

Alves-Araújo, C., Hernandez-Lopez, M. J., Prieto, J. A., Randez-Gil, F. y Sousa, M. J. (2005). Isolation and characterization of the LGT1 gene encoding a low - affinity glucose transporter from *Torulaspota delbrueckii*. *Yeast.* 22: 165-175.

Andorrà L., Landi S., Mas A., Esteve-Zarzoso B., Guillamón J. (2010). Effect of fermentation temperature on microbial population evolution using cultura independent and dependent techniques. *Food Res. Int.* 43:773–779.

Andrade-Meneses O.E., Ruiz-Terán F. (2004). Study of yeast population in a mezcal fermentation. Poster PF 17, p. 157. 11th Int. congress on yeast. *Yeasts in Science and Technology. The quest for Sustainable Development.* Rio de Janeiro, Brazil.

Antunovics Z., Irinyi L., Sipiczki M. (2005). Combined application of methods to taxonomic identification of *Saccharomyces* strains in fermenting botrytized grape must. *J. Appl. Microbiol.* 98: 971-979.

APG III. (2009). An update the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants. *APGIII. Bot. J. Linn. Soc.* 161 :105-121.

Bibliografía

- Aquilanti L., Santarelli S., Silvestri G., Osimani A., Petruzzelli A., Clementi F. (2007). The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. *Int. J. of Food Microbiol.* 120: 136-145.
- Arias C. R., Burns J. K., Friedrich L. M., Goodrich R. M. Parish M. E., (2002). Yeast species associated with orange juice: Evaluating of different identification methods. *Appl. And Environ. Microbiol.* 68(4): 1955-1961.
- Arrizon J. P., Fiore C., Acosta G., Romano P., Gschaedler A. (2006). Fermentation behaviour and volatile production by agave and grape must yeasts in high sugar and grape must fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek.* 8:181–189.
- Arrizon, J., Gschaedler, A. (2007). Effects of the addition of different nitrogen sources in the tequila fermentation process at high sugar concentration. *J. of Appl. Microbiol.* 102:1123-1131.
- Barata A., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *Int. J. of Food Microbiol.* 153: 243–259.
- Barszczewski W., Robak M. (2004). Differentiation of contaminating yeasts in brewery by PCR-based techniques. *Food Microbiol.* 21:227-231.
- Bautista-Gallego J., Rodríguez-Gómez F., Barrio E., Querol A., Garrido-Fernández A., Arroyo-López F.N. (2011). Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *Int. J. of Food Microbiol.* 147:89–96.

Bibliografía

- Ben Omar N., Ampe F. (2000). Microbial community dynamics during production of the fermented maize dough pozol. *Appl. and Environ. Microbiol.* 66:3664-3673.
- Bleve G., Rizzotti L., Dellaglio F., Torriani S. (2003). Development of reverse transcription (RT)-PCR and real time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yogurts and pasteurized foods products. *Appl. and Environ. Microbiol.* 69:4116-4122.
- Boekhout T., R.J. Bandoni, J.W. Fell y K.J. Kwon-Chung. (1998). Discussion of teleomorphic and anamorphic genera of heterobasidiomycetous yeasts. The yeast, A Taxonomic Study. 3rd edition. Kurtzman C. y Fell J. W. (Eds). Elsevier Science, Amsterdam. Holanda. 3-6.
- Borst, A., Theelen, B., Reinders, E., Boekhout, T., Fluit, A. C., Savelkoul, P. H. M. (2003). Use of amplified fragment length polymorphism analysis to identify medically important *Candida spp.*, including *C. dubliniensis*. *J. of Clinical Microbiol.* 41:1357-1362.
- Boundy-Mills K. (2006). Methods for investigating yeast biodiversity. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook. Rosa C., Péter G. (Eds.). 67-100
- Boulton C., Quain D. 2001. Biochemistry of fermentation. *Brewing Yeast and Fermentation*. Blackwell Publishing Ltd.

Bibliografía

- Cadez N., Raspor P., De Cock A.W.A.M., Boekhout T., Smith M.Th. 2002. Molecular identification and genetic diversity within species of the genera *Hanseniaspora* and *Kloeckera*. FEMS Yeast Res. 1: 279-289.
- Cadez N., Poot G.A., Raspor P., Smith M.T. 2003. *Hanseniaspora meyeri* sp. Nov., *Hanseniaspora clermontiae* sp. Nov., *Hanseniaspora lachancei* sp. Nov. and *Hanseniaspora opuntiae* sp. Nov., novel apiculate yeast species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.53: 1671-1680.
- Capello M.S., Bleve G., Grieco F., Dellaglio F., Zacheo. 2004. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. J. Appl. Microbiol. 97: 1274-1280.
- Cházaro B. M. de J., Valencia P. O. M., Hernández R. P. (2007). Agaves silvestres usados en la elaboración de bebidas alcohólicas. Agaves Del Occidente de México. Vázquez-García J. A., Cházaro B. M. de J., flores-Berrios E. P., Vargas-Rodríguez Y. L. (Eds.). U. de G. CUCBA-CUCSH.CIATEJ.CRT. Louisiana state University. CONAFOR. 123-126.
- Cocolin, L., Heisey, A., Mills, D.A. (2001). Direct identification of the indigenous yeast in commercial wine fermentations. Am. J. of Enol. and Vitic. 52, 49-53.
- Cocolin L., Manzano A., Rebecca S., Comi G. (2002). Monitoring of Yeast Population Changes during a Continuous Wine Fermentation by Molecular Methods. Am. J. of Enol. Vitic. 53: 24-27.

Bibliografía

- Cocolin, L., Urso, R., Rantsiou.K., Cantoni, C., Comi, G. (2006). Dynamics and characterization of yeasts during natural fermentation of italian sausages. Fed.of Europ. Microbiological societies, Blackwell Publishing.20:1-10
- Cocolin L., Dolci P., Rantsiou K. (2011). Biodiversity and dynamics of meat fermentations: The contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem. Meat Sc. 89:296–302.
- Colunga-García Marín P., Larqué Saavedra A., Eguiarte L. E. y Zizumbo-Villarreal D., (2007). Presentación. En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcaes y otros agaves. Colunga-García Marín P., Larqué Saavedra A., Eguiarte L. E. y Zizumbo-Villarreal D. (Eds.). CICY, CONACYT, CONABIO, INE.
- Combina M., Elía A., Mercado L., Catania C., Ganga A., Martinez C. (2005). Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. Int. J. of Food Microbiol.99: 237-243.
- Conabio. 2006. Mezcales y diversidad, 2ª Edición. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- Cordero-Bueso G., Arroyo T., Serrano A., Tello J., Aporta I., Vélez M. D., Valero E. (2011). Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. Int. J of Food Microbiol. 145:132-139.
- Costa J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 22:299-305.

Bibliografía

- Dahllöf, I. (2000). Molecular community analysis of microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnol.*13:213-217.
- Deak T. (2009). Ecology and Biodiversity of Yeasts with Potential Value in Biotechnology. Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. T. Satyanarayana y Gotthard Kunze (Eds). Springer. 744 pp.
- Delaherche, A., Claisse O. y Lonvaud-Funel A. (2004). Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and 'ropy' *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *J. of Appl. Microbiol.* 97: 910-915.
- De León-Rodríguez, A., González-Hernández L., Barba de la Rosa A. P., Escalante-Minakata P., López M. G. (2006). Characterization of Volatile Compounds of Mezcal, an Ethnic Alcoholic Beverage Obtained from *Agave salmiana*. *J. Agric. Food Chem.* 54: 1337-1341.
- De León-Rodríguez, A., Escalante-Minakata, P., Barba de la Rosa, A.P., Blaschek, H.P. (2008). Optimization of fermentation conditions for the production of the mezcal from *Agave salmiana* using response surface methodology. *Chemical Engineering and Processing* 47:76-82.
- De Vuyst L., Vrancken G., Ravyts F., Rimaux T., Weckx S. (2009). Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food Microbiol.* 26:666-675.

Bibliografía

- Dias L., Dias S., Sancho T., Stender H., Querol A., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V. (2003). Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiol.* 20: 567-574.
- Díaz R.G., Wacher R.C. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 45: 30-40.
- Dickinson J. R. (2004). Life cycle and morphogenesis. The Metabolism and Molecular Physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Richard Dickinson y Michael Schweizer (Eds.). 2a edición. CRC PRESS.
- Di Maro E., Ercolini D., Coppola S. (2007). Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. *Int. J. of Food Microbiol.* 117: 201-210.
- Divol B., Miot-Sertier C., Lonvaud-Funel A. (2006). Genetic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* responsible for “refermentation” in botrytis-affected wines. *J. Appl. Microbiol.* 100: 516-526.
- Dolci, P., Alessandria, V., Rantsiou, K., Rolle, L., Zeppa, G., Cocolin, L. (2008). Microbial dynamics of Castelmagno PDO, a traditional Italian cheese, with a focus on lactic acid bacteria ecology. *Int. J. of Food Microbiol.* 122:302–311.
- Eguiarte L. (1995). Hutchinson (Agavales) vs. Huber y Dahlgren (Asparagales): análisis moleculares sobre la filogenia y evolución de la familia Agavaceae *sensu* Hutchinson dentro de las monocotiledóneas. *Bol. Soc. Bot. México.* 56:45-56.

Bibliografía

- Escalante A., Rodríguez M. E., Martínez A., López-Minguía A., Bolívar F. Y Gosset G. (2004). Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 235:273-279.
- Escalante A., Giles-Gómez M., Esquivel Flores G., Matus Acuña V., Moreno-Terrazas R., López-Munguía A., Lappe-Oliveras P. (2012). Pulque fermentation. Handbook of plant-based fermented food and beverage technology. Hui Y. H. (Ed) 2nd Ed.
- Escalante-Minakata, P., González Hernández L., Barba de la Rosa, A. P., De León-Rodríguez, A. (2006). El mezcal, una mezcla de alcoholes y feromonas. *Bebidas Mexicanas*. 15(3):10-18.
- Escalante-Minakata, P., Blaschek, H. P., Barba de la Rosa, A. P., Santos, L., De León-Rodríguez, A. (2008). Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of *Agave salmiana*. *Lett. in Appl. Microbiol.* 46:626-630.
- Esteve-Zarzoso B., Belloch C., Uruburu F., Querol A. (1999). Identification of yeasts by RFLP análisis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 329-337.
- Esteve-Zarzoso B., Perris-Torán M.J., Ramón D., Querol A. (2001). Molecular characterization of *Hanseniaspora* species. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 80: 85-92.

Bibliografía

- Estrada-Godina A. R., Cruz-Guerrero A. E., Lappe P., Ulloa M., García-Garibay M. y Gómez-Ruíz. (2001). Isolation and identification of killer yeasts from Agave sap (aguamiel) and pulque. *World J. of Microbiol. And Biotechnol.* 17:557-560..
- Evans T. N., Seviour R. J. (2012). Estimating biodiversity of fungi in activated sludge communities using culture-Independent Methods. 63:773-786.
- Fell, J. W., Boekhout T., Fonseca A., Scorzetti G., Statzell-Tallman A. (2000). Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int. J. of Systematic and Evol. Microbiol.* 50: 1351-1371.
- Felsenstein J. (2008). Phylogeny Inference Package. Version 3.68. Department of Genome Sciences and Department of Biology. University of Washington. USA
- Fernández Espinar M. T., López V., Ramón D., Bartra E., Querol A. (2001). Study of the authenticity of commercial wine yeasts strains by molecular techniques. *Int. J. of Food Microbiol.* 70:1-10.
- Fernández Espinar M. T., Barrio E., Querol A. (2003). Analysis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeasts.* 20:1213-1226.
- Fernández-Espinar M. T., Martorell P., De Llanos R., Querol A. (2006). Molecular Methods to Identify and Characterize Yeasts in Foods and Beverages. The

Bibliografía

Yeast Handbook Volume 2. Yeasts in Foods and Beverages. Querol A. y Fleet G. H. (Eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemania: 56-82.

Flores Berrios E.P., Alba González J.F., Arrizon Gaviño J.P., Romano P., Capece A., Gschaedler Mathis A. (2005). The uses of AFLP for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity between yeasts isolated from Mexican agave-distilled beverages and from grape musts. *Lett. in Appl. Microbiol.* 41: 147-152.

Fonseca, G.G., Heinzle, E., Wittmann, C., Gombert, A.K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 79, 339-354.

Freeland J. R., Kirk H., Petersen S. (2011). Genetic Analysis of single populations. Molecular Ecology. 2nd Edition. John Wiley and Sons. Ltd. 449 pp.

Fugelsang K.C., Edwards C.G. (2007). Microbial ecology During vinification. WINE MICROBIOLOGY: Practical Applications and Procedures. Second edition. Springer: 82-101.

García Mendoza A. (1998). Con sabor a maguey. Guía de la colección nacional de Agavaceas y Nolináceas del jardín botánico del Instituto de Biología-UNAM SIGSA, México.

Gardini F., Suzzi G., Lombardi A., Galgano F., Crudele M. A., Andrighetto C., Schirone M., Tofalo R. (2001). A survey of yeasts in traditional sausages of southern Italy. *FEMS Yeasts Res.* 1:161-167.

Bibliografía

- Gibson U. E. M., Heid C. A., Williams P. M. (1996). A Novel Method for Real Time Quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6: 995-1001.
- Good-Ávila S. V., Souza V., Gaut B. S. y Eguiarte L. E. (2006). Timing and rate of speciation in Agave (Agavaceae). *PNAS.* 103:9124-9129
- González, S. S., Barrio, E., Querol, A. (2006). Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (Canary Island, Spain). *J. of Appl. Microbiol.* 102, 1018.-1025.
- González-Techera A., Jubany S., Carrau F. M., Gaggero C. (2001). Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers. *Lett. in Appl. Microbiol.* 33:71-75.
- Gschaedler A., Ramirez Cordova J., Diaz Montañó D., Herrera Lopez E., Arellano Plaza M., Arrizon Gaviño J., Pinal Zuazo L. (2004). Fermentación: etapa clave en la elaboración del tequila. Ciencia y Tecnología del Tequila- Avances y Perspectivas. CIATEJ. Guadalajara, Jalisco, México: 61-120.
- Guerra J.B., Araujo R.A.C., Parato C., Franco G.R., Moreira E.S.A., Mendonca-Hagler, Rosa C.A. (2001). Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24h fermentative cycle for the production of artisanal Brazilian cachaca. *Lett. in Appl. Microbiol.* 33: 106-111.
- Guillamón J. M., Sabaté J., Barrio E., Cano J., Querol A. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* 169: 387-392.

Bibliografía

- Haesham A. E.-L., Khan S., Liu X., Zang Y., Wang Z. And Yang M. (2006). Application of PCR-DGGE to analyse the yeast population dynamics in slurry reactors during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in weathered oil. *Yeast Res.* 23: 879-887.
- Hein I., Lehner A., Rieck P., Klein K., Brandl E., Wagner M. (2001). Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. *Appl. and Environ. Microbiol.* 67: 3122-3126.
- Hennequin C., Thierry A., Richard G. F., Leontren G., Nguyen H. V., Gaillardin C., Dujon B. (2001). Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. of Clinical Microbiol.* 39(2):551-559.
- Hierro, N., Esteve Zarzoso B., Mas A., Guillamón J. M. (2007). Monitoring of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation by real-time quantitative PCR. *FEMS Yeast Res.* 7(8): 1340-1349.
- Hierro, N., Esteve Zarzoso B., González A., Mas A., Guillamón J. M. (2006). Real-Time Quantitative PCR (QPCR) and Reverse Transcription-QPCR for Detection and Enumeration of Total Yeasts in Wine. *Appl. and Environ. Microbiol.* 72(11): 7148-7155.
- Instituto de Nacional de Estadística y Geografía. (2009). Prontuario de información geográfica de los Estados Unidos Mexicanos, charcas, San Luís Potosí. <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datosgeograficos/24/24015.pdf>

Bibliografía

- Jepersen L., Nielsen D.S., Hønholt S., Jakobsen M. (2005). Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Res.* 5: 441-453.
- Jubany S., Tomasco I., Ponce de León I., Medina K., Carrau F., Arrambide N., Naya H., Gaggero C. (2007). *FEMS Yeast Res.* 8:472-484.
- Kim, T.W., Lee, J.H., Kim, S.E., Park, M.H., Chang, H.C., Kim, H.Y. (2009). Analysis of microbial communities in doenjang, a Korean fermented soybean paste, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. of Food Microbiol.* 131, 265-271.
- Kurtzman, C.P. (1998). Discussion of teleomorphic and anamorphic ascomycetous yeasts and a key to genera. The yeast, A Taxonomic Study. 3rd edition. Kurtzman C. y Fell J. W. (Eds). Elsevier Science, Amsterdam. Holanda. 3-6.
- Kurtzman, C.P.; Fell, J.W. (1998). Definition, classification and nomenclature of the yeasts. The yeast, A Taxonomic Study. 3rd edition. Kurtzman C. y Fell J. W. (Eds). Elsevier Science, Amsterdam. Holanda. 3-6.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial subunit. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 331-371.01.
- Kusiluka, L., J., M., Ojeniyi, B., Frus, N., F., Kokotovic, B., Ahrens, P. (2001). Molecular epidemiology of contagious bovine pleuroneumonia in Tanzania

Bibliografía

based on amplified fragment length polymorphism and pulsed-field gel electrophoresis analysis. J. of Vet. Med. 48:303-312.

Lacerda Ramos C., Gonzaga de Almeida E., de Melo Pereira G. V., Gomes Cardoso P., Souza Dias E., Schwan R. F. (2010). Determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture-independent methods. Int. J. of Food Microbiol. 140:225–231.

Lachance, M. A. (1995). Yeast communities in a natural tequila fermentation. Antonie van Leeuwenhoek. 68:151-160.

Lachance M. A., Starmer W.T. (1998). Ecology and yeasts. The Yeasts. A Taxonomic Study. 3rd edition. Kurtzman C. y Fell J. W. (Eds). Amsterdam, Holanda. 14-30

Lachenmeier D., Sohnius E. M., Rainer A., y Loä Pez M. G. (2006). Quantification of Selected Volatile Constituents and Anions in Mexican Agave Spirits (Tequila, Mezcal, Sotol, Bacanora). J. of Agricul. and Food Chem. 54: 3911-3915.

Lappe, P., Ulloa, M. (1993). Microbiología del Pulque. Alimentos fermentados indígenas de México . Wachter, M.C. and Lappe, P. Eds. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 75-80.

Lappe P., Ulloa M., Arce-Rocha G., Cáceres-Farfán M., Tapia-Tussel R., Perez-Brito D. y Larquais A. (2004). Isolation and identification of the mycobiota

Bibliografía

present in *Agave fourcroydes*. 11th International congress of yeast. Rio de Janeiro, Brasil.

Lappe-Oliveiras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizon-Gaviño, J., Herrera-Suarez, T., García-Mendoza, A., Gschaedler-Mathis, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic non-distilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Research* 8, 1037-1052.

Lappe-Oliveiras P. y R. Moreno-Terrazas. Pulque. Bebida milenaria que persiste en la actualidad. En *Bebidas y regiones II. Origen, producción, usos y costumbres*. compilado por Camilo Contreras Delgado e Isabel Ortega Ridaura (En prensa).

Lappe P., R. Moreno -Terrazas. T. Herrera. C. Wachter. F. Ruis Terán. M. Ulloa and A-B. Lappe Masilla. Mexican Alcoholic Fermented Foods. En A., M. Giles-Gómez, G. Esquivel, V. Matus Acuña, R. Moreno Terrazas, A. López-Munguía, P. Lappe-Oliveiras. (2012) Pulque fermentation. En Y H Hui (Editor). *Handbook of plant-based fermented foods and beverage technology* CRC Press , Florida USA, 1900pp.

Las Heras-Vázquez F.J., Mingorance-Cazorla L. Clemente-Jiménez J.M. y Rodríguez-Vivo F. (2003). Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Res.* 3: 3-9.

Bibliografía

- Lefeber T., Gobert W., Vrancken G., Camu N., De Vuyst L. (2011). Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. *Food Microbiol.* 28:457–464.
- Li Ch. Liu W. Zhu P., Yang J., Cheng K. (2010). Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Gelliodes carnosa* collected from the Hainan Island Coastal waters of the South. *Microb. Ecol.* 62:800-812.
- Li S., Cheng Ch., Li Z., Chen J., Yan B., Han B., Reeves M. (2010). Yeast species associated with wine grapes in China. *Int. J. of Food Microbiol.* 138:85–90.
- Luna Pabello V. M. Aladro-Lubel M. A., Durán de Bazúa C. (1996). Biomonitoring of wastewaters in treatment plant using ciliates. *J os IndustrialMicrobiol.* 17:62-68.
- Margalef R. (1998). La diversidad. Ecología. Ediciones Omega. Barcelona, España. 951pp.
- Martínez C., S. Gac, Lavín A., Ganga M. (2004). Genomic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from wine-producing areas in South America. *J. of Appl. Microbiol.* 96: 1161-1168.
- Masoud W., Cesar L. B., Jespersen L. and Jakobsen M. (2004). Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Yeast Res.* 21: 549–556.

Bibliografía

- Masneuf I., Hansen J., Groth C., Piskur J., Dubourdieu D. (1998). New hybrids between *Saccharomyces Sensu stricto* yeasts species found among wine and cider production strains. *Appl. and Environ. Microbiol.* 64(10): 3887-3892.
- Meroth C.B., Hammes W.P., Hertel C. (2003). Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. and Environ. Microbiol.* 69: 7453-7461.
- Meroth C.B., Walter J., Hertel C., Brandt M. J., Hammes W.P. (2003). Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. and Environ. Microbiol.* 69: 475-482.
- Meudt A. M., Clarke A. C. (2007). Almost forgotten or Latest Practice? AFLP applications, analyses and advances. *TRENDS in Plant Science.* 12,3:106-117.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426-428.
- Mills, D.A., Johannsen, E.A., Cocolin, L. (2002). Yeast diversity and persistence in botrytis affected wine fermentations. *Appl. and Environ. Microbiol.* 68, 4884-4893.
- Miyakoshi M., Masuda H., Mizutani K., Tanaka O., Ikeda T., Ohtani K., Kasai R., Yamasaki K. (2000). Antiyeast steroidal saponins from *Yucca shidigera*

Bibliografía

- (*Mohave yucca*), a new anti-food-deteriorating agent. *J. Nat. Prod.* 63:332–338.
- Muyzer G., de Waal E., Uitterlinden A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polimerase Chain Reaction-Amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. And Environ. Microbiol.*59(3):695-700.
- Narváez-Zapata J. A., Rojas-Herrera R. A., Rodríguez-Luna I. C., Larralde-Corona C. P. (2010). Culture-Independent Analysis of Lactic Acid Bacteria Diversity Associated with Mezcal Fermentation. *Curr Microbiol.* 61:444–450.
- Neeley E. T., Phister T. G., Mills D.A. (2005). Differential real-time PCR assay for enumeration of lactic acid bacteria in wine. *Appl. and Environ. Microbiol.* 71: 8954-8957.
- Nielsen, D. S., Hønholt, S., Tano-Debrah, K., Jespersen, L. (2005). Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analyzed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *FEMS Yeast Res.* 22:271–284.
- Nieves H. G., Luquín S. H., Ayala R. J. (2007). Fibras y artesanías con *Agave*. Agaves del Occidente de México, serie Fronteras de Biodiversidad. Vázquez-García J. A., Cházaro B. M., Flores Berrios E.,
- Nissen, P., Nielsen, D., Arneborg, N. (2003). Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentration cause early growth arrest of non-*Saccharomyces*

Bibliografía

- yeast in mixed cultures by cell a cell contact-mediated mechanism. FEMS Yeast Res. 20:331-341.
- Ocón E., Gutiérrez A.R., Garijo P., López R., Santamaría P. (2010). Presence of non-Saccharomyces yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time. Food Microbiol. 27:1023-1027.
- Oliva A. A., Sifuentes R. A. M., Bocanegra V., Larralde C. P., Jacques H. C. (2006). Diversidad genética de Levaduras Alcohol-Fermentativas Nativas delMezcal de Tamaulipas. V Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN. 28 Nov.al 1 Dic. México, D.F. Red de Biotecnología del IPN.
- Pallmann C. L., Brown J. A., Olineka T. L., Cocolin L., Mills D. A. y Bisson L. F. (2001). Use of WL Medium to Profile Native Flora Fermentations. Am. J. Enol. Vitic., 52 (3): 198-203.
- Pando Bedriñana R., Querol Simón A., Suárez Valles B. (2010). Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. Food Microbiol. 27:503-508.
- Pérez Brito D., Tapia Tussell R., Quijano-Ramayo A., Larqué-Saavedra A., Lappe P. (2007). Molecular Characterization of *Kluyveromyces marxianus* Strains Isolated from *Agave fourcroydes* (Lem.) in Yucatan, Mexico. Molecular Biotechnol. 37:181-186.
- Pérez M. A., Gallego F. J., Martínez I., Hidalgo P. (2001). Detection, distribution and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of yeasts

Bibliografía

- Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers. Lett. In Appl. Microbiol. 33:461-466.
- Pérez-Navado, F., Albergaria, H., Hogg, T., Girio, F. (2006). Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. Int. J. of Food Microbiol. 108:336-345.
- Phister T. G., Mills D.A. (2003). Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. Appl. and Environ. Microbiol. 69: 7430-7434.
- Pinos-Rodríguez J. M., Zamudio M., González S. S. (2008). The effect of planta ge on the chemical composition of fresh and ensiled Agave salmiana leaves. South African J. of Animal Science. 38(1):43-50.
- Piñero, D., Barahona A., Eguiarte L., Rocha Olivares A., Salas Lizana R. (2008). La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 415-435.
- Prakitchaiwattana C.J., Fleet, G., Heard, G.M. (2004). Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. FEMS Yeast Res. 4:865-877.
- Pretorius I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millenium: novel approaches to the ancient art of winemaking. FEMS Yeast Res. 16: 775-729.

Bibliografía

- Querol A., Barrio E. (1990). A rapid and simple method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* 18(6):1657.
- Querol A., Barrio E., Huerta T., Ramón D. (1992). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. And Environ. Microbiol.* 58(9): 2948-2953.
- Qin Y., Liu X., Zhang H., Guo X. (2007). Genetic mapping of sized-related quantitative trait loci (QTL) in the bay scallop (*Argopecten irradians*) using AFLP and microsatellite markers. *Aquaculture.* 272:281-290.
- Randazzo C. L., Caggia C., Neviani E. (2009). Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *J of Microbiol Methods.* 78:1-9.
- Rantsiou K., Urso R., Iacumin L., Cantoni C., Cattaneo P., Comi G., Cocolin L. (2005). Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of italian fermented sausages. *Appl. and Environ. Microbiol.* 71:1977-1986.
- Rantsiou, K., Cocolin, L. (2006). New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: A review. *Int. J. of Food Microbiol.* 108:255-267.
- Reijans M., Lascaris R., Groeneger A. O., Wittenberg A., Wesselink E., van Oeveren J., De Wit E., Boorsma A., Voetdijk B., van der Spek H., Grivell L. A., Simons G. (2003). Quantitative comparison of cDNA-AFLP, microarrays, and

Bibliografía

- GeneChip expression data in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genomics*. 82:606-618.
- Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A. (2007). Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 75:149–164.
- Restrepo S., Duque M. Tohme J., Verdier V. (1999). AFLP fingerprinting: an efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Microbiol.* 145:107-114.
- Rocha M., Good-Ávila S. V., Molina-Freaner F., Arita H. T., Castillo A., García-Mendoza A., Silva-Montellano A., Gaut B. S., Souza V. y Eguiarte L. (2006). Pollination biology and adaptative radiation of Agavaceae, with special emphasis on the genus *Agave*. *Aliso*. 22:329-344.
- Romano P., Fiore C., Paraggio M., Caruso M., Capece A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int. J. of Food Microbiol.* 86:169-180.
- Romano P., Capece A., Jespersen L. (2006). Taxonomic and Ecological Diversity of Food and Beverage Yeasts. The Yeast Handbook Volume 2. Yeasts in Foods and Beverages. Querol A. y Fleet G. H. (Eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemania: 13-53.
- Saldívar A. M., Vargas-Rodríguez Y. (2007). Usos de agaves en el México prehispánico. Agaves del Occidente de México, serie Fronteras de Biodiversidad. Vázquez-García J. A., Cházaro B. M., Flores Berrios E.,

Bibliografía

- Vargas-Rodríguez Y. (Eds). U de G, Consejo Regulador del tequila, CIATEJ,LSU, CONAFOR.
- Sánchez-Marroquín A., Hope P. H. (1953). Agave juice fermentation and chemical composition studies of some species. *J. of Agricultural and Food Chemistry* 1: 246-249.
- Schwartz D. C., Cantor C. R. (1984). Separation of Yeast Chromosome-Sized DNAs by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis. *Cell.* 37:67-75.
- SECRETARIA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL. NORMA Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones.
- Segura-García L. E. (2010). Identificación y caracterización por métodos moleculares de levaduras aisladas del proceso de elaboración del mezcal en el Estado de Oaxaca. Tesis de Maestría en ciencia y Tecnología. CIATEJ y PICyT. Guadalajara, Jalisco, México. 177 pp.
- Siesto G., Capece A., Sipiczki M., Csoma H., Romano P. (2012). Polymorphism detection among wild *Saccharomyces cerevisiae* strains of different wine origin. *Ann. Microbiol.* DOI 10.1007/s13213-012-0516-6.
- Tapia-Tussell, R., Lappe P., Ulloa M., Quijano-Ramayo A., Cáceres-Farfán M., Larqué-Saavedra A. y Perez-Brito D. (2006). A Rapid and Simple Method for DNA Extraction From Yeasts and Fungi Isolated From *Agave fourcroydes*. *Molecular Biotechnol.* 33:67-70.

Bibliografía

- Temperton B., Giovannoni S. J. (2012). Metagenomics: microbial diversity through a scratched lens. En prensa. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2012.07.001>
- Tu R-J, Wu H-Y, Lock Y-S, Chen M-J. (2010). Evaluation of microbial dynamics during the ripening of a traditional Taiwanese naturally fermented ham. *Food Microbiol.* 27:460-467.
- Usseglio-Tomasset L. (1995). Chimie des fermentations. Chimie Oenologique. 2nd Edition. Laviosier Tec & Doc. France.387 pp.
- Urso, R., Rantsiou, K., Dolci, P., Rolle, L., Comi, G., Cocolin, L. (2008). Yeast biodiversity and dynamics during sweet wine production as determined by molecular methods. *FEMS Yeast Res.* 8:1053-1062.
- Valadez-Blanco R., Bravo-Villa G., Santos-Sánchez N. F., Velasco-Almendarez S. I. y Montville T. J. (2012). The artisanal production of pulque, a traditional beverage of the Mexican Highlands. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 4:140-144.
- Vacharaksa A., Finlay B. B. (2012). Gut microbiota: Metagenomics to study complex ecology. *Dispatch.* R569.
- Vasdinyei R., Deák T. (2003). Characterization of yeast isolated originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *Int. J. of Food Microbiol.* 86:123-130.
- Vázquez Díaz E., García Nava J. R., Peña Valdivia C. B., Ramírez Tobías H. M., Morales Ramos V. (2011). Tamaño de la semilla, emergencia y desarrollo de

Bibliografía

- la plántula de maguey (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck). Rev. Fitotec. Mex. 34(3):167-173.
- Vázquez-García J. A., Cházaro B. M. De J., Hernández V. G. H., Vrgas-Rodríguez Y. L., Zamora T. M. Del P. (2007). Taxonomía del Género Agave en el Occidente de México: Una panorámica preliminar. Agaves Del Occidente de México. Vázquez-García J. A., Cházaro B. M. de J., flores-Berrios E. P., Vargas-Rodríguez Y. L. (Eds.). U. de G. CUCBA-CUCSH.CIATEJ.CRT. Louisiana state University. CONAFOR. 38-82.
- Voet D., Voet J. G. y Pratt Ch. (1999). Glucose Catabolism, Fundamentals of biochemistry. Ed.Wiley. USA. 930 pp.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23(21):4407-4414.
- Williams J. G.K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18 (22): 6531-6535.
- Zamora P. C. B., Juárez F. J. R., Aguirre R. D., Ortiz P. C., Godínez H.G., Álvarez F. (2010). Variación de la concentración de azúcares y saponinas durante la cocción del maguey mezcalero potosino. e-Gnosis [online] 8:1–11.
- Zizumbo-Villarreal D., González-Zozaya F., Olay-Barrientos A., Platas-Ruiz R., Cuevas-Sagardí M., Almendros-López I., Colunga-García Marín P. (2009).

Bibliografía

Archaeological evidence of the cultural importance of *Agave* spp. in pre-Hispanic Colima, México. *Economic Bot.* 63(3):288-302.

Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Masneuf-Pomarede, I., Lonvaud-Funel, A. (2008). Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *Int. J. of Food Microbiol.* 125:197-203.

12.- ANEXOS

ANEXO I: ANÁLISIS DE AFLP

Se inició con la digestión de las muestras que fueron preparadas como se describe y posteriormente se incubaron durante dos horas a 37°C y 15 minutos a 70°C para detener la reacción.

Mezcla de Digestión:

Buffer 3 de la enzima Eco RI (10X)	1.25 µL
Mse I (50 U/µL)	0.25 µL
Eco RI (10 U/ µL)	0.125 µL
ADN	125 ng
Agua c.b.p.	12.5 µL

Después de la digestión las muestras se prepararon para el ligamiento de los adaptadores específicos para cada enzima y añadiéndoles los reactivos enlistados abajo e incubando a 20 °C durante cuatro horas.

Mezcla de Ligamiento:

Buffer de T4 DNA-ligasa (5X)	2.5 µL
T4-DNA-ligasa	0.5 µL

Anexos

Adaptador EA-1 (2.5 pmol/ μ L) (CTC GTA GAC TGC GTA CC)	0.5 μ L
Adaptador EA-2 (2.5 pmol/ μ L) (AAT TGG TAC GCA GTC TAC)	0.5 μ L
Adaptador MA-1 (25 pmol/ μ L) (GAC GAT GAG TCC TGA G)	0.5 μ L
Adaptador MA-2 (25 pmol/ μ L) (TAC TCA GGA CTC AT)	0.5 μ L
Agua c.b.p	7.5 μ L

Una vez concluido el ligamiento se hizo una dilución 1:10 colocando 22.5 μ L de buffer TE 1X con 2.5 μ L de cada solución de ligación en tubos nuevos de 200 μ L (en este punto es posible almacenar las muestras en refrigeración para continuar al procedimiento al día siguiente). Así, el procedimiento se continuó a partir de la dilución anterior y el tubo con la mezcla digerida y ligada a los adaptadores se congeló a -20 °C para su posterior utilización.

Se realizó la pre-amplificación preparando las mezclas como se describe a continuación y se colocaron los tubos en el termociclador Veriti 96 Well (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial por 10 minutos a 95°C; veinte ciclos de desnaturalización por 30 segundos a 94°C, alineamiento por 60 segundos a 56°C y extensión por 60 segundos a 72°C; finalizando con incubación a 4°C si fuera necesario.

Mezcla para pre-amplificación:

Primer E-0 (75 ng/ μ L) (GAC TGC GTA CCA ATT C)	0.5 μ L
---	-------------

Anexos

Primer M-0 (80 ng/ μ L) (GAT GAG TCC TGA GTA A)	0.5 μ L
Supermix platinum PCR (Invitrogen)	22.5 μ L
Dilución 1:10	2.5 μ L

En este punto es posible almacenar las muestras en refrigeración para continuar al procedimiento al día siguiente.

Una vez pre-amplificadas las muestras se realizaron las amplificaciones selectivas correspondientes a cada par de cebadores, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial por 10 minutos a 94°C, 1 ciclo de 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos y 72°C por 60 segundos, disminuir la temperatura de alineamiento en 0.7°C en cada ciclo, durante 12 ciclos; posteriormente 23 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C y 60 segundos a 72°C. Para esta parte del análisis las mezclas de reacción se prepararon como sigue:

Mezcla para amplificación selectiva con el par de cebadores E-AC/M-C:

E-AC (5 ng/ μ L) (GAC TGC GTA CCA ATT CAC)	0.5 μ L
M-C (30 ng/ μ L) (GAT GAG TCC TGA GTA AC)	0.5 μ L
Supermix platinum PCR (Invitrogen)	11.25 μ L
ADN Pre-amplificado	2 μ L

Mezcla para amplificación selectiva con el par de cebadores E-C/M-A:

E-C (5 ng/ μ L) (GAC TGC GTA CCA ATT CC)	0.5 μ L
M-A (30 ng/ μ L) (GAT GAG TCC TGA GTA AA)	0.5 μ L
Supermix platinum PCR (Invitrogen)	11.25 μ L
ADN Pre-amplificado	2 μ L

Una vez obtenidas las muestras amplificadas selectivamente para cada par de cebadores se realizó la electroforesis en una cámara Sequi-Gen GT Sequencing Cell (Bio-Rad), que se llenó con buffer TBE 1X. El corrimiento de las muestras se realizó a 60 W durante 1.5 horas.

Antes de realizar el corrimiento electroforético, se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones:

- La placa simple se limpió perfectamente primero con acetona y luego con etanol de 96°, cuidando que no quedaran restos de papel en su superficie, una vez limpia, se colocó la solución de pegamento que está compuesta por 990 μ L de etanol absoluto, 5 μ L de bindsilane (sigma) y 5 μ L de ácido acético glacial; esta mezcla se preparó en un tubo eppendorff de 1.5 mL y se agitó en vortex con un pulso. Una vez depositada la mezcla sobre la placa se distribuye rápidamente con un papel impregnado de etanol de 96°, cuidadosamente para cubrir de manera homogénea toda la superficie.

- Para la limpieza de la placa con la cámara se utilizó únicamente etanol de 96°, para evitar que se dañe el pegamento; una vez limpia la superficie, se depositó 1 mL de anti-pegamento (sigmacote) y se distribuyó de la misma manera que la solución de pegamento de la primera placa.

Ambas placas se dejaron secar aproximadamente 5 minutos antes de armar la cámara (figura 12) y se inyectó la solución de poliacrilamida al 6% que se preparó mezclando 7.5 mL de acrilamida:bisacrilamida (19:1) al 40% con 21 g de urea para electroforesis, 5 mL de TBE 10X (Tris base, 89 mM; ácido bórico, 89 mM y EDTA, 2 mM) y la cantidad de agua destilada suficiente para completar un volumen de 50 mL. La mezcla se calienta a 50 °C hasta la disolución de la urea y se añaden 500 µL de persulfato de amonio (PSA) al 10 % y 16 µL de TEMED justo antes de la inyección a la cámara para la polimerización.

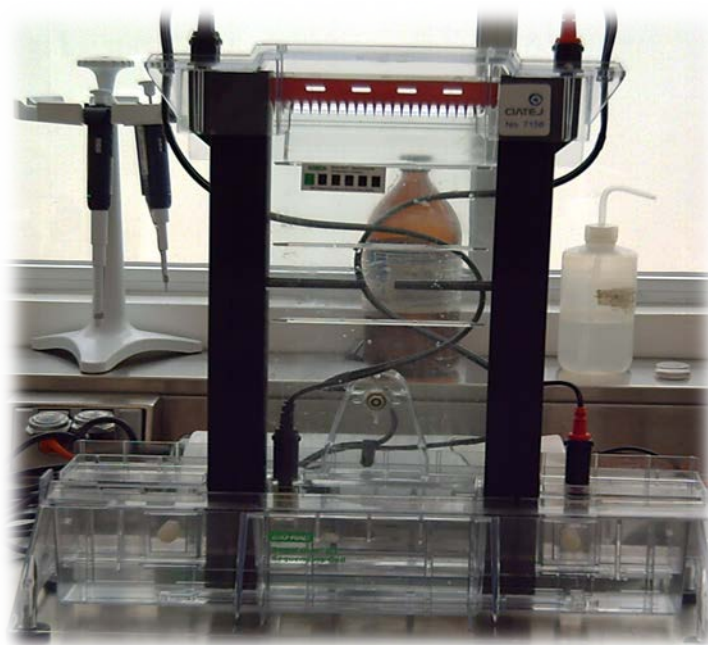


Figura 27.- Cámara de electroforesis para el análisis AFLP.

Preparación de las muestras para electroforesis:

A cada tubo con la muestra de amplificación selectiva, se le añaden 8 μL de buffer de carga (resuspender el contenido de Bromophenol Blue-Xylen Cyanole Dye solution de Sigma-Aldrich con 1.25 mL de EDTA 0.2 M y 23.75 mL de formamida), se desnaturalizan a 90°C por 3 minutos, se colocan de inmediato en hielo y se inyectan en el gel una vez que se ha solidificado; el volumen a inyectar depende del peine utilizado. Para el peine de 24 cavidades, se inyectan 8 μL de muestra; para el de 36 cavidades, inyectar 5 μL de muestra; y para el peine de 50 cavidades, inyectar 3 μL .

Tinción de plata:

Una vez concluido el corrimiento, se desmontó la cámara y se separaron las placas jalando fuertemente para que el gel permaneciera adherido sobre la placa con pegamento, y una vez separada la placa simple se sometió al siguiente proceso de tinción:

- 1.- Fijar el gel en 500 mL de una solución de ácido acético glacial al 10% con agitación constante por 20 minutos.
- 2.- Lavar tres veces en agua fría, por dos minutos cada lavado.
- 3.- Pasar la placa con el gel a 500 mL de la solución colorante (AgNO_3 0.1% + 750 μL de formaldehído al 37% en etanol) y agitar constantemente por 30 minutos.

4.- Enjuagar ligeramente con agua fría.

5.- Colocar la placa con el gel en la bandeja con 1 L de solución reveladora (3% de Na_2CO_3 + 1.5 mL de formaldehído al 37% en etanol + 200 μL de tiosulfato de sodio a una concentración de 10 mg/mL) y detener la reacción cuando aparezcan las bandas con la solución de ácido acético al 10% que se recupera después de la reacción de fijación.

Una vez teñido el gel, enjuagar con agua corriente para eliminar el exceso de soluciones, por último, enjuagar con abundante agua destilada y dejar secar verticalmente.

ANEXO II: DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES TOTALES

- Preparación de la solución DNS:

1.- Disolver 10 g de NaOH, 0.5 g de metabisulfito de sodio, 200 g de tartrato de sodio y potasio y 2 g de fenol, en 600 mL de agua destilada.

2.- Agregar poco a poco hasta lograr la disolución completa, 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico.

3.- Aforar a 1 L con agua destilada.

- Preparación de la solución patrón de fructosa:

1.- Secar la fructosa a 60° C por 3 horas.

2.- Pasar al desecador

3.- Pesar 0.1 g de fructosa

4.- Disolver en 70 mL de agua destilada y aforar a 100 mL.

- Curva de calibración:

1.- De la solución patrón de glucosa, hacer diluciones desde 0 g/L hasta 2 g/L.

2.- Leer la absorbancia de las diluciones a 540 nm.

3.- Construir una curva de calibración.

- Determinación de azúcares reductores directos en las muestras.

- 1.- Diluir las muestras de manera que la concentración resultante esté dentro del rango de la curva de calibración.
- 2.- En un tubo eppendorff, adicionar 100 μ L de muestra y añadirle 100 μ L de la solución de DNS.
- 3.- Agitar y colocar los tubos en baño de agua a punto de ebullición durante 5 minutos.
- 4.- Enfriar hasta temperatura ambiente en un baño de hielo, agregar 1 mL de agua destilada y agitar.
- 5.- Depositar 100 μ L de la mezcla anterior en una microplaca y leer a 540 nm.
- 6.- Calcular la concentración de los azúcares considerando la ecuación de la curva de calibración y multiplicando por las diluciones de cada muestra.

ANEXO III: TABLAS DE ANOVA PARA LOS PARÁMETROS CINÉTICOS Y LOS COMPUESTOS VOLÁTILES MAYORITARIOS, SEGÚN LAS CEPAS ESTUDIADAS EN EXPERIMENTOS CONTROLADOS A NIVEL MATRAZ.

Tabla ANOVA para μ_{\max} según Cepa

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0.117085	5	0.023417	0.56	0.7291
Intra grupos	0.502053	12	0.0418377		
Total (Corr.)	0.619138	17			

Tabla ANOVA para qp_{\max} según Cepa

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0.797615	5	0.159523	12.02	0.0002
Intra grupos	0.159292	12	0.0132743		
Total (Corr.)	0.956907	17			

Tabla ANOVA para Y_{ps} según Cepa

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	GI	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0.0264124	5	0.00528248	0.90	0.5103
Intra grupos	0.0702265	12	0.00585221		
Total (Corr.)	0.0966389	17			

Tabla ANOVA para Y_{xs} según Cepa

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	GI	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0.409628	5	0.0819256	4.35	0.0173
Intra grupos	0.226244	12	0.0188537		
Total (Corr.)	0.635872	17			

Tabla ANOVA para qs_{max} según Cepa

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	GI	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	37.1867	5	7.43734	3.04	0.0532
Intra grupos	29.3611	12	2.44676		
Total (Corr.)	66.5478	17			

Tabla ANOVA para **etanol** según Cepa

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	540.232	5	108.046	40.22	0.0000
Intra grupos	32.2383	12	2.68653		
Total (Corr.)	572.47	17			

Tabla ANOVA para **Alcohol amílico** según Cepa

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	13351.6	5	2670.31	9.33	0.0008
Intra grupos	3432.73	12	286.061		
Total (Corr.)	16784.3	17			

Tabla ANOVA para **Isobutanol** según Cepa

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	12336.8	5	2467.35	61.22	0.0000
Intra grupos	483.674	12	40.3062		
Total (Corr.)	12820.4	17			

Tabla ANOVA para **1-propanol** según Cepa

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1178.64	5	235.727	51.44	0.0000
Intra grupos	54.987	12	4.58225		
Total (Corr.)	1233.62	17			

Tabla ANOVA para **Acetato de etilo** según Cepa

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	4019.74	5	803.948	29.91	0.0000
Intra grupos	322.568	12	26.8806		
Total (Corr.)	4342.31	17			

Tabla ANOVA para **Acetaldehído** según Cepa

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	831.211	5	166.242	3.66	0.0304
Intra grupos	544.727	12	45.3939		
Total (Corr.)	1375.94	17			

ANEXO IV: TABLAS DE RESULTADOS DE LA PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES PARA LOS PARÁMETROS CINÉTICOS Y LOS COMPUESTOS VOLÁTILES MAYORITARIOS, SEGÚN LAS CEPAS ESTUDIADAS EN EXPERIMENTOS CONTROLADOS A NIVEL MATRAZ.

Contraste Múltiple de Rango para Yxs según Cepa

Método: 95.0 porcentaje LSD

Cepa Frec. Media Grupos homogéneos

Cepa	Frec.	Media	Grupos homogéneos
2	3	0.164671	X
4	3	0.230444	XX
5	3	0.281753	XX
3	3	0.299392	XX
1	3	0.413393	XX
6	3	0.628874	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	*0.248722	0.244272
1 - 3	0.114001	0.244272
1 - 4	0.182949	0.244272
1 - 5	0.13164	0.244272
1 - 6	-0.215481	0.244272
2 - 3	-0.134721	0.244272
2 - 4	-0.0657732	0.244272
2 - 5	-0.117082	0.244272
2 - 6	*-0.464203	0.244272
3 - 4	0.0689478	0.244272
3 - 5	0.017639	0.244272
3 - 6	*-0.329482	0.244272
4 - 5	-0.0513088	0.244272
4 - 6	*-0.39843	0.244272
5 - 6	*-0.347121	0.244272

* indica una diferencia significativa.

Contraste Múltiple de Rango para **qpmax** según Cepa

Método: 95.0 porcentaje LSD

Cepa	Frec.	Media	Grupos homogéneos
6	3	0.0954222	X
1	3	0.133017	X
5	3	0.206199	XX
4	3	0.253478	XX
2	3	0.375154	X
3	3	0.723737	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	*-0.242137	0.204966
1 - 3	*-0.59072	0.204966
1 - 4	-0.120461	0.204966
1 - 5	-0.0731814	0.204966
1 - 6	0.0375949	0.204966
2 - 3	*-0.348583	0.204966
2 - 4	0.121676	0.204966
2 - 5	0.168955	0.204966
2 - 6	*0.279732	0.204966
3 - 4	*0.47026	0.204966
3 - 5	*0.517539	0.204966
3 - 6	*0.628315	0.204966
4 - 5	0.0472793	0.204966
4 - 6	0.158056	0.204966
5 - 6	0.110776	0.204966

* indica una diferencia significativa.

Contraste Múltiple de Rango para **qpmax** según Cepa

Método: 95.0 porcentaje LSD

Cepa Frec. Media Grupos homogéneos

Cepa	Frec.	Media	Grupos homogéneos
6	3	0.0954222	X
1	3	0.133017	X
5	3	0.206199	XX
4	3	0.253478	XX
2	3	0.375154	X
3	3	0.723737	X

* indica una diferencia significativa.

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	*-0.242137	0.204966
1 - 3	*-0.59072	0.204966
1 - 4	-0.120461	0.204966
1 - 5	-0.0731814	0.204966
1 - 6	0.0375949	0.204966
2 - 3	*-0.348583	0.204966
2 - 4	0.121676	0.204966
2 - 5	0.168955	0.204966
2 - 6	*0.279732	0.204966
3 - 4	*0.47026	0.204966
3 - 5	*0.517539	0.204966
3 - 6	*0.628315	0.204966
4 - 5	0.0472793	0.204966
4 - 6	0.158056	0.204966
5 - 6	0.110776	0.204966

Contraste Múltiple de Rango para **etanol** según Cepa

Método: 95.0 porcentaje LSD

Cepa	Frec.	Media	Grupos homogéneos
6	3	16.5833	X
1	3	24.5833	X
4	3	24.9	X
5	3	28.4167	X
2	3	30.3833	X
3	3	34.0333	X

* indica una diferencia significativa.

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	*-5.8	2.91589
1 - 3	*-9.45	2.91589
1 - 4	-0.316667	2.91589
1 - 5	*-3.83333	2.91589
1 - 6	*8.0	2.91589
2 - 3	*-3.65	2.91589
2 - 4	*5.48333	2.91589
2 - 5	1.96667	2.91589
2 - 6	*13.8	2.91589
3 - 4	*9.13333	2.91589
3 - 5	*5.61667	2.91589
3 - 6	*17.45	2.91589
4 - 5	*-3.51667	2.91589
4 - 6	*8.31667	2.91589
5 - 6	*11.8333	2.91589

Contraste Múltiple de Rango para **alcohol amílico** según Cepa

Método: 95.0 porcentaje LSD

Cepa	Frec.	Media	Grupos homogéneos
6	3	29.7165	X
1	3	87.1192	X
5	3	89.3088	X
2	3	101.951	X
4	3	106.506	X
3	3	110.697	X

* indica una diferencia significativa.

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	-14.8319	30.0888
1 - 3	-23.5781	30.0888
1 - 4	-19.387	30.0888
1 - 5	-2.18952	30.0888
1 - 6	*57.4027	30.0888
2 - 3	-8.7462	30.0888
2 - 4	-4.55512	30.0888
2 - 5	12.6424	30.0888
2 - 6	*72.2346	30.0888
3 - 4	4.19108	30.0888
3 - 5	21.3886	30.0888
3 - 6	*80.9808	30.0888
4 - 5	17.1975	30.0888
4 - 6	*76.7897	30.0888
5 - 6	*59.5922	30.0888

Contraste Múltiple de Rango para **isobutanol** según Cepa

Método: 95.0 porcentaje LSD

Cepa	Frec.	Media	Grupos homogéneos
6	3	15.2844	X
2	3	24.7355	XX
1	3	34.8283	X
3	3	35.6983	X
4	3	80.8789	X
5	3	81.6453	X

* indica una diferencia significativa.

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	10.0928	11.2943
1 - 3	-0.869997	11.2943
1 - 4	*-46.0506	11.2943
1 - 5	*-46.817	11.2943
1 - 6	*19.5439	11.2943
2 - 3	-10.9628	11.2943
2 - 4	*-56.1434	11.2943
2 - 5	*-56.9098	11.2943
2 - 6	9.45111	11.2943
3 - 4	*-45.1806	11.2943
3 - 5	*-45.947	11.2943
3 - 6	*20.4139	11.2943
4 - 5	-0.766437	11.2943
4 - 6	*65.5945	11.2943
5 - 6	*66.3609	11.2943

Contraste Múltiple de Rango para **propanol** según Cepa

Método: 95.0 porcentaje LSD

Cepa	Frec.	Media	Grupos homogéneos
6	3	8.84686	X
2	3	14.0828	X
1	3	18.7471	X
3	3	22.0634	X
5	3	30.2771	X
4	3	31.2543	X

* indica una diferencia significativa.

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	*4.66432	3.80815
1 - 3	-3.31629	3.80815
1 - 4	*-12.5072	3.80815
1 - 5	*-11.5299	3.80815
1 - 6	*9.90027	3.80815
2 - 3	*-7.98061	3.80815
2 - 4	*-17.1715	3.80815
2 - 5	*-16.1943	3.80815
2 - 6	*5.23595	3.80815
3 - 4	*-9.19088	3.80815
3 - 5	*-8.21365	3.80815
3 - 6	*13.2166	3.80815
4 - 5	0.97723	3.80815
4 - 6	*22.4074	3.80815
5 - 6	*21.4302	3.80815

Contraste Múltiple de Rango para **acetato de etilo** según Cepa

Método: 95.0 porcentaje LSD

Cepa	Frec.	Media	Grupos homogéneos
3	3	2.81583	X
2	3	3.22007	X
6	3	5.8898	X
1	3	6.78788	X
4	3	32.0932	X
5	3	39.7007	X

* indica una diferencia significativa.

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	3.5678	9.22349
1 - 3	3.97205	9.22349
1 - 4	*-25.3053	9.22349
1 - 5	*-32.9128	9.22349
1 - 6	0.898073	9.22349
2 - 3	0.404247	9.22349
2 - 4	*-28.8731	9.22349
2 - 5	*-36.4806	9.22349
2 - 6	-2.66973	9.22349
3 - 4	*-29.2774	9.22349
3 - 5	*-36.8848	9.22349
3 - 6	-3.07398	9.22349
4 - 5	-7.60746	9.22349
4 - 6	*26.2034	9.22349
5 - 6	*33.8109	9.22349

Contraste Múltiple de Rango para **acetaldehído** según Cepa

Método: 95.0 porcentaje LSD

Cepa	Frec.	Media	Grupos homogéneos
4	3	19.4002	X
6	3	21.5416	X
3	3	24.2225	X
5	3	25.2996	X
1	3	31.3594	XX
2	3	39.6473	X

* indica una diferencia significativa.

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	-8.28794	11.986
1 - 3	7.1369	11.986
1 - 4	11.9592	11.986
1 - 5	6.0598	11.986
1 - 6	9.81784	11.986
2 - 3	*15.4248	11.986
2 - 4	*20.2471	11.986
2 - 5	*14.3477	11.986
2 - 6	*18.1058	11.986
3 - 4	4.8223	11.986
3 - 5	-1.0771	11.986
3 - 6	2.68094	11.986
4 - 5	-5.89941	11.986
4 - 6	-2.14136	11.986
5 - 6	3.75804	11.986

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Estados de la república Mexicana que pertenecen a la región de Denominación de Origen del mezcal según la Norma Oficial Mexicana NOM-0701-1994.....10

Figura 2.- Algunos tipos de agaves utilizados tradicionalmente para la elaboración de bebidas alcohólicas en México (Fotografías: Gschaedler A.).....12

Figura 3.- Piñas de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck ssp *crassispina* (Trel.) Gentry, cosechadas del Altiplano Potosino.....14

Figura 4.- Horno de mampostería y piñas de Agave después del proceso de cocción.....15

Figura 5.- Proceso de molienda en la tahona de las piñas de agave cocidas.....16

Figura 6.- Inóculos preparados antes que se inicie el proceso de obtención del mezcal en las tinajas de fermentación.....17

Figura 7.- Llenado y aspecto de la tina durante la etapa de fermentación para la obtención del mezcal.....17

Figura 8.- Alambique de acero inoxidable en el que se lleva a cabo la destilación del mosto fermentado.....18

Figura 9.- Síntesis de etanol a partir del piruvato (Tomado de Voet et al. 1999)...20

Figura 10.- Ubicación geográfica de la mezcalera Laguna Seca, Municipio de Charcas, San Luís Potosí, México. (INEGI, 2009).....43

Índice de Figuras

- Figura 11.- Esquema de trabajo para la realización de la caracterización de las levaduras involucradas en el proceso fermentativo del mezcal.....44
- Figura 12.- Diferentes tipos coloniales desarrollados sobre una misma placa de agar WL suplementado con 0.01% de cloranfenicol.....60
- Figura 13.- Patrón de bandas obtenido de las colonias aisladas, después de digerir los amplicones de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr, con las enzimas de restricción HhaI, HaeIII e HinfI. Abreviaturas: M; marcador de peso molecular de 100 pb; S.c., *S. cerevisiae*; K.m., *K. marxianus*; C.l., *C. lusitaniae* y S.e., *S. exiguus*.....64
- Figura 14.- Patrón de bandas obtenido de las colonias aisladas, después de digerir los amplicones de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr, con las enzimas de restricción HhaI, HaeIII e HinfI. Abreviaturas: M; Marcador de peso molecular de 100 pb; P.k., *P. kluyveri*; C.e., *C. ethanolica*; T.d., *T. delbrueckii* y Z.b., *Z. bailii*.....64
- Figura 15.- Sucesión de especies de levaduras en las fermentaciones 1 (A) y 2 (B) de la mezcalera Ex-Hacienda “Laguna Seca” en el Estado de San Luís Potosí, México. Abreviaturas: S.c., *S. cerevisiae*; K.m., *K. marxianus*; P.k., *P. kluyveri*; Z.b., *Z. bailii*; C.l., *C. lusitaniae* S.e., *S. exiguus* y T.d., *T. delbrueckii*.....69
- Figura 16.- Perfil de migración de PCR-DGGE a partir de los procesos fermentativos 1(A) y 2(B). La línea M corresponde a la mezcla de las cepas

Índice de Figuras

- puras aisladas sobre medio WL e identificadas por RFLP; líneas 1-9, perfiles DGGE de los DNA amplificados obtenidos.....70
- Figura 17.- Variación de concentraciones de azúcar, etanol, población total de levaduras y diversidad en el proceso fermentativo durante la producción de mezcal en la fábrica Ex-Hacienda “Laguna Seca”, San Luís Potosí, México.....72
- Figura 18.- Variación de concentraciones de compuestos volátiles y de la diversidad biológica según el Índice de Shannon-Wiener durante la etapa de fermentación de los procesos de producción del mezcal en la fábrica Ex-Hacienda “Laguna Seca”, en San Luís Potosí, México.....73
- Figura 19.- Dendograma resultante de las cepas de *S. cerevisiae* después del agrupamiento según el algoritmo UPGMA a partir de la matriz de Distancia Genética de Nei, con los 103 marcadores AFLP.....77
- Figura 20.- Dendograma de las cepas de *K. marxianus* obtenido por agrupamiento según el algoritmo UPGMA a partir de la matriz de Distancia Genética de Nei, con los 79 marcadores AFLP.....78
- Figura 21.- Dendograma de las cepas de *T. delbrueckii* obtenido por agrupamiento según el algoritmo UPGMA a partir de la matriz de distancia Genética de Nei, con los 103 marcadores AFLP.....79

Índice de Figuras

- Figura 22.- Población, producción de etanol y consumo de azúcares reductores totales por *S. cerevisiae*; (A) cepa 902 y (B) cepa 2114; desarrolladas en medio de jugo de Agave salmiana suplementado con 1g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, a pH 4.5 a 30° C y 50 rpm.....81
- Figura 23.- Población, producción de etanol y consumo de azúcares reductores totales por *K. marxianus*; (A) cepa 608 y (B) cepa 1424; desarrolladas en medio de jugo de Agave salmiana suplementado con 1g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, a pH 4.5 a 30° C y 50 rpm.....82
- Figura 24.- Población, producción de etanol y consumo de azúcares reductores totales por *T. delbrueckii*; (A) cepa 620 y (B) cepa 1423; desarrolladas en medio de jugo de *Agave salmiana* suplementado con 1g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, a pH 4.5 a 30° C y 50 rpm.....82
- Figura 25.- Producción de alcoholes superiores en medio de jugo de *Agave salmiana* suplementado con 1g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, a pH 4.5 a 30° C y 50 rpm .A) Alcohol amílico, B) 1-Propanol, C) Isobutanol.....84
- Figura 26.- Producción de acetaldehído (A) y acetato de etilo (B) por las diferentes cepas de levadura, desarrolladas en medio de jugo de *Agave salmiana* suplementado con 1g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, a pH 4.5 a 30° C y 50 rpm.....85
- Figura 27.- Cámara de electroforesis para el análisis AFLP.....135

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Formulación de los medios de cultivo utilizados en las diferentes etapas del trabajo. Abreviaturas: WL, Wallerstein Laboratory; YPD, Extracto de levadura-Peptona-Dextrosa (por sus siglas en inglés) y JA, Jugo de Agave.....46

Cuadro 2.- Grupos morfológicos de las colonias aisladas por siembra en placa sobre agar WL.....61

Cuadro 3.- Levaduras identificadas y longitud en pares de bases de la región ITS-5.8S amplificada por PCR y de los fragmentos obtenidos después de la digestión con las endonucleasas de restricción HhaI, HaeIII e HinfI.....63

Cuadro 4.- Levaduras aisladas a partir de diferentes lugares de la fábrica Laguna Seca en el Estado de San Luis Potosí, México.....65

Cuadro 5.- Ocurrencia de poblaciones de levaduras en las tinas de fermentación a diferentes etapas del proceso durante las fermentaciones espontáneas 1 y 2 de la Fábrica Laguna Seca, en San Luis Potosí, México.....67

Cuadro 6.- Diversidad según el índice de Shannon-Wiener en la fermentación 1.....68

Cuadro 7.- Diversidad según el índice de Shannon-Wiener en la fermentación 2.....68

Índice de Cuadros

- Cuadro 8.- Resultados del análisis de correlaciones entre las variables observadas durante la fermentación 1. Los valores con (*) son los que tienen correlación estadísticamente significativa con un 95% de confianza.....74
- Cuadro 9.- Resultados del análisis de correlaciones entre las variables observadas durante la fermentación 2. Los valores con (*) son los que tienen correlación estadísticamente significativa con un 95% de confianza.....75
- Cuadro 10.- Porcentaje de polimorfismo y Heterocigosidad esperada en las tres especies mayoritarias que formaron el consorcio durante el proceso fermentativo de la mezcalera Ex-Hacienda “Laguna Seca”, San Luís Potosí, México.....76
- Cuadro 11.- Parámetros cinéticos del consorcio de levaduras aisladas del mezcal. Abreviaturas: μ_{max} , Velocidad específica máxima de crecimiento; q_{smax} , tasa de consumo específico máximo de sustrato; q_{pmax} , tasa específica máxima de generación de producto; $Y_{p/s}$, rendimiento de producto con base al sustrato y $Y_{x/s}$, rendimiento de biomasa con base al sustrato.....83

Índice de Cuadros
