



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL Y CONGENÉRICOS DE
CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* AISLADAS DE FERMENTACIONES
NATURALES DE SOTOL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias
Bioquímicas

PRESENTA:
JANET RENTERÍA GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Francisco Ruíz Terán
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Carmina Montiel Pacheco
Facultad de Química

Dr. Agustín López-Munguía Canales
Instituto de Biotecnología

Ciudad de México. Septiembre, 2022.



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.

Tabla de abreviaturas

°B	grados brix
°C	grados Celsius
μL	microlitros
μM	micromol
ADP	adenosín difosfato
ATP	adenosín trifosfato
ATPasa	Enzimas que catalizan la descomposición de ATP en ADP y un ion de fosfato libre.
dNTP	deoxinucleósido trifosfato
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
g	gramos
g/v	relación gramos- volumen
GTG₅	secuencias de GTG repetida 5 veces
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
ITS	secuenciación de la región espaciadora interna transcrita
Kb	kilobase
M11	medio de cultivo
MEFS-CG-Masas	microextracción en fase sólida cromatografía de gases espectrometría de masas
mL	mililitros
mM	milimolar
NAD	nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma oxidada

ng	nanogramos
pb	par de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pmol	picomol
ppm	unidad: partes por millón
RFLP	fragmentos de restricción de longitud polimórfica
rpm	revoluciones por minuto
ssp.	especies
TBE	Amortiguador tris-borato-EDTA
U	unidad
UA	unidad de absorbancia
UFC	Unidad formadora de colonia
UPGMA	Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic
V	volts
v/v	relación volumen-volumen
YPD	medio de cultivo para levaduras

Contenido

ANTECEDENTES	1
1. Sotol	1
1.1 Proceso de elaboración	1
1.2 Selección de plantas <i>Dasyilirion ssp.</i>	2
1.3 Cocción de tallo	3
1.4 Molienda	5
1.5 Fermentación	6
1.6 Destilación	8
1.7 Añejamiento	8
2. Características de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
3. Selección y domesticación de cepas de <i>S. cerevisiae</i>	11
4. Identificación molecular de <i>S. cerevisiae</i>	14
4.1 Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP)	14
5. Tipificación molecular de cepas de <i>S. cerevisiae</i>	15
5.1 Amplificación de secuencias Delta (δ)	15
5.2 MSP-PCR, Amplificación de microsatélites	15
6. Tolerancia de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a diferentes condiciones de estrés en fermentaciones alcohólicas	17
6.1 Limitación de fuentes de nitrógeno en mostos	18
6.2 Tolerancia a temperaturas altas	19
6.3 Tolerancia a pH bajo	19
6.4 Tolerancia a estrés osmótico	20
6.5 Tolerancia a altas concentraciones de etanol	20
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO	24
OBJETIVOS PARTICULARES	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
1. Identificación de levaduras aisladas de fermentaciones naturales de sotol	26
1.2 Extracción de DNA genómico	26

1.3 Amplificación de la región ITS1-5.8-ITS2	27
1.4 Análisis de restricción.....	27
2. Tipificación de cepas aisladas de fermentaciones naturales de sotol	28
2.1 Microsatélites, (MSP-PCR).....	28
2.2 Fragmentos Interdeltas	28
3. Pruebas de tolerancia de las cepas seleccionadas de <i>S. cerevisiae</i>.....	29
3.1 Tratamientos en medio YPDA.....	29
3.2 Tratamientos en medio YPD	30
3.3 Tratamiento mixto	31
4. Capacidad de floculación de cepas seleccionadas de <i>S. cerevisiae</i>.....	32
4.1 Ensayo de Helm.....	32
5. Fermentación con mosto de sotol	33
5.1 Preparación del mosto de sotol.....	33
5.2 Preparación del inóculo.....	34
5.3 Fermentación.....	34
6. Fermentación con medio semisintético	34
6.1 Preparación del medio M11	34
6.2 Elaboración del inóculo	34
6.3 Fermentación.....	35
7. Determinación de sólidos solubles	35
8. Determinación de unidades formadoras de colonia durante la fermentación.....	35
9. Determinación de pH en la fermentación.....	36
10. Determinación de monosacáridos, etanol, glicerol y ácido acético durante la fermentación por medio de HPLC	36
10.1 Preparación de la muestra.....	36
10.2 Inyección y análisis de la muestra por cromatografía de líquidos.....	36
10.3 Rendimiento y productividad	37
11. Determinación de compuestos volátiles por medio de microextracción en fase sólida.....	37
11.1 Preparación de la muestra.....	37
11.2 Inyección y análisis de la muestra por cromatografía de gases masas	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39

1. Identificación molecular de levaduras aisladas de fermentaciones naturales de sotol.....	39
2. Tipificación molecular de cepas de <i>S. cerevisiae</i> por medio de secuencias de microsátélites GTG₅ y M13.....	41
3. Tipificación molecular de cepas de <i>S. cerevisiae</i> por medio de fragmentos interdeltas	45
4. Pruebas de tolerancia de las cepas SM1, SMF4 y SMIC3	47
4.1 Tolerancia celular a diferentes concentraciones de etanol	47
4.2 Tolerancia celular por choque Osmótico	49
4.3 Tolerancia celular ante pH bajo	50
4.4 Tolerancia celular por choque térmico e incubación a diferentes temperaturas	51
4.5 Tolerancia celular de estrés mixtas	53
5. Floculación de las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3	54
6. Fermentaciones.....	55
7. Rendimiento de etanol.....	61
8. Identificación de compuestos congénicos mediante MEFS-CG-Masas	65
8.1 Identificación de alcoholes superiores	71
8.2 Identificación de ácidos orgánicos.....	74
8.3 Identificación de ésteres	76
8.4 Identificación de aldehídos y cetonas	79
8.5 Identificación de terpenos.....	79
8.6 Identificación de compuestos	80
8.7 Identificación de furanos	81
8.8 Otros compuestos.....	82
ANEXOS.....	87
Figura I.....	87
Figura II.....	89
Figura III.....	90
Figura IV	90
Figura V.	91
Figura VI.	92
Figura VII	93
Figura VIII.....	94

Figura IX	95
Figura X	95
Figura XI	96
Figura XII	96
Figura XIII	97
REFERENCIAS	98

DEDICATORIA

“Hay dos maneras de difundir la luz...Ser la vela o el espejo que la refleja”.

Edith Wharton

Este proyecto es dedicado a la memoria de mis padres

Miguel Rentería Lemus y María Isabel García Prado.

Espero ser el digno espejo que refleje su luz.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco particularmente al Dr. Francisco Ruíz Terán por las charlas, por compartirme su conocimiento y su alegría, por su paciencia y especialmente porque siempre me motivó a seguir adelante, siempre estaré agradecida con usted.

A la Dra. Julieta por apoyarme en las correcciones de mi tesis y con apoyo de material

Agradezco a mi Comité tutorial integrado por el Dr. Agustín López-Munguía Canales y la Dra. Carmina Montiel Pacheco, por el tiempo dedicado a la revisión de mi trabajo y por las aportaciones para mejorarlo.

Agradezco las aportaciones del Dr. Jorge Alejandro Santiago Urbina a mi investigación de Maestría

A el Dr. Iván Salmerón Ochoa y a la Universidad Autónoma de Chihuahua por el apoyo en realizar una estancia en sus instalaciones.

A mis compañeros de laboratorio José Arias, Beatriz Aguilar, Elizabeth Lara, Ana María, Brenda e Itzia de la Facultad de Química, muchas gracias por hacer mi estancia en el laboratorio más alegre y amena. En especial quiero agradecer a Atenea Palma, ¡infinitas gracias!, por tu compañía y sincera amistad.

Agradezco a mi familia, a mi abuelo Carlos Rentería y a mi hermana Diana Laura Rentería por ser el soporte, mi columna vertebral para no flaquear. Agradezco a mis padres, porque tuve la suerte de tenerlos en mi vida y porque fueron, son y serán mis armas para afrontar cualquier adversidad. Me siento dichosa de ser su hija.

Agradezco el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), DGAPA, UNAM por el apoyo económico para concluir mis estudios de Maestría, dentro del proyecto IN216618.

Al programa PAEP por el apoyo económico para participar en el Congreso de Biotecnología realizado en León Guanajuato.

Agradezco a CONACYT y especialmente a la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.

RESUMEN

El sotol es una bebida destilada que se obtiene de la fermentación del jugo extraído a partir de tallos cocidos de plantas del género *Dasyllirion*. La conversión de azúcares fermentables en alcohol es llevada a cabo por bacterias, hongos y levaduras, entre las que destaca *Saccharomyces cerevisiae*. Las variaciones genéticas de *S. cerevisiae*, resultan en diferencias morfológicas y fisiológicas que pueden ofrecer distintas aplicaciones biotecnológicas, como la capacidad de floculación, la capacidad para producir y tolerar etanol, la producción de congenéricos, etc. que son importantes para las características organolépticas de esta bebida. El conocimiento de su fisiología y los cambios que sufren ante diferentes condiciones de estrés, ofrecen información sobre la tolerancia y eficiencia para fermentar y así seleccionar cepas que puedan servir para realizar fermentaciones controladas. Por tanto, el objetivo de este proyecto es caracterizar cepas de *S. cerevisiae* mediante sus reacciones ante distintas condiciones de estrés, (temperatura, concentración de solutos, pH y tolerancia a etanol), por su tipo de floculación y evaluar las diferencias del rendimiento de etanol y congenéricos de éstas en fermentaciones. Para esto se realizó una identificación empleando la región ITS1-5.8-ITS2 de 17 levaduras previamente aisladas de distintas fermentaciones naturales de sotol y una de la fermentación ancestral de mezcal con dos métodos de tipificación: microsatélites y fragmentos interdeltas 12δ y 21δ. De acuerdo con la tipificación se seleccionaron dos cepas de *S. cerevisiae*, denominadas SMF1, SMF4 provenientes de la fermentación de sotol y SMIC3 de la fermentación de mezcal, a las cuales se les realizaron pruebas de estrés: temperatura, concentración de solutos, pH y tolerancia a etanol. Las tres cepas toleraron hasta un 35 % de glucosa, pH 3.0, pero no 15 % de etanol y altas temperaturas por largos periodos. En la prueba de floculación por ensayo de Helms, la cepa SMF1 y SMF4 se consideraron no floculantes y SMIC3 moderadamente floculante de acuerdo con las categorías del ensayo. Las cepas se adicionaron individualmente en dos tipos de sustrato: mosto de sotol y en medio semisintético. De acuerdo con los rendimientos con respecto al sustrato $Y_{\Delta P / \Delta S}$, las tres cepas tuvieron mayores rendimientos en el medio semisintético. Por otra parte, las cepas SMF1 y SMF4 tanto en mosto natural como M11 muestran mayor productividad en comparación con SMIC3. Se identificaron 65 compuestos volátiles por medio de MEFS-CG-Masas en las respectivas fermentaciones, donde se observaron diferencias entre sustrato, pero no entre cepas.

ANTECEDENTES

1. Sotol

El sotol es una bebida destilada obtenida de las plantas: *Dasyilirion duranguense*, *Dasyilirion cedrosanum* y *Dasyilirion wheeleri* coloquialmente llamadas como sotol o sereque. El género *Dasyilirion* se ubica en la familia *Asparagaceae* y subfamilia *Nolinoideae*, (Cronquist,1981). Se caracterizan por crecer en clima cálido semiárido (Contreras y Ortega, 2005), con baja humedad, escasas lluvias que coinciden con la época más cálida del año, altas temperaturas diurnas alternadas con bajas temperaturas nocturnas, tolera más de 50 °C y -15 °C, suelos con pH arriba de 7.0 y con poca materia orgánica, así como poca capacidad de retención de agua y baja disponibilidad de minerales (Reyes *et al.*, 2012b). Para elaborar el destilado, las plantas son adquiridas de poblaciones naturales y cultivadas de Chihuahua, Coahuila y Durango (López, 2005). Son plantas dioicas (Hernández, 2008), perenes, los tallos cortos contienen numerosas hojas alargadas que le dan a la planta un aspecto de roseta semicircular (Bongler, 1994; De la garza *et al.*, 2008).

Durante mucho tiempo estas plantas fueron confundidas con los *Agaves*, sin embargo, los *Agaves* tiene un mecanismo CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas) y *Dasyilirion ssp.* un mecanismo C4 (Cruz *et al.*, 2007; Cruz *et al.*, 2013; Reyes *et al.*,2012b).

Desde la germinación hasta la primera floración, transcurren entre 12 a 15 años y a diferencia del género *Agave* pueden continuar vivas después de la floración (Reyes *et al.*, 2012a). El tallo contiene carbohidratos complejos, principalmente fructanos, que son estructuralmente diferentes a los de los agaves (López *et al.*, 2003; Mancilla y López 2006), y simples tales como la glucosa y la fructosa (De la Garza *et al.*, 2008).

1.1 Proceso de elaboración

La colecta y producción del destilado está regulada por las normas mexicanas NOM-005-RECNAT-1997, NOM-007-RECNAT-1997 donde establecen que la extracción de las plantas de *Dasyilirion* sea porcentual y se respete la maduración de otros individuos.

La NOM-159-SCFI-2004 establece los rangos de concentración de compuestos volátiles en la bebida de sotol. Las especificaciones se refieren en la Tabla 1.

Tabla 1. Especificaciones fisicoquímicas del sotol de acuerdo con la NOM-159-SCFI-2004

	Sotol blanco		Sotol joven		Sotol reposado		Sotol añejado	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Contenido de alcohol a 20OC %	35	55	35	55	35	55	35	55
Extracto seco (g/L)	0	0.2	0	15	0	15	0	15
valores expresados en mg/100 mL referido a alcohol anhidrido								
Alcoholes superiores: (aceites de fusel o alcoholes superiores de peso molecular superior al alcohol etílico)	20	400	20	400	20	400	20	400
Metanol	0	300	0	300	0	300	0	300
Aldehídos (acetaldehídos)	0	40	0	40	0	40	0	40
Ésteres (acetato de etilo)	2	270	2	350	2	360	2	360
Furfural	0	4	0	4	0	4	0	4

1.2 Selección de plantas *Dasyliirion ssp.*

Se seleccionan plantas maduras y los jornaleros las identifican cuando estas comienzan el nacimiento de la inflorescencia, también conocida como vástago, qurote o escapo, para que suceda este evento las plantas tardan en madurar entre 7 a 22 años. Posteriormente se les realiza un proceso conocido como capado, donde se remueve el qurote para evitar el florecimiento y mantener los azúcares almacenados en el tallo. El peso del tallo cosechado oscila entre 20 a 40kg (Cruz *et al.*, 2008) y la concentración de azúcares es variada. (Sierra *et al.*, 2008) reportó que el peso no tiene correlación alguna con la concentración de azúcares). Una vez cosechado el tallo, se limpia, proceso llamado jima, donde se cortan las hojas que lo cubren. Después son llevados a las viñatas para su cocción (Sierra *et al.*, 2008).

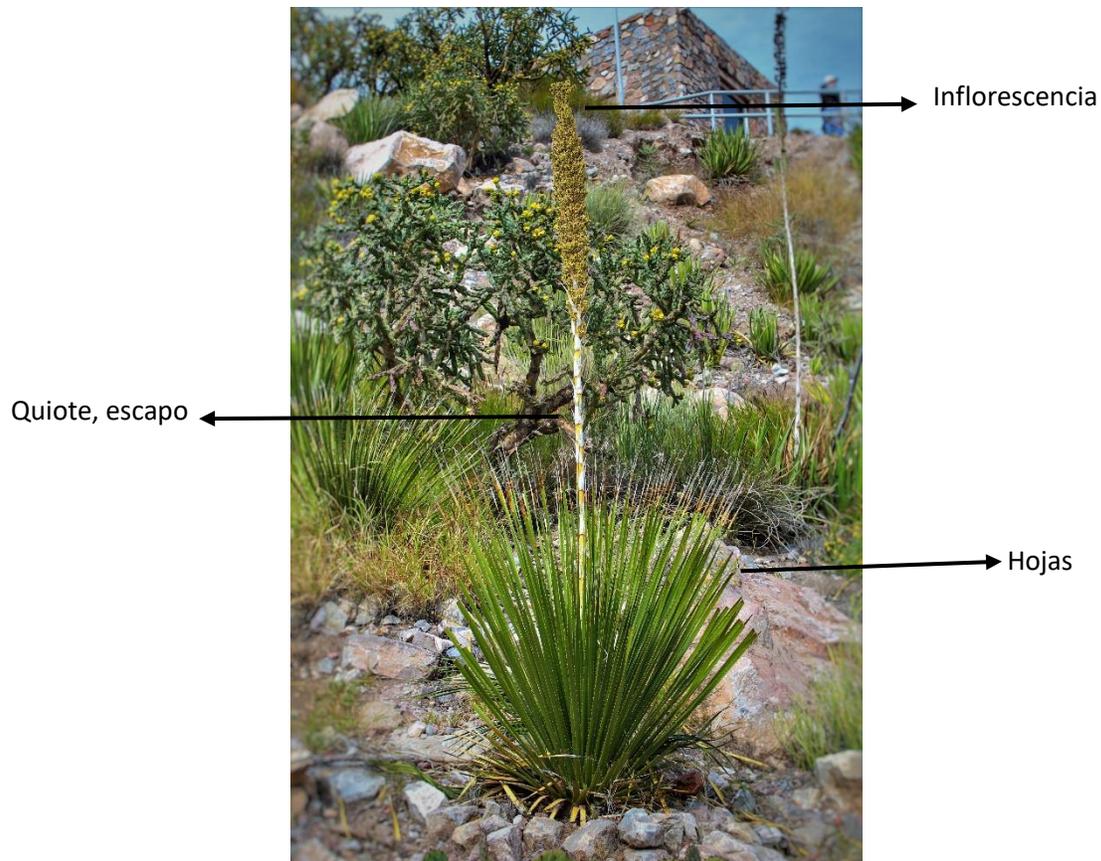


Figura 1. Planta de sotol (*Dasylirion ssp.*) con inflorescencia, en Chihuahua, Chihuahua.

1.3 Cocción de tallo

Existen diversas maneras para llevar a cabo la cocción, sin embargo, el más utilizado es el horno de piso que es una excavación generalmente de forma circular, cónica o cilíndrica de bajo de la tierra (CIATEJ, 2014).

La cocción del tallo transcurre en un periodo de 3 a 5 días, dependiendo de la capacidad del horno (Sierra *et al.*, 2008; CIATEJ, 2014). El tallo crudo según Cruz y *et al.*, (2013), tiene una concentración de 48.3 g/L de azúcares reductores, sin embargo, se puede adicionar azúcares al inicio de la fermentación en una proporción no mayor a 49 % según la NOM-159-SCFI-2004. Por su parte el contenido proteico en la piña del sotol oscila entre 0.135 g/L pero disminuye significativamente después del proceso de cocción (Casas, 2014).

Durante la cocción del tallo se hidrolizan los fructanos y se obtienen azúcares reductores libres como la fructosa y glucosa, asimilables para los microorganismos que intervienen en la fermentación. Sin embargo, el cocimiento en este tipo de hornos puede ser desigual, las altas temperaturas pueden producir una serie de reacciones químicas, como las de Maillard, de enolización y caramelización (Waleckx *et al.*, 2008). Por otro lado, un mal cocimiento limitaría la cantidad de azúcar libre al no completarse la hidrólisis y un cocimiento excesivo disminuiría la cantidad de azúcares disponibles, por lo que, es importante establecer las condiciones y tiempos de cocimiento óptimos, ya que, puede afectar a la fermentación y repercutir en las propiedades organolépticas (Gutiérrez *et al.*, 2007; CIATEJ, 2014).



Figura 2. a) cabezas de tallos previo al tratamiento térmico y b) cabezas de tallos cubiertas de palma y tierra después de la cocción en un horno de piso en la sotolera Oro de Coyame.

La reacción de Maillard ocurre entre los grupos amino y el grupo funcional de los azúcares (aldehído o cetona), en presencia de calor y agua. Las condiciones de cocimiento a altas temperaturas (a partir de los 140°C), humedad y pH (4.5 a 3.0), favorecen las reacciones de Maillard (Mancilla y López, 2002). Entre los compuestos generados por estas reacciones se encuentra 3-metil-1-butanol y alcohol fenil etílico (Benn y Peppard, 1996), 5-hidroximetilfurfural, metil-2-furonato y 2,3-dihidroxi-3,5-dihidro-6-metil-4(H)-piran-4-ona (Mancilla y López, 2002). 2-acetil-5-metil-furano, alcohol 3-furfúrico y 3,4,5-trimetil pirazol (López, 1999). Por su parte la enolización, ocurre cuando los azúcares se deshidratan por efecto de la temperatura y tiempo prolongado, generando 3-desoxiosulosa que por deshidrataciones sucesivas y ciclización se forma hidroximetilfurfural y derivados furfúricos (Lamas *et al.*, 2004; Gutiérrez *et al.*, 2007).

La caramelización ocurre cuando los azúcares se calientan por encima de su punto de fusión, tanto en medio ácido como alcalino. Los mecanismos incluyen isomerización, deshidratación y dimerización. Los productos de la caramelización contribuyen a las características organolépticas ofreciendo aromas específicos por sí mismos o por potenciar otros; por ejemplo, el metano posee un aroma a caramelo y es potenciador del sabor dulce (Gutiérrez *et al.*, 2007).

La formación de derivados de furanos, furanonas, lactonas, carbonilos, y ésteres, se producen por enolización, es decir, por calentamiento de monosacáridos en soluciones ácidas. La suma de las características aromáticas de todos estos compuestos es la que da lugar al aroma distintivo de muchos alimentos o bebidas (Lamas *et al.*, 2004; Gutiérrez *et al.*, 2007).



Figura 3. Tallos cocidos de *Dasyllirion* ssp. sotolera Oro de Coyame.

1.4 Molienda

Es el proceso mediante el cual, la piña cocida es triturada, para la obtención de jugos fermentables (mosto), la fragmentación puede ser manual (hacha o machete) o automatizada utilizando tahonas o molinos desgarradores (CIATEJ, 2014).



Figura 4. Molienda de tallos de *Dasyliirion* ssp. con triturador automático, (sotolera Oro de Coyame)

1.5 Fermentación

En el mosto del sotol se encuentran diversos carbohidratos como celulosa, hemicelulosa glucosa, fructosa, fructooligosacáridos, polifruktanos, e inulina (De la Garza *et al.*, 2008). Los fructanos son polímeros que van de tres a cientos de unidades de fructosa, (los polímeros 2 a 10 son los llamados fructooligosacáridos), con una gran variedad en enlaces y residuos fructosil. Los fructanos pueden diferir en el grado de polimerización, la presencia de ramificaciones, el tipo de enlace entre las unidades de fructosa y la posición de la glucosa (Ulloa *et al.*, 2010). Los fructanos estructuralmente abarcan a la inulina, mezclas de fructanos ramificados, y neoserias de inulina (Ulloa *et al.*, 2010). Los mostos son puestos en reposo, en tinas de fermentación de madera, cemento, plástico o de acero inoxidable con un diámetro aproximado de 1.5 a 2.0 m y una profundidad de 2 m, en la mayoría de los casos, el proceso se realiza mediante técnicas artesanales, donde se mezcla el jugo y el bagazo triturado. En la fermentación los azúcares son transformados en alcohol y congenéricos, consta de tres etapas principales: el transporte de los azúcares al interior de la célula, la transformación de los azúcares en piruvato por medio de la glucólisis y finalmente la conversión de piruvato a etanol. La ruta metabólica que dirige el proceso de fermentación de los azúcares es la Embden-Meyerhof (Téllez y Cedeño, 1997).

La fermentación del mosto de sotol tiene una duración de 72 h aproximadamente (CIATEJ, 2014), no obstante, durante el invierno puede durar hasta 10 días (Sierra *et al.*, 2008). En la etapa de fermentación se desarrollan microorganismos de manera natural en los equipos que emplean para este proceso y en los mostos. En ocasiones, algunos productores inoculan los nuevos mostos con levaduras nativas de fermentaciones anteriores, como levaduras y bacterias que se alimentan de los carbohidratos de la planta, transformándolos en alcohol y otros compuestos. Actualmente se considera que la principal responsable es *Saccharomyces cerevisiae* (Reyes *et al.*, 2019), aunque se sabe que son diversos los géneros y especies de microorganismos involucrados en el proceso; se han identificado *Protatheca sp.*, *Candida glabrata*, *C. kefir*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* y *Acetobacter sp.* (De La Garza-Toledo *et al.*, 2008; Casas *et al.*, 2015; Reyes *et al.*, 2019).

El efecto de los microorganismos nativos, los distintos procedimientos y experiencias de cada maestro sotolero, resultan en un producto con diferentes características organolépticas, por tanto, es posible que las levaduras no sean las mismas entre regiones (Sierra *et al.*, 2008).



Figura 5. Fermentación natural de sotol, sotolera Oro de Coyame.

1.6 Destilación

Es el proceso por el cual se lleva a cabo la separación de los alcoholes contenidos en el mosto fermentado una vez sometido al calentamiento, evaporación y condensación. Se emplea para ello un alambique (CIATEJ, 2014).

De acuerdo con el porcentaje de los azúcares provenientes del *Dasyliirion* ssp. que se utilizan en la elaboración del sotol, éste se puede clasificar en:

- sotol, se obtiene de la destilación y rectificación de mostos, en cuya formulación se han adicionado hasta un 49 % de azúcares distintos a los derivados de la molienda (Norma Mexicana, 2004).
- sotol 100 % puro, es el producto que se adquiere de la destilación y rectificación de mostos, preparados directa y originalmente del material extraído, derivado de la molienda de los tallos maduros de *Dasyliirion* ssp., previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas, y sometidos a una fermentación alcohólica con levaduras.

1.7 Añejamiento

El sotol puede ser incoloro o amarillento dependiendo del madurado y se utilizan recipientes de diversos materiales como la madera, roble, encino, acacia, castaño, haya, fresno, etc.

Respecto a sus características adquiridas después de la destilación y rectificación, el sotol se puede clasificar en:

- Sotol blanco; sin madurar.
- Sotol joven; con una maduración de 1 a 2 meses
- Sotol reposado; tiene un proceso de maduración de por lo menos dos meses
- Sotol añejo; la maduración es de un año en adelante



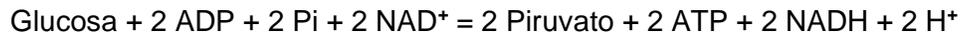
Figura 6. Barricas para el añejamiento del sotol, sotolera Oro de Coyame.

2. Características de *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae es una levadura heterótrofa ampliamente estudiada y utilizada en la industria debido a su facultad para producir etanol. Tiene la capacidad de consumir un rango amplio de carbohidratos, por ejemplo: glucosa, fructosa, manosa, galactosa, maltosa, matotriosa y sacarosa, pero no metaboliza la ribosa, xilosa, arabinosa, celobiosa, hemicelulosa, celulosa e inulina (Stewart y Russell, 1998).

S. cerevisiae es anaerobia facultativa; es decir, pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno. La formación de etanol se produce a través de la vía glucolítica, donde teóricamente, 1 g de glucosa producirá 0.51 g de etanol y 0.49 g de CO₂. Sin embargo, debido a que parte de la glucosa se usa para el crecimiento celular (producción de

biomasa), se considera 0.46 g de etanol y 0.44 g de CO₂ a partir de 1 g de glucosa. La reacción puede resumirse como:



La glucosa se convierte en ácido pirúvico y energía en forma de NADH + H⁺. El NADH + H⁺ se reoxida a NAD⁺, el cual participa nuevamente en la glucólisis. De esta manera, las levaduras pueden continuar creciendo y metabolizando el azúcar. En la conversión de glucosa a etanol y dióxido de carbono durante la fermentación, intervienen 12 enzimas, 10 para degradar la glucosa en piruvato generando ATP para el crecimiento de la levadura, y dos enzimas para convertir el piruvato en los productos finales de fermentación, como la levadura mantiene su equilibrio redox. Estas dos enzimas, la piruvato descarboxilasa y la alcohol deshidrogenasa usan iones metálicos: magnesio y zinc, respectivamente como cofactores. Por lo tanto, la biodisponibilidad de iones metálicos en los medios de fermentación puede afectar la eficiencia de la conversión de azúcar en etanol y el progreso general de la fermentación (Walker, 2004).

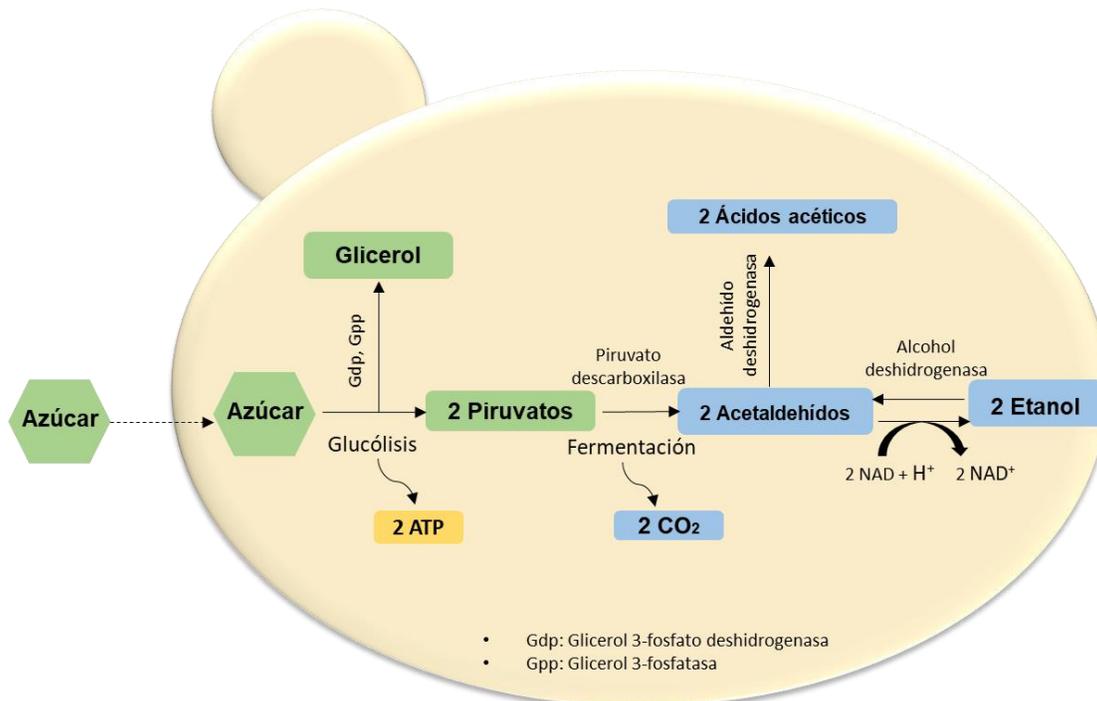


Figura 7. Proceso de glucólisis y fermentación (Dzialo *et al.*, 2017; Walker y Walker, 2018).

Del metabolismo de *S. cerevisiae* se producen también compuestos aromáticos que incluyen ésteres, alcoholes superiores, carbonilos, derivados de ácidos grasos,

compuestos de azufre, tioles volátiles y monoterpenos que tienen un rol ecológico, por ejemplo, alcoholes y ésteres se han reportado como atrayentes de insectos y/o para competir con otros microorganismos (Dzialo *et al.*, 2017).

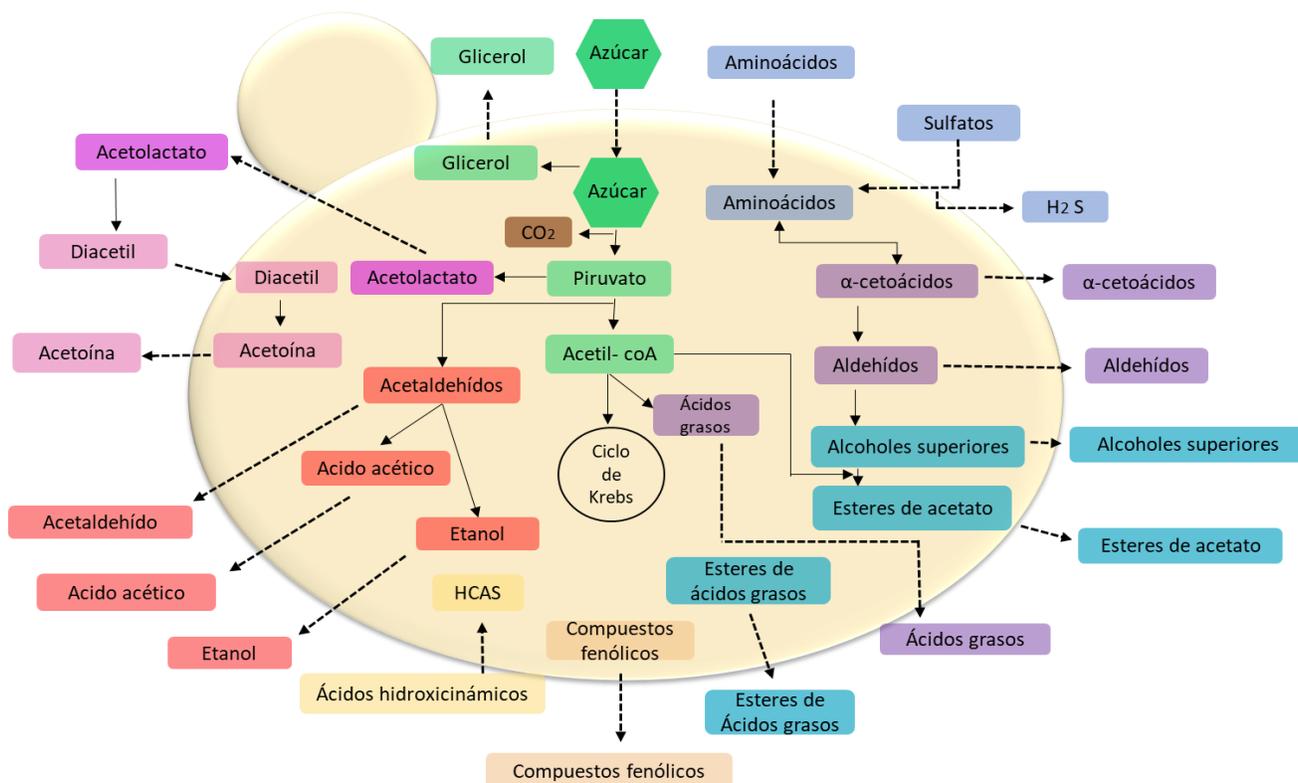


Figura 8. Compuestos aromáticos producidos durante la fermentación por *S. cerevisiae* (Dzialo *et al.*, 2017).

3. Selección y domesticación de cepas de *S. cerevisiae*

Muchas cepas industriales se utilizan debido a motivos históricos, en lugar de seleccionarse para una aplicación específica, por lo que, a menudo no son óptimas para sus propósitos. Según (Querol *et al.*, 2003) menciona que los cultivos puros de levaduras de la misma zona son más efectivos, debido a que están adaptadas a las condiciones climáticas y a la materia prima. Las demandas de mayor productividad, mayor utilización del rango de sustratos y producción de compuestos no convencionales en la industria, así como las cambiantes preferencias del consumidor, despiertan un interés en mejorar las cepas industriales utilizadas actualmente, así como, seleccionar y desarrollar cepas con

tolerancia a osmolitos, ácidos, etanol y temperaturas altas y bajas (Liti *et al.*, 2009; Steensels *et al.*, 2014). Cada cepa de levadura tiene una huella aromática, pero dependerá de las condiciones de fermentación (Cedrón, 2004).

Los criterios de interés general para seleccionar cepas de levaduras incluyen buena eficiencia fermentativa, baja producción de SO₂ y H₂S, resistencia a toxinas expulsadas por otras levaduras o bien la producción de estas para eliminar microorganismos no deseados, tolerancia a niveles altos de etanol y SO₂ (Pretorius, 2000). Además, se debe considerar las necesidades particulares de la región como la adaptación a altas temperaturas (Torija *et al.*, 2003), mostos con concentraciones altas de azúcares (Mercado *et al.*, 2007) o requerimientos bajos de nitrógeno asimilable. Recientemente se ha optado por el uso de cepas autóctonas en La Patagonia, Argentina donde se seleccionaron cepas de *S. cerevisiae* nativas con alta producción fermentativa y baja producción de sulfuros en la elaboración de vinos (Lopes *et al.*, 2007).

En Valencia, España se busca un perfil organoléptico más complejo en vinos con levaduras nativas no-*Saccharomyces* y cepas de *S. cerevisiae* resistentes a altas concentraciones de etanol (Viana *et al.*, 2008).

Jolly *et al.*, (2003), en Sudáfrica realizaron fermentaciones individuales en mosto de uva y encontraron que las levaduras no-*Saccharomyces* (*Candida ssp.* y *Kloeckera apiculata*) tienen menores rendimientos de producción de etanol en comparación de *S. cerevisiae*. Por ejemplo, Álvarez *et al.*, (2020) seleccionaron tres cepas autóctonas de *S. cerevisiae* y tres no *Saccharomyces* en fermentaciones de Bacanora, un destilado de agave que se realiza al norte de México, y hallaron que las levaduras *S. cerevisiae* produjeron $25,51 \pm 1,19$ g/L de etanol al final del proceso de fermentación, con una productividad volumétrica de etanol de $1,76 \pm 0,17$ g/L/h, mientras que para las tres no *Saccharomyces* los parámetros fueron $15,56 \pm 1,68$ g/L y $0,484 \pm 0,06$ g/L/h, respectivamente.

S. cerevisiae es ampliamente utilizada para llevar a cabo fermentaciones controladas en diferentes sustratos; por ejemplo: se ha seleccionado en vinos, cerveza, tequila y mezcal (De Souza *et al.*, 2011; Aldrete *et al.*, 2018). Ya que se obtiene productos con mayor calidad, fermentaciones reproducibles, tiempos más cortos de fermentación y reducción del desarrollo de levaduras no *Saccharomyces* no deseadas en distintas bebidas como el vino (Domínguez, 2006; Swiegers *et al.*, 2006; Serjeant *et al.*, 2008; Miranda *et al.*, 2015.).

Cepas autóctonas de *S. cerevisiae* aisladas de destilerías de caña, han demostrado un impacto positivo en el rendimiento de etanol y reducción de costos en la producción de bioetanol en plantas brasileñas (Basso *et al.*, 2008).

Basso *et al.*, (2008) encontraron que 68 de 340 cepas de *S. cerevisiae* aisladas, no eran floculantes, por lo que estas se colocaron en simulaciones de fermentaciones industriales, a partir de esto, seleccionaron 14 cepas que presentaban alta viabilidad durante el reciclaje, alto rendimiento de etanol y baja producción de glicerol.

Se han identificado cepas de *S. cerevisiae* que divergen en morfología y funcionalidad, ya que hay diferencias significativas para emplearlas en distintos procesos de producción, morfológicamente pueden ser esféricas, elipsoidal, cilíndrica o más alargada, el color pueden variar desde colores tenues hasta café, y pueden ser de superficie lisa o rugosa. Funcionalmente presentan formas de crecer en medios líquidos, debido a que algunas cepas floculan y otras no (Hernández *et al.*, 2003), molecularmente se han encontrado variaciones en la estructura de su genoma, deleciones, duplicaciones de genes, o repeticiones de copias de secuencias que repercuten en la morfología y funcionalidad, lo que ayuda a la selección y domesticación de las cepas (Gallone *et al.*, 2016). En el trabajo de Ibáñez *et al.*, (2014), los resultados indican que las variaciones de genes subteloméricos e intracromosómicos están involucrados en funciones metabólicas relacionadas con la homeostasis celular, las interacciones de célula a célula y el transporte de solutos como iones, azúcares y metales, los cuales desempeñan un papel importante en la adaptación a las nuevas condiciones ambientales.

La domesticación se define como la selección y reproducción de especies silvestres con características benéficas, que puedan crecer en ambientes artificiales (Gallone *et al.*, 2016). En el caso de las levaduras es a nivel de cepa donde se centra el interés de los productores, para la elaboración de cerveza, vino, tequila, pan, prácticas de laboratorio, entre otras (Stewart y Russell, 1998).

Tabla 2. Características fisiológicas de *S. cerevisiae*

Ventajas	Desventajas
Desarrollo óptimo para fermentaciones a gran escala.	Incapacidad para fermentar ciertos azúcares (p. ej., xilosa, arabinosa, lactosa, maltodextrinas)
Alta tasa de fermentación y rendimiento de etanol	Acumulación de carbohidratos de almacenamiento como respuesta al estrés
Perfil de sabor y aroma agradable en bebidas alcohólicas	Capacidad de floculación variable

Rojas *et al.*, 2001; Flanzy *et al.*, 2003; Ibáñez *et al.*, 2014; Walker y Walker, 2018.

4. Identificación molecular de *S. cerevisiae*

4.1 Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP)

Se han desarrollado diferentes métodos de identificación basados en la similitud y disimilitud de DNA, RNA o proteínas (Esteve *et al.*, 1999), empleando marcadores moleculares que permiten visualizar e indicar la presencia de variantes alélicas, conocidas como polimorfismo, los cuales ayudan a separar grupos taxonómicos; poblaciones, especies o cepas (Astorga, 2008). Un método fácil y ampliamente utilizado es la amplificación de fragmentos de restricción de longitud polimórfica por sus siglas en inglés PCR-RFLP, el cual se basa en la amplificación de regiones específicas de las unidades de repetición de rDNA, tales como los espaciadores transcritos internos, ITS1 e ITS2 (región no codificante, variable) y el gen de rRNA 5.8S, (región codificante y conservada) (Guillamón *et al.*, 1998; Ramírez y Torres, 2016).

5. Tipificación molecular de cepas de *S. cerevisiae*

5.1 Amplificación de secuencias Delta (δ)

Las secuencias delta son elementos de 0.3 Kb (334pb) que flanquean los retrotransposones Ty1 y Ty2 en *S. cerevisiae* (Cameron *et al.*, 1979). Se han encontrado entre 35 y 55 copias de secuencias delta en el genoma de la levadura como parte de retrotransposones Ty1 o como elementos aislados. Estas secuencias delta se concentran en regiones genómicas que unen genes de tRNA. El número y la ubicación de estos elementos tienen cierta variabilidad intra-específica que Ness *et al.*, (1993) utilizaron para diseñar cebadores específicos: 1 δ y 2 δ útiles para la diferenciación de cepas de *S. cerevisiae*. Legras y Karts, (2003) optimizaron esta técnica mediante el diseño de dos nuevos cebadores: 12 δ y 21 δ obteniendo mayor polimorfismo (Castellucci 2011; Vázquez *et al.*, 2016).

5.2 MSP-PCR, Amplificación de microsatélites

La técnica de MSP-PCR o también conocida como microsatélites, puede tipificar cepas de la misma especie. Los microsatélites son secuencias cortas compuestas de repeticiones en tándem de uno a diez nucleótidos (Field y Wills, 1998; Matsheka *et al.*, 2006). Estas secuencias se encuentran dispersas por todo el genoma de las levaduras, tanto en regiones codificantes como no codificantes y la variación se manifiesta normalmente como diferencias en longitud entre los distintos alelos del mismo locus (Tautz, 1989; González *et al.*, 2001). Esta diversidad alélica permite identificar cepas dentro de la misma especie, por lo que son empleados como herramienta para la tipificación entre las distintas cepas de *S. cerevisiae* (González *et al.*, 2001; Legras *et al.*, 2005; Vaudano y García, 2008).

Los cebadores ampliamente utilizados son GAC₅, GACA₄, M13 y GTG₅, porque son capaces de separar un complejo de especies estrechamente relacionadas (Ramírez *et al.*, 2014), de acuerdo con Libkind, (2007), los GTG₅, permiten una mayor diferenciación que M13, ya que este, amplifica regiones de DNA más conservadas. No obstante, el comportamiento de los distintos iniciadores en la técnica de MSP-PCR varía conforme al grupo filogenético en estudio.

6. Floculación en *Saccharomyces cerevisiae*

La floculación es un proceso de agregación multivariante de células de levadura en masas multicelulares llamados flóculos (Soares, 2010). Es un mecanismo de protección cooperativa de las células ante condiciones de estrés (Stratford, 1989; Vallejo *et al.*, 2013).

La pared celular de *S. cerevisiae* está conformada por una capa interna compuesta por β -glucanos y quitina y una capa externa fibrilar constituida por α -manosa. En valores de pH fisiológicos, la pared celular de la levadura tiene una carga negativa debido a la ionización de grupos carboxilos y fosfodiéster de las proteínas. La repulsión de las cargas del mismo signo evita que las células se acerquen lo suficiente y actúa como una barrera efectiva para la agregación celular (Soares, 2010).

La floculación es un fenómeno complejo influenciado por una multiplicidad de factores externos que afectan en diferentes niveles la expresión de los genes floculantes (genes FLO) junto con la diversidad de características genéticas de estos genes provenientes de una alta tasa de mutación que afectan el grado de floculación y la sensibilidad al estrés (Soares, 2010).

Miki *et al.*, (1982) propusieron que proteínas tipo lectinas, llamadas floculinas (adhesinas o zimolectinas) se encuentran presentes solamente en células floculantes, que reconoce e interactúan con residuos de carbohidratos de α -manosa (receptores) de células vecinas. Los iones de calcio permiten a las lectinas alcanzar su conformación activa (Miki *et al.*, 1982; Álvarez *et al.*, 2014). Existen dos fenotipos, concretamente Flo1 y New Flo, descritas en *Saccharomyces cerevisiae* (Stratford y Assinder 1991). El fenotipo Flo1 es constitutivamente floculante, exclusivamente sensible a la manosa, codificadas por FLO1, FLO5 y FLO9. Las proteínas Flo1p se encuentran en la pared celular y son ricas en serina y treonina (Bony *et al.*, 1997).

El fenotipo de New Flo muestran una floculación estacionaria, que es inhibida por maltosa, manosa, glucosa y sacarosa (pero no por galactosa) (Stratford y Assinder 1991).

Los factores que promueven la floculación son: las interacciones hidrofóbicas superficiales, carga de la pared celular, cambios de pH, por ejemplo, en cepas industriales y de laboratorio, la floculación ocurre en un amplio rango de pH de 2.5 – 9.0, mientras que en cepas cerveceras de tipo NewFlo en un rango de pH de 2.5 – 5.5.

El etanol también tiene un efecto positivo en la floculación. Sin embargo, el mecanismo no está claro. Se piensa que reduce la constante dieléctrica y origina una disminución de la repulsión electrostática célula-célula (Dengis *et al.*, 1995), y también parece actuar en la expresión de genes *FLO*. La concentración de etanol para provocar la floculación es variable, Soares *et al.*, (2004) encontró que *S. cerevisiae* de cerveza con etanol (4 %v/v), como única fuente de carbono, nunca pierden la capacidad de floculación. La concentración de azúcar y otras condiciones de estrés; por ejemplo, la cantidad traza de Ca^{2+} de 10^{-5} – 10^{-8} /mol es suficiente para promover la floculación y en otras cepas se requiere una cantidad mayor de 5×10^{-4} /mol de Ca^{2+} (Soares, 2010).

Se ha reportado que el etanol induce y/o potencia la floculación (Verstrepen *et al.*, 2003), en tanto Zhao y Bai, (2009) indican que la floculación es un mecanismo de protección por estrés hacia al etanol. Este puede actuar sobre la conformación de la pared celular y la carga superficial (Jin y Speers, 2000) o puede inducir los genes *FLO* (Teunissen *et al.*, 1993).

El proceso de floculación también puede ocurrir cuando los azúcares fermentables del medio se agotan y es alta la cantidad de etanol. Si la floculación ocurre al inicio de la fermentación de forma rápida, la levadura no puede incorporar eficazmente los sustratos disponibles, y provoca residuos de azúcares, baja producción de etanol y otros compuestos volátiles. Por lo que la floculación debe ocurrir sólo después de que todos los nutrientes del medio han sido consumidos.

El fenómeno de la floculación se explota en la industria cervecera como una forma fácil, conveniente y rentable de separar las células de levadura agregadas de la cerveza al final de la fermentación (Willaert, 2007). Sin embargo, en otras bebidas cuando las células comienzan a flocular demasiado temprano, se producen aromas indeseables y demasiados azúcares residuales (Goossens *et al.*, 2010).

6. Tolerancia de *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes condiciones de estrés en fermentaciones alcohólicas

Existen diferentes factores que pueden alterar el equilibrio de la fermentación alcohólica afectando las propiedades organolépticas de la bebida, por ejemplo: la cepa de levadura, el tipo y el diseño del fermentador, el pH del mosto, la temperatura de fermentación, la

concentración de carbohidratos, de oxígeno, nitrógeno, aminoácidos, proteínas y vitaminas presentes en el mosto (Stewart y Russell, 1998; Hernández *et al.*, 2003).

6.1 Limitación de fuentes de nitrógeno en mostos

El nitrógeno en el mosto puede estar presente en forma inorgánica (amonio) y de forma orgánica, (aminoácidos, péptidos y proteínas), sin embargo, no todas estas formas son equitativamente disponibles para la levadura (Manginot *et al.*, 1998) debido a que algunas fuentes son consumidas rápidamente. Existen las llamadas “fuentes ricas de nitrógeno” que se convierten fácilmente en glutamato y glutamina, estas fuentes son la glutamina, asparagina y amonio. En tanto la leucina y la fenilalanina se consideran fuentes de nitrógeno "promedio", mientras que la prolina, la metionina, el γ -aminobutirato y la alantoína son ejemplos de fuentes de nitrógeno “pobres” (Magasanik y Kaiser, 2002; Boer *et al.*, 2007). En levaduras de *S. cerevisiae*, el consumo de estas fuentes de nitrógeno tiene un orden preferencial. Evolutivamente esto puede ser una adaptación para utilizar preferentemente aquellas fuentes que mantienen un mejor crecimiento. Este mecanismo es conocido como, represión catabólica por nitrógeno (NCR) (Mas *et al.*, 2013).

La NCR se caracteriza cuando la célula detecta la presencia de las fuentes de nitrógeno ricas y desencadena señales, que activan los genes implicados en el transporte y metabolismo de estas y al mismo tiempo se reprimen los genes implicados en las fuentes más pobres.

El nitrógeno proveniente de aminoácidos en el mosto se utiliza para sintetizar aminoácidos y proteínas. La levadura los asimila por medio de un sistema de transaminasas donde se elimina el grupo amino del esqueleto de carbono, creando un conjunto intracelular de oxoácidos. El conjunto de oxoácidos es un precursor de aldehídos y alcoholes superiores, los cuales contribuyen al sabor de las bebidas fermentadas. Por lo tanto, la formación de alcoholes superiores está relacionada con el metabolismo del nitrógeno (Stewart y Russell, 1998).

Cuando no se dispone del nitrógeno necesario, ya avanzada la fermentación, la multiplicación de la levadura se detiene, la absorción de nitrógeno se ralentiza o cesa y no es posible la síntesis de aminoácidos, por la acumulación de cetoácidos que no es tolerada por la levadura, los compuestos se reducen a alcoholes superiores y repercute en el rendimiento de la fermentación y en el sabor de la bebida (Stewart y Russell, 1998).

6.2 Tolerancia a temperaturas altas

La temperatura del cultivo afecta el metabolismo de la levadura, a temperaturas altas (por arriba de los 20 °C en vinos y cerveza) favorecen la producción de alcoholes superiores, ésteres y ácidos grasos, mientras que a temperaturas entre los 5 °C y los 15 °C favorecen la producción de acetaldehído y diacetilo (Téllez *et al.*, 2012). La eficacia de la fermentación de *S. cerevisiae* a altas temperaturas es muy baja debido al aumento de la fluidez en las membranas a las que la levadura responde cambiando su composición de ácidos grasos (Araque *et al.*, 2008). Las levaduras responden sobre produciendo trehalosa, que estabiliza las membranas plasmáticas de levadura (Cray *et al.*, 2015; Walker y Basso, 2019).

La selección de levaduras termotolerantes se ha obtenido eligiendo sobrevivientes después de una exposición a altas temperaturas (Araque *et al.*, 2008). Estas levaduras termotolerantes son de utilidad para la industria, ya que, pueden ser empleadas, sin que afecte la temperatura su crecimiento y por tanto la producción de etanol (Mejía *et al.*, 2016).

Se ha encontrado en fermentaciones de tequila que la temperatura en los tanques de fermentación oscila entre 28°C a 37°C (Arrizon *et al.*, 2006).

6.3 Tolerancia a pH bajo

Cepas de *S. cerevisiae* son capaces de crecer en un rango de valores de pH muy amplio, desde 2.5 hasta 8.5. Según Carmelo *et al.*, (1996), reportaron que crecen mejor en condiciones ácidas desde pH 4 a 6. Liu *et al.*, (2015). Se ha encontrado en fermentaciones de tequila que el pH ronda entre 3.9 a 4.5 (Arrizon *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2021).

El valor del pH afecta el crecimiento y la velocidad de fermentación de la levadura e influye en los productos de fermentación (Yalcin y Ozbas, 2008). Según Liu *et al.*, (2015) el pH muy ácido al inicio de la fermentación en algunas cepas de *S. cerevisiae* afecta el crecimiento, a causa de una prolongación en la fase de lag, cambiando la tasa de consumo de azúcar, aumentando el contenido final de ácido acético y glicerol, y disminuyendo el contenido final de etanol. Sin embargo, a pH muy alcalinos también el crecimiento se perjudica (Peña *et al.*, 2015).

La presencia de ácidos orgánicos durante la fermentación es tóxica, porque se difunden libremente en el citoplasma, acidificándolo. Por lo tanto, las células exportan protones hacia el espacio extracelular mediante membranas H⁺ATPasas, utilizando ATP (Flecher *et al.*, 2017). Mientras que los ácidos débiles como el ácido acético, los furaldehídos y compuestos fenólicos inhiben el metabolismo de la levadura (Deparis *et al.*, 2017; Walker y Basso, 2019).

6.4 Tolerancia a estrés osmótico

Las cepas silvestres, se encuentran sujetas a variables ambientes, por ejemplo, cambios de osmolaridad. La concentración excesiva de carbohidratos o la falta de estos puede ser extremadamente perjudicial para el funcionamiento celular (Gibson *et al.*, 2007).

Se ha reportado que en fermentaciones con elevadas concentraciones de carbohidratos (mayor o igual a 180g/L), el crecimiento y la viabilidad de la levadura pueden reducirse debido al estrés osmótico (Téllez *et al.*, 2012).

El estrés osmótico puede presentarse cuando se inocula las levaduras en el mosto, debido a que este tiene concentraciones altas de azúcares (Gibson *et al.*, 2007).

Las células pueden ser osmotolerantes u osmoadaptativas, en el primer caso resisten el estrés osmótico y promueven mecanismos para mantener la viabilidad. Mientras la osmoadaptación, es un sistema de respuesta más refinado, activado por una respuesta a cambios de la homeostasis, como una vía mediada por transducción de señales (Tamas y Hohman, 2003; Gibson *et al.*, 2007).

Se ha hallado en fermentaciones de tequila, mezcal y bacanora que los carbohidratos se encuentran entre 8° a 14° brix (Arrizon *et al.*, 2006; Lappe *et al.*, 2008)

6.5 Tolerancia a altas concentraciones de etanol

Cuando aumenta la concentración de etanol en las fermentaciones, se destruye la membrana plasmática de las células, se inhibe el crecimiento y por lo tanto disminuye la fermentación (Chi y Arneborg, 2000; You *et al.*, 2003; Takagi *et al.*, 2005; Huffer *et al.*, 2011; Henderson y Block, 2014). No obstante, las levaduras han desarrollado mecanismos para evitar daños (Chandler *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2009). La respuesta de la levadura al estrés por etanol es compleja, participan diversos aspectos de detección

celular, transducción de señales, transcripción, control postranscripcional, acumulación de protectores y aumento en la actividad de las funciones de reparación. La eficiencia de estos procesos en una determinada cepa de levadura determinará su robustez y, en gran medida, su capacidad para un buen desempeño en procesos industriales (Madeira *et al.*, 2010). Un conjunto de genes de respuesta al estrés que codifican proteínas de choque térmico (HSP) se expresan en respuesta al estrés por etanol, aunque su función precisa no está clara (Piper, 1995). Se cree que tales proteínas tienen una función reparadora más que protectora (Walker, 1998). Algunos de los principales cambios inducidos en la levadura por el estrés del etanol son idénticos a los causados por el estrés por calor, lo que sugiere que puede existir alguna "superposición funcional" entre el calor y daño celular inducido por etanol (Piper *et al.*, 1994; Piper, 1995). La trehalosa se acumula en células sometidas a estrés por etanol y se cree que es un protector del estrés (Mansure *et al.*, 1994; Singer y Lindquist, 1998). La membrana plasmática de la levadura se altera estructuralmente durante el estrés por etanol (Thomas *et al.*, 1978; Ingram y Buttke, 1984; Sajbidor y Grego, 1992) para compensar los efectos nocivos del aumento de la permeabilidad, la fuga de iones y por ende la pérdida del gradiente electroquímico (Leao, y Van Uden, 1984; Chandler *et al.*, 2004).

Se ha encontrado en fermentaciones de bacanora que las cepas de *S. cerevisiae* pueden tolerar entre el 3% al 15% de etanol. (Álvarez *et al.*, 2021), y en mostos de mezcal se ha visto que pueden tolerar hasta el 14 % de etanol (Reyes *et al.*, 2021).

JUSTIFICACIÓN

En otras bebidas destiladas como el tequila se emplean cepas seleccionadas de *S. cerevisiae* para obtener mejores rendimientos, en cambio en las fermentaciones de sotol no se conoce cuáles son las levaduras capaces de desarrollarse de manera óptima, por lo que, en este trabajo se buscan levaduras que toleren condiciones de estrés que se encuentran en fermentaciones abiertas de sotol, fermenten en corto tiempo, produzcan compuestos congenéricos favorables y tengan mayor producción de etanol.

HIPÓTESIS

De las 18 levaduras silvestres aisladas de fermentaciones artesanales de sotol y mezcal, se espera que determinadas cepas tengan la capacidad de tolerar diferentes condiciones de temperatura, osmolaridad, pH y concentración de etanol, sin perjudicar el rendimiento de etanol y producción de compuestos congénicos contribuyendo a tener un sotol de mejor calidad.

OBJETIVO

A partir de 18 cepas silvestres aisladas de fermentaciones naturales de sotol y mezcal, seleccionar aquéllas que presenten mayor tolerancia a distintas condiciones de estrés, produzcan mayor concentración de etanol en menor tiempo y produzcan compuestos congenéricos que contribuyan a mejores propiedades organolépticas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar las 18 levaduras aisladas de fermentaciones naturales de sotol y mezcal y diferenciarlas mediante la amplificación de microsátélites GTG₅ y M13, y fragmentos 12δ y 21δ.
- Evaluar la tolerancia de las distintas cepas seleccionadas, ante las siguientes condiciones
 - Etanol 8 %, 10 %, 12 %, 15 %
 - Choque osmótico con glucosa al 20 %, 30 % y 35 %
 - pH 4.0, 3.6, 3.3
 - Choque térmico a 50 °C durante 30 min, 60 min y 120 min
 - Tratamiento térmico 48 h a 37 °C, 40 °C y 45 °C
 - Tratamiento mixto: 30 % de glucosa, pH 3.2 incubada a 40 °C; 10 % de etanol, pH 3.2 y 40 °C
- Determinar el nivel de floculación de las distintas cepas seleccionadas
- Determinar la cepa o cepas con mayor rendimiento de etanol
- Identificar los compuestos congenéricos producidos al final de la fermentación de las cepas seleccionadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Previamente se aislaron 17 cepas de fermentaciones naturales de sotol de Durango y Chihuahua y una cepa de la fermentación artesanal del mezcal de Oaxaca, las cuales se almacenaron a -80°C en medio YPD; (1 % de extracto de levadura de MCDLAB, 2 % de peptona BD, 2 % de dextrosa BD con glicerol al 30 %).

Tabla 3. Origen de las cepas aisladas

Clave	Estado	Municipio	Sustrato	Etapas de la fermentación
SMIC3	Oaxaca	Santa María	mosto de agave	final
CHDR7	Chihuahua	Aldama	sotol	residual
SC1			mosto de sotol	final
SC2				
SC3				
SSH1-T2				
SSH2-T2				
SG1-T1				
SG2-T1				
SG23-T1				
F1				
F2				
SF1-2		Madera	bagazo de sotol	
SF2-2				
SMF1				mosto de sotol
SMF4				
SCH1		Madera	bagazo de sotol	
SCH2				

Las cepas se cultivaron en medio YPDA (1 % de extracto de levadura de MCDLAB, 2 % de peptona BD, 2 % de dextrosa BD y 1.5 % de agar microbiológico BD) para observar sus características morfológicas en el microscopio y posteriormente se llevó a cabo la identificación molecular.

1. Identificación de levaduras aisladas de fermentaciones naturales de sotol

1.2 Extracción de DNA genómico

Se reactivaron las 18 cepas aisladas en 5 mL de medio YDP, se dejaron en incubación durante 24 h a 30 °C a 150 rpm en una incubadora (Thermo Fisher). Se colectaron las levaduras mediante centrifugación de 1 mL de medio cultivo a 10,000 rpm con una centrifuga (Eppendorf) a 20 °C, 10 min. Una vez concentrada las células, se almacenaron a -80 °C por 12h. Posteriormente se agregaron 200 µL de amortiguador de lisis (2% de tritón X-100, 1 % de SDS, 100 mM de NaCl, 10 mM de Tris con pH 8 y 1 mM de EDTA), se resuspendió y se añadieron 0.3 g de perlas de vidrio y 200µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se colocaron los crioviales en un disruptor (Disruptor Genie SI-D236) durante 3 min y se centrifugaron a 14,000 rpm a 4 °C, 15 min en una centrifuga (Eppendorf). Se extrajeron 80 µL de la fase acuosa que se colocó en microtubos (Eppendorf) con 300 µL de etanol frío al 100 %, se mezcló por inversión y se dejó reposar 1 h en congelación. Se centrifugó a 14,000 rpm a 4 °C, 15 min. Después se dejaron secar a temperatura ambiente durante 15 h. Posteriormente se añadieron 40 µL de amortiguador de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0) y 3 µL de RNAsa A (Invitrogen), con una concentración de 10 µg/mL, se resuspendió y se incubó por 10min a 40 °C. Después se inactivó la RNAsa A incubando los tubos (Eppendorf) a 65 °C por 5 min y el DNA se almacenó 4 °C.

El DNA genómico se colocó en un gel de agarosa al 1%, con marcador de DNA 1 Kb (TrackIt DNA ladder Invitrogen). La electroforesis se llevó a cabo con 0.5X de amortiguador TBE, a 70 V durante 30 min. La integridad del DNA se observó en un fotodocumentador (Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System), y su cuantificación se realizó en un equipo Take-3-Epoch (BioTek, Vermont, EUA). (Los resultados pueden observarse en la figura I y II de anexos).

1.3 Amplificación de la región ITS1-5.8-ITS2

Los cebadores ITS1 e ITS4 se usaron para amplificar la región de rDNA que incluye el gen de rRNA 5.8s y las dos regiones no codificantes designadas como espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) (Esteve *et al.*, 1999).

A la reacción se añadieron 0.5 M de cebador ITS1 (5´TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3´) y 0.5 M de cebador ITS4 5´ TCCTCCGCTTATTAGATATGC 3´, 1 X de amortiguador de PCR (Invitrogen), 2 µL de DNA molde, 200 µM de dNTP´s (Invitrogen), 1 U de la enzima Taq Polimerasa recombinante (Invitrogen), 1.5 mM de MgCl₂ (Invitrogen) y agua libre de RNasa (Invitrogen).

La reacción se llevó a cabo con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguidas de 35 ciclos de desnaturalización de 1 min a 94 °C, con un alineamiento de 2 min a 55.5 °C, una extensión de 2 min a 72 °C, seguidos por una extensión final de 10 min a 72 °C, en un termociclador (Applied Biosystems),

El DNA amplificado se colocó en un gel de agarosa al 1.5 % con un marcador de DNA 1 Kb (TrackIt DNA ladder Invitrogen). La electroforesis se llevó a cabo con amortiguador TBE 0.5X a 80 V durante 40 min y la integridad del DNA se observó en un fotodocumentador (Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System).

1.4 Análisis de restricción

Los cortes se realizaron con las enzimas *HhaI*, *HaeIII*, *HinfI* (Thermo Scientific FastDigest) incubadas por separado. En cada digestión se utilizando 10 µL del DNA amplificado, 18 µL de agua libre de RNasa, 2 µL de amortiguador (Thermo Scientific FastDigest Green Buffer) y 2 µL de enzima respectivamente, en un volumen final de 30 µL. Las mezclas se incubaron a 37°C durante 60 min.

Los fragmentos de corte se separaron en un gel de agarosa al 3 % con un marcador de DNA 1 Kb (TrackIt DNA ladder Invitrogen). La electroforesis se llevó a cabo con amortiguador TBE 0.5X a 80 V durante 60 min. Las bandas obtenidas se observaron en un fotodocumentador (Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System).

Los tamaños de las bandas se analizaron en el software Imagen Lab (Bio Rad) y los resultados se compararon con la base de datos de identificación rápida de levaduras yeast-id.com de la Unidad Asociada CECT-IATA de la Universidad de Valencia.

2. Tipificación de cepas aisladas de fermentaciones naturales de sotol

2.1 Microsatélites, (MSP-PCR)

Se emplearon los oligonucleótidos GTG₅ (5'GTGGTGGTGGTGGTG3') y M13 (5'GTAAAACGACGGCCAG3') en reacciones separadas como dos métodos de tipificación por microsatélites.

Tanto la amplificación con (GTG)₅ como con M13 se utilizó agua libre de RNAsa, 1X de amortiguador de PCR (Invitrogen), 3 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 1 pmol/μL de GTG₅ y 1 pmol/μL de M13 respectivamente (Invitrogen), 60 μM de dNTP's (Invitrogen), 10-15 ng de DNA molde y 1 U de Taq Polimerasa recombinante (Invitrogen). Las reacciones se llevaron a cabo con las siguientes condiciones: desnaturalización de 5min a 94 °C, seguidos de 40 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 50 °C, 90 s a 72 °C y una extensión final de 6 min a 72 °C en un termociclador (Applied Biosystems).

Los productos de amplificación se colocaron en un gel de agarosa al 2 % con un marcador de DNA 1 Kb (TrackIt DNA ladder Invitrogen). La electroforesis se llevó a cabo con un amortiguador TBE 0.5X a 70 V durante 100 min. Las bandas obtenidas se observaron en un fotodocumentador (Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System) y se identificaron en el software Imagen Lab (Bio Rad). A cada banda se le asignó un número para realizar una matriz binaria de presencia / ausencia. Esta matriz de similitud se analizó por UPGMA, aplicando el coeficiente Jaccard para elaborar los dendogramas de cada amplificación (Pérez *et al.*, 2001b).

2.2 Fragmentos Interdeltas

La amplificación con fragmentos interdeltas se realizó considerando el protocolo de Legras y Karst, (2003).

A la reacción se añadieron 20 mM del cebador δ12 (5'TCAACAATGGAATCCCAAC 3') y 20 mM de cebador δ21 (3'CATCTTAACACCGTATATGA 5'), 10 X de amortiguador de

PCR (Invitrogen), 50 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 10 mM de dNTP's (Invitrogen), 20 mM de cebadores (Invitrogen), 800 ng/μL de DNA molde, 1 U de Taq Polimerasa Platinum (Invitrogen) y agua libre de RNAsa (Invitrogen).

La reacción se llevó a cabo con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de 45 s a 93 °C. Alineación de 30 s a 46 °C. de 90 s a 72 °C y una extensión final de 10 min a 72 °C en un termociclador (Bio Rad T100, thermal cycler).

Los productos de amplificación se colocaron en un gel de agarosa al 1.8 % con un marcador de DNA de 1 Kb (TrackIt DNA ladder Invitrogen). La electroforesis se llevó a cabo con un amortiguador TBE 0.5X a 70 V durante 100 min. Las bandas obtenidas se observaron en un fotodocumentador (Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System) y se identificaron en el software Imagen Lab (Bio Rad). A cada banda se le asignó un número para realizar una matriz binaria de presencia / ausencia. Esta matriz de similitud se analizó por Past 3, utilizando el coeficiente de Dice para elaborar el dendograma.

3. Pruebas de tolerancia de las cepas seleccionadas de *S. cerevisiae*

3.1 Tratamientos en medio YPDA

Las cepas seleccionadas (SMF1, SMF4 y SMIC3) por los métodos moleculares (fragmentos interdelta 12δ y 21δ, y microsatélites (GTG₅ y M13) de las 18 cepas aisladas de fermentaciones naturales de sotol se expusieron a diferentes condiciones de estrés.

SMF1, SMF4 y SMIC3 se reactivaron en tubos de ensaye con 5 mL de medio líquido YPD, se incubaron con agitación constante a 150 rpm, durante 24 h a 30 °C en una Incubadora (Thermo Fisher). Posteriormente se añadieron en medio sólido YPDA. Se incubaron durante 48 h a 30 °C, se tomó una colonia de cada una y se sembraron en 5 mL de medio YPD con agitación constante a 150 rpm, durante 72 h. Después se realizó un ajuste turbidimétrico para obtener una absorbancia de 0.5 UA a 600 nm en el espectrofotómetro (UV/VIS GBC Cintral). Posteriormente, se realizaron 6 diluciones seriadas en un volumen final de 1 mL en cajas con pozos de 1.5 mL con agua peptonada

al 0.1 %, de cada dilución se tomó 1 μL y se sembraron en medio YPDA con diferentes tratamientos:

- Tratamiento de etanol: Se sembró por duplicado 6 diluciones de cada una de las cepas seleccionadas en medio de cultivo YPDA como control positivo y en medios de YPDA con 8 %, 10 %, 12 % y 15 % de etanol respectivamente después se incubaron a 25 °C durante 48 h.
- Tratamiento de choque osmótico: Se sembraron por duplicado 6 diluciones de cada una de las cepas seleccionadas en medio de cultivo YPDA como control positivo y en medios de YPDA con 20 %, 30 % y 35 % de dextrosa (BD) respectivamente, posteriormente se incubaron a 25 °C durante 48 h.
- Tratamiento a pH bajo: Se sembraron por duplicado 6 diluciones de cada una de las cepas seleccionadas en medio de cultivo YPDA con un pH de 5.8 y en medios de YPDA con 4.0, 3.6 y 3.3 previamente ajustados con ácido clorhídrico. Posteriormente se incubaron a 25 °C durante 48 h.
- Tratamiento de choque térmico: Se sembraron por duplicado las 6 diluciones de cada una de las cepas seleccionadas en medios de cultivo YPDA y se incubaron a 50 °C durante 30 min, 60 min y 120 min. Después se incubaron por 48 h a 25 °C y el control positivo sólo se incubó a 25 °C durante 48 h.

El conteo celular se realizó terminadas las 48 h de incubación en todos los tratamientos, visualizando colonias separas y definidas según el protocolo de Miles y Misra, (1938). Sin embargo, el diseño experimental y el método que estudia el crecimiento no permite estadísticas adecuadas evaluación o cálculo de error

3.2 Tratamientos en medio YPD

Las cepas seleccionadas se reactivaron en 5 mL de medio líquido YPD, se incubaron con agitación constante a 150 rpm, durante 24 h a 30 °C, en una incubadora (Thermo Fisher), posteriormente se añadieron en medio sólido YPDA, se incubaron durante 48 h a 30 °C, se tomó una colonia y se sembró en 5mL de medio YPD con agitación constante a 150 rpm, durante 72 h a 30 °C. Después se realizó un ajuste turbidimétrico con agua

peptonada al 0.1 % para obtener una absorbancia de 0.5 a 600 nm en el espectrofotómetro. Posteriormente se sembraron en medio YPD con diferentes tratamientos:

- Tratamiento de etanol: de la solución madre ajustada a 600 nm se realizaron 6 diluciones seriadas por duplicado en volúmenes finales de 1 mL de YPD como control positivo y en YPD con 8 %, 10 %, 12 % y 15 % de etanol a volúmenes finales de 1 mL.

- Tratamientos térmicos
 - Choque térmico

De la solución madre ajustada a 600 nm se realizaron 6 diluciones seriadas por duplicado en volúmenes finales de 1 mL de YPD los cuales se incubaron a 50 °C durante 30 min, 60 min y 120 min. Después se incubaron durante 48 h a 25 °C. El control positivo se incubó a temperatura ambiente durante 48 h.

- Incubación a diferentes temperaturas

De la solución madre ajustada a 600 nm se realizaron 6 diluciones seriadas por duplicado en volúmenes finales de 1 mL de YPD que se incubaron a 29 °C (control positivo), 37°C, 40 °C y 45 °C durante 48 h.

El conteo por el método de Miles and Misra se realizó tomando 1 µL de las diluciones de cada tratamiento y sembrando en cultivos YPDA, incubadas durante 48 h, cuando la visualización de las colonias fue óptima.

3.3 Tratamiento mixto

Las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 se reactivaron en 5 mL de medio líquido YPD, se incubaron con agitación constante a 150 rpm, durante 24 h a 30 °C, en una incubadora (Thermo Fisher), posteriormente se adicionó en medio sólido YPDA, se incubaron durante 48 h a 30 °C, se tomó una colonia y se sembraron en 5 mL de medio YPD con agitación constante a 150 rpm, durante 72 h. Después se realizó un ajuste turbidimétrico para obtener una absorbancia de 0.5 a 600 nm en el espectrofotómetro. Posteriormente se

realizaron 6 diluciones seriadas en un volumen final de 1 mL en cajas con pozos de 1.5 mL con agua peptonada al 0.1 %. Las condiciones de estrés combinadas: temperatura 40 °C con pH 3.0 y 30 % de glucosa, y temperatura 40 °C con pH 3.0 y 10 % de etanol. A las 48 h se realizó la siembra del medio líquido (YPD) a medio sólido (YPDA), tomando 1 µL para realizar el conteo celular por el método Miles y Misra, (1938). Los datos recolectados se tomaron a las 48 h, cuando las colonias se encontraban separadas y definidas.

4. Capacidad de floculación de cepas seleccionadas de *S. cerevisiae*

4.1 Ensayo de Helm

Se utilizó una solución madre de 0.05 M de EDTA a pH 7.0, una *solución A* de lavado (0.51 g/L de CaSO₄), una *solución B* (0.51 g/L de CaSO₄, 6.8 g/L de acetato de sodio y 4.5 g/L de ácido acético a pH 4.5).

Las levaduras SMF1, SMF4 y SMIC3 se dejaron crecer en medio YPDA a 30 °C durante 48 h. Posteriormente se tomó una colonia de cada cepa y se dejó incubar en 100 mL en cultivo M11 (Segura *et al.*, 2014) a 30 °C, 120 rpm, durante 48 h, por triplicado en una incubadora (Thermo Fisher). Se realizó un conteo celular por duplicado de cada muestra de cada una de las cepas con una cámara de Neubauer y, el conteo celular fue de 7.9×10^6 células/mL antes de realizar la prueba de floculación. Posteriormente se transfirieron 10 mL de cultivo M11 de las respectivas cepas a tubos (Falcon) de 15 mL, los cuales se marcaron como tubo A y tubo B.

Tratamiento del tubo A. (El tubo A es el control de la prueba de Helm).

Los tubos se centrifugaron a 1500 rpm, durante 5 min en una centrifuga (Eppendorf). El sobrenadante se decantó y se descartó. El pellet se resuspendió en 9 mL de agua destilada y 1 mL de EDTA a 0.05 M. La solución se homogenizó durante 45 s en vórtex y por inversión 5 veces por 15 s. Se tomó 1 mL de la suspensión y se diluyó en 9 mL de agua destilada, se tomó 1 mL de esta solución y se leyó en el espectrofotómetro a 600 nm vs un blanco, para el cual se utilizó agua destilada.

Tratamiento del tubo B.

Los tubos se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min con una centrifuga (Eppendorf). El sobrenadante se decantó y se desechó. El pellet se resuspendió en 10 mL de la *solución A*. La solución se homogenizó durante 45 s en vórtex y por inversión. Posteriormente se centrifugó la mezcla a 1500 rpm durante 5 min. El sobrenadante se decantó. El pellet se suspendió nuevamente con 10 mL de la *solución B*. Se homogenizó durante 45 s en vórtex y por inversión 5 veces por 15 s. Se dejó reposar la solución durante 6 min y se tomó cuidadosamente 1 mL de la superficie de la mezcla, la cual se añadió en 9 mL de agua destilada, se homogenizó en un vórtex durante 15 s, se tomó 1 mL, el cual se leyó en el espectrofotómetro a 600 nm (UV/VIS GBC Cintral). Para obtener el porcentaje de floculación se utilizó la siguiente formula.

$$\%floculación = \frac{(absorbancia\ de\ tubo\ A - absorbancia\ de\ tubo\ B)}{absorbancia\ de\ tubo\ A} \times 100$$

Los parámetros de floculación según Bendiak *et al.*, (1994) fueron los siguientes:

- < 20 % de floculación se clasifican como levaduras no floculantes
- > 85 % de floculación se clasifican como levaduras muy floculantes
- 20 – 80 % se consideran moderadamente floculantes

5. Fermentación con mosto de sotol

5.1 Preparación del mosto de sotol

Se adicionaron 800 g de piezas pequeñas del tallo de sotol en 4 matraces de 4 L con H₂SO₄ al 0.05 % de en una proporción 1:3. Se calentaron durante 6 h a 105 °C. Posteriormente se extrajo el jugo por medio de un extractor (Turmix) recuperando el jugo en un recipiente. Se ajustó el mosto a 10 °Brix, utilizando un refractómetro (Atago, °Brix 0 a 33 %) y se midió el pH con tiras reactivas. El mosto se almacenó en recipientes de plástico a -70 °C y el bagazo se almacenó en bolsas Ziploc.

5.2 Preparación del inóculo

Se añadieron las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 en 5mL de medio YPD para su reactivación. Después de 24 h se les añadió 5 mL más de medio YPD y con un asa se sembraron por agotamiento en cajas petri con medio YPDA, para validar que las cepas no se encontraran contaminadas. Luego de 48 h en medio YPDA, se tomó una colonia de cada cepa y se inoculó por separado en 30 mL de mosto natural de sotol estéril a 5 °Brix. Posteriormente se dejaron incubar por 72 h a 200 rpm con una incubadora (Thermo Fisher) a 25 °C.

5.3 Fermentación

La fermentación se llevó a cabo utilizando los 30 mL de inóculo, los cuales se añadieron en 270 mL de mosto de estéril a 10 °Brix en tubos fermentadores con trampas de CO₂. Cada cepa se inoculó por separado y se realizaron fermentaciones por duplicado. Finalmente se realizaron 6 fermentaciones a las cuales se recolectaron 5 mL de mosto, cada 12 h desde el inicio de la fermentación hasta las 72 h y posteriormente cada 24 h hasta el término de la fermentación.

6. Fermentación con medio semisintético

6.1 Preparación del medio M11

El medio M11 se elaboró con la siguiente composición: 100 g/L de fructosa, 1 g/L de extracto de levadura, 1 g/L de (NH₄)₂SO₄, 3.27 g/L de MgSO₄ 7H₂O, 2.23 g/L de K₂HPO₄, 0.98 g/L de Ca(NO₃)₂4H₂O con un pH de 4.5. El medio se esterilizó y se adicionaron 270 mL en tubos fermentadores con trampas de CO₂ (Segura *et al.*, 2014).

6.2 Elaboración del inóculo

Se añadieron las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 en 5 mL de medio YPD para su reactivación, Después de 24 h se les adicionó 5 mL más de medio YPD y con un asa se sembraron por agotamiento en cajas petri con medio YPDA, para validar que las cepas no

se encontraran contaminadas. Luego de 48 h en medio YPDA, se tomó una colonia de cada cepa y se inoculó por separado en 30 mL en el medio M11, elaborado con 2 g/L de fructosa, 1 g/L de extracto de levadura, 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.27 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.23 g/L de K_2HPO_4 , 0.98 g/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Posteriormente se dejaron incubar por 72 h a 200 rpm en una incubadora (Thermo Fisher) a 25 °C.

6.3 Fermentación

La fermentación se llevó a cabo utilizando los 30 mL de inóculo, los cuales se adicionaron en 270 mL de medio M11 estéril a 10 °Brix en tubos de fermentación con trampas de CO_2 . Cada cepa se inoculó por separado y se realizaron duplicados. Finalmente se realizaron 6 fermentaciones en las cuales se recolectaron 5 mL de medio semisintético, cada 12 h desde el inicio de la fermentación hasta las 72 h y posteriormente cada 24 h hasta el término de la fermentación para su análisis posterior.

7. Determinación de sólidos solubles

Se llevó a cabo la determinación de sólidos solubles en el refractómetro (Atago, °Brix 0 % a 33 %), tomando dos lecturas cada 12 h hasta las 72 h y cada 24 h hasta terminar la fermentación.

8. Determinación de unidades formadoras de colonia durante la fermentación

Se determinó la viabilidad celular por medio del conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) por duplicado de cada tubo fermentador, siguiendo el protocolo de Miles y Misra, (1938) modificado, en el cual se tomó 1 mL de muestra cada 12 h hasta las 72 h y cada 24 h hasta terminar la fermentación. A partir de 1 mL se realizaron seis diluciones seriadas en agua peptonada al 0.1 % (BD) por duplicado, en cada dilución se tomó 5 μL , el cual se sembró en medio sólido YPDA. Se incubaron por 48 h y se llevó a cabo el conteo de UFC.

9. Determinación de pH en la fermentación

La determinación de pH se realizó empleando tiras indicadoras de pH. Se humedeció la tira indicadora de pH con la muestra y el color resultante se comparó con los estándares. Se midió pH al inicio y término de cada fermentación por duplicado.

10. Determinación de monosacáridos, etanol, glicerol y ácido acético durante la fermentación por medio de HPLC

10.1 Preparación de la muestra

De cada fermentación se tomó 1.5 mL por triplicado. Las muestras se centrifugaron a 14000 rpm con una centrifuga (Eppendorf) durante 10 min. El sobrenadante se filtró con una membrana (MF- milipore) de 0.45 μ m.

El análisis de glucosa, fructosa, etanol, glicerol y ácido acético se llevó a cabo por cromatografía de líquidos (HPLC), empleando un cromatógrafo de líquido Waters 1525 equipado con un detector de índice de refracción (Waters 2414) y con una columna Aminex HPX-87H, 300mm x 7.8 mm (Bio-Rad).

10.2 Inyección y análisis de la muestra por cromatografía de líquidos

La identificación se realizó por comparación de los tiempos de retención, y la determinación de concentraciones a través de curvas con patrón externo (ver figuras X-XIV).

Condiciones de operación del cromatógrafo de líquidos

Temperatura: 50 °C

Fase móvil: H₂SO₄ 0.005 M

Flujo: Isocrático: 0.6 mL/min

10.3 Rendimiento y productividad

Los cálculos para obtener los rendimientos y la productividad se calcularon a través de las siguientes formulas:

1. Porcentaje del consumo de fructosa

$$\% \text{ consumo de fructosa} = \frac{g_i - g_f}{g_i} \times 100$$

2. Rendimiento de etanol con respecto al sustrato

$$\text{rendimiento } p/s = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{s_i - s_f} = \frac{g \text{ producto}}{g \text{ sustrato consumido}}$$

3. Productividad

$$\text{productividad} = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{P_f - P_i}{t_f - t_i} = \frac{g \text{ producto}}{L * h}$$

4. Rendimiento de etanol

$$\text{rendimiento de etanol} = \frac{g \text{ de etanol producido}}{g \text{ de etanol teorico}} \times 100$$

Los rendimientos de etanol se analizaron con la prueba Kruscal-Wallis, para determinar las diferencias significativas entre cepas ($p \leq 0.005$) y para analizar las diferencias entre tratamientos se utilizó la prueba pareada t. El análisis de ambos fue realizado en el software GraphPad Prism.

11. Determinación de compuestos volátiles por medio de microextracción en fase sólida

11.1 Preparación de la muestra

Al final de cada una de las fermentaciones, se tomaron triplicados de 3 mL. Se colocaron en viales de 10 mL con 1.5 g de NaCl y 100 ppm de n-butanol. Se incubaron a 65 °C con

agitación constante de 250 rpm por 30 min en una incubadora (Thermo Fisher). Posteriormente se colocó una fibra de CAR/PDMS en el septum del vial para la adsorción de los compuestos volátiles a 65 °C con agitación constante de 250 rpm por 30 min y se llevó a cabo una desorción en el inyector a 250 °C por 10 min.

11.2 Inyección y análisis de la muestra por cromatografía de gases masas

Se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilent modelo 7890B) acoplado a un detector de masa (Agilent modelo 5975C), con una columna capilar HP-INNOWAX de alta polaridad de 30 m de largo y 0.025 mm de diámetro. Se utilizó el modo SCAN para identificar los volátiles, basado en: (a) coincidencia de la biblioteca; (b) medición y confirmación contra fuentes de literatura del índice de retención lineal. Para evitar el efecto matriz se utilizó 100 ppm de n-butanol, como patrón interno.

Condiciones de operación del cromatógrafo de gases masas:

Rampa de temperatura:	50 °C por 5 min, de 50 °C a 210 °C cada 5 °C/min y 210 °C por 5 min. Con un tiempo total de 40 min
Gas acarreador:	Helio
Flujo de la Columna:	1 mL/min
Presión:	8 psi

Se realizaron 3 inyecciones por muestra y la cuantificación se llevó a cabo por normalización de áreas:

$$\% \text{ Área X} = (A_x / \sum A_i) * 100$$

Donde A_x es el área de X y el denominador $\sum A_i$ es la suma de las áreas de todos los picos cromatográficos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Identificación molecular de levaduras aisladas de fermentaciones naturales de sotol

La amplificación por PCR de la región ITS1-5.8-ITS2 de las 18 cepas aisladas, arrojó un tamaño de 850 pb que corresponde a lo reportado por Fernández *et al.*, (2000), para levaduras del género *Saccharomyces*. La digestión de este fragmento con las enzimas *Hha* I, *Hae* III y *Hinf* I resultó en cortes enzimáticos de tamaño parecido entre las 18 cepas aisladas que se pueden observar en la tabla 3.

Los geles de electroforesis de la amplificación de ITS1-5.8-ITS2 como los geles de los cortes por las tres enzimas muestran un perfil de bandeo homogéneo. Estos se pueden visualizar en el apartado de anexos, en las figuras III-VI.

La enzima *Hha* I generó tres cortes: el tamaño del fragmento más grande va desde los 360 pb hasta 403 pb, el segundo fragmento osciló entre 325 pb y 360 pb y el fragmento más pequeño osciló de 127 pb a 147 pb. La enzima *Hae* III generó 4 fragmentos: el tamaño del fragmento más grande 303 a 330 pb, y los otros fragmentos presentaron tamaños: 226-251 pb, 164 pb -189 pb y 130 pb - 100 pb. La enzima *Hinf* I generó tres cortes con los siguientes tamaños 358-406 pb, 117-130 pb y 90-100 pb. Los tamaños de los fragmentos junto con el tamaño del producto de amplificación, al compararlos con la base de datos de yeast.id con un rango de +/-30 pb arrojó el resultado de que el 100 % de confiabilidad las 18 cepas pertenecen a *S. cerevisiae*. Los resultados de los tamaños de cortes obtenidos en este trabajo son similares con los reportados por Pham *et al.*, (2011), en el cual la enzima *Hha* I cortó tres fragmentos con los siguientes tamaños: 375 pb + 325 pb + 150 pb, *Hae* III generó 4 fragmentos con cuatro cortes de 325 pb + 230 pb + 170 pb + 125 pb y *Hinfl* generó tres cortes de 375 pb + 365 pb + 110 pb, los cuales son agrupados dentro de la especie *S. cerevisiae* y con los reportados por Segura *et al.*, (2010).

Tabla 4. Identificación de las 18 cepas aisladas de fermentaciones naturales de sotol mediante RFLP de la región ITS1-5.8ITS2, con sus respectivos tamaños de amplificación, su digestión con las enzimas *Hha* I, *Hae* III y *Hinf* I y su grado de confiabilidad como cepas pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*.

Cepas	ITS1-5.8 -ITS2	<i>Hha</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	+/- pb	% de confiabilidad
SF2-2	857pb	364+330+131	310+226.3+164+121	375+125+90	+/- 30	100% <i>S. cerevisiae</i>
SG2-2	850 pb	364+332+133	305+230+164+121.5	375+119+90	+/- 30	100% <i>S. cerevisiae</i>
SSH1-T2	850 pb	364+332+133	315+238.6+183+127	379+121+90	+/- 30	100% <i>S. cerevisiae</i>
SSH2-T2	850 pb	364+332+133	300+226+169+120	387+127+90	+/- 30	100% <i>S. cerevisiae</i>
SMIC3	850 pb	360+332+134	321+238.6+179+121	402+130+90	+/- 30	100% <i>S. cerevisiae</i>
SG3-T1	850 pb	360+325+131	326+238.6+183+138	406+130+90	+/- 30	100% <i>S. cerevisiae</i>
CDRH7	850 pb	360+325+128	326+250+195+138	400+130+100	+/- 30	100% <i>S. cerevisiae</i>
SMF4	850 pb	377+350+133	332+247+183+121	390+128+100	+/- 30	100% <i>S. cerevisiae</i>
SCH1	850 pb	380+342+139	315+234+184+126	358+124+100	+/- 30	100% <i>S. cerevisiae</i>
SC2	850 pb	396+358+142	310+230+169+106	372+123+100	+/- 30	100% <i>S. cerevisiae</i>
SC1	850 pb	393+356+145	305+234+162+100	370+124+100	+/- 30	100% <i>S. cerevisiae</i>
SCH2	850 pb	403+365+147	315+227+165+111	368+117+100	+/- 30	100% <i>S. cerevisiae</i>
F2	850 pb	400+365+142	332+251+176+111	370+117+100	+/- 30	100% <i>S. cerevisiae</i>
SF1-2	850 pb	359+332+127	310+230+172+126	358+122+100	+/- 30	100% <i>S. cerevisiae</i>
F1	850 pb	371+340+125	307+226+163+117	368+121+100	+/- 30	100% <i>S. cerevisiae</i>
SG1-T1	850 pb	373+342+127	303+226+163+122	368+121+100	+/- 30	100% <i>S. cerevisiae</i>
SC3	850 pb	377+342+127	310+231+170+122	370+124+100	+/- 30	100% <i>S. cerevisiae</i>
SMF1	850 pb	381+352+137	310+234+169+133	365+118+100	+/- 30	100% <i>S. cerevisiae</i>

2. Tipificación molecular de cepas de *S. cerevisiae* por medio de secuencias de microsatélites GTG₅ y M13

Los resultados de MSP-PCR-GTG₅ se esquematizan en las figuras 9 y 10, donde se muestra el gel de electroforesis y dendograma elaborado por UPGMA, con coeficiente de similitud Jaccard respectivamente de las 18 cepas de *S. cerevisiae*, en el que se observa la diferencia de cuatro cepas (SMF1, SMF4, SMIC3 y SCH2). En la figura 8 el patrón de bandeo de SMF1 y SCH2 es similar, a excepción de la presencia de una banda de 2,705.4 pb en la cepa SCH2. En el dendograma se observa la agrupación de (SC2, SC3 y SF2-2) como la misma cepa, y cataloga a (SG3T1, SC1, SSh1T2, SCH1, CHDR7, SSh2T2, SF12, SG2T1, SG1T1, F1 y F2) como una sola cepa.

La tipificación con MSP-PCR-M13 se puede apreciar en la figura 11, donde se muestra el gel de electroforesis y sólo se distingue a SMF4 con seis bandas de distinto tamaño a diferencia de las 17 cepas restantes de *S. cerevisiae*, las cuales presentan un perfil de bandeo similar.

El análisis de resultados de la tipificación con MSP-PCR-GTG₅ y M13, implicó varias repeticiones, ya que algunas bandas fueron difíciles de distinguir, probablemente a factores de pureza del DNA y condiciones de electroforesis como menciona Ramírez *et al.*, (2014), estos factores pueden hacer de este, un método variable e indicar sesgos.

Los resultados de MSP-PCR con GTG₅ y M13 indican que el cebador GTG₅ reflejó mayores diferencias entre las cepas de estudio que utilizando el cebador M13, estos resultados son parecidos a los reportados a Libkind (2007). Según Libkind, el comportamiento de los distintos iniciadores en la técnica de microsatélites (MSP-PCR) varía con el grupo filogenético en estudio, por lo que, el iniciador M13 amplifica regiones más conservadas, por tanto, es menos sensible para diferenciar cepas estrechamente cercanas de *S. cerevisiae*, sin embargo, MSP-PCR es una prueba de rutina que se ha utilizado para identificar diferentes cepas de levaduras y bacterias. Para la tipificación de levaduras *Saccharomyces* comúnmente se realiza con los cebadores GTG₅ y M13 (Ramírez *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2005). MSP-PCR ha permitido estudiar la dinámica poblacional de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Querol *et al.*, 1992a), así como para el control de la producción (Legras y Karst 2003). Según Hennequin *et al.*, (2001), los

microsatélites exhiben un nivel de polimorfismo para diferenciar cepas estrechamente relacionadas

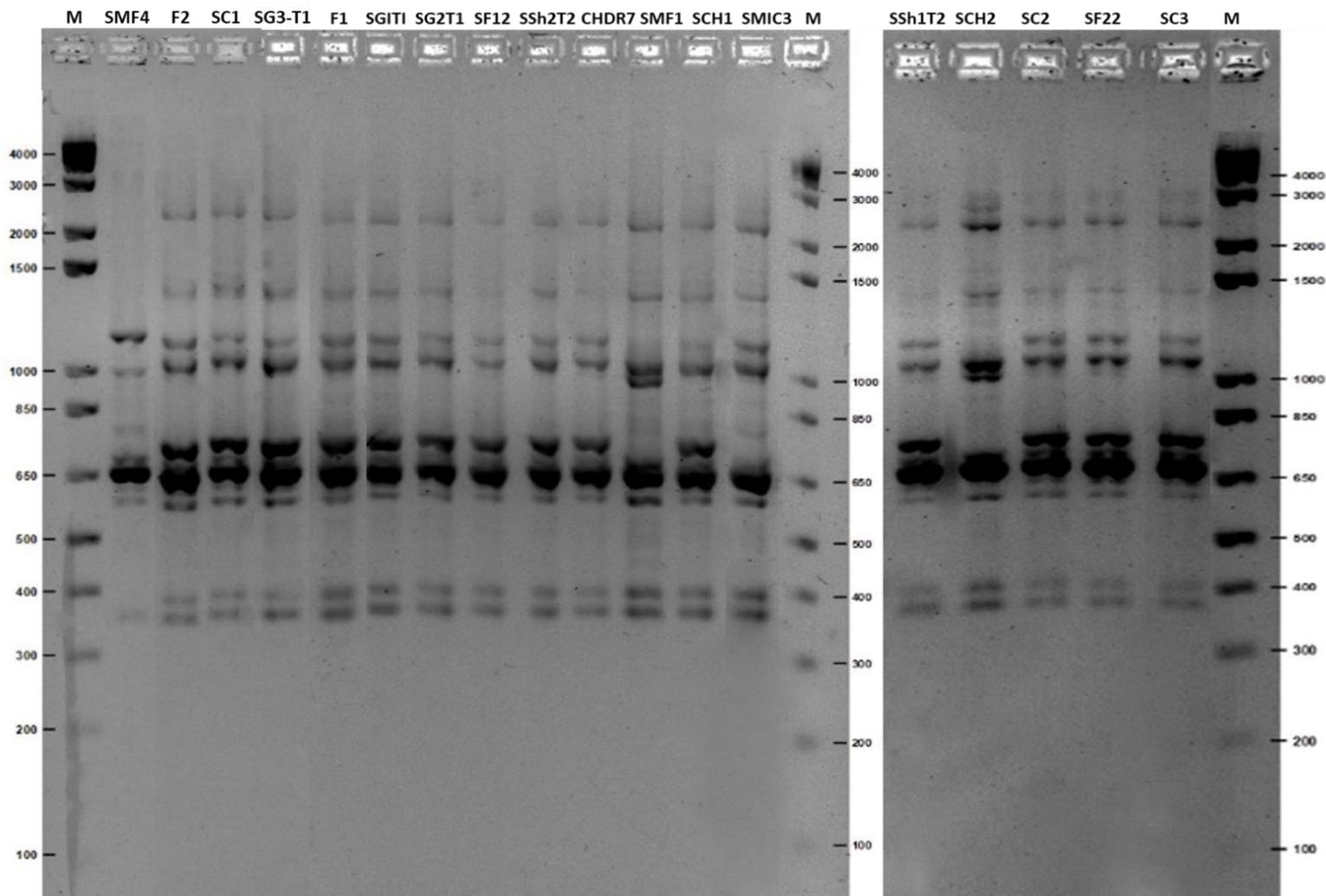


Figura 9. Gel de electroforesis de MSP-PCR-GTG5 de las 18 cepas de *S. cerevisiae* aisladas de fermentaciones naturales de sotol.

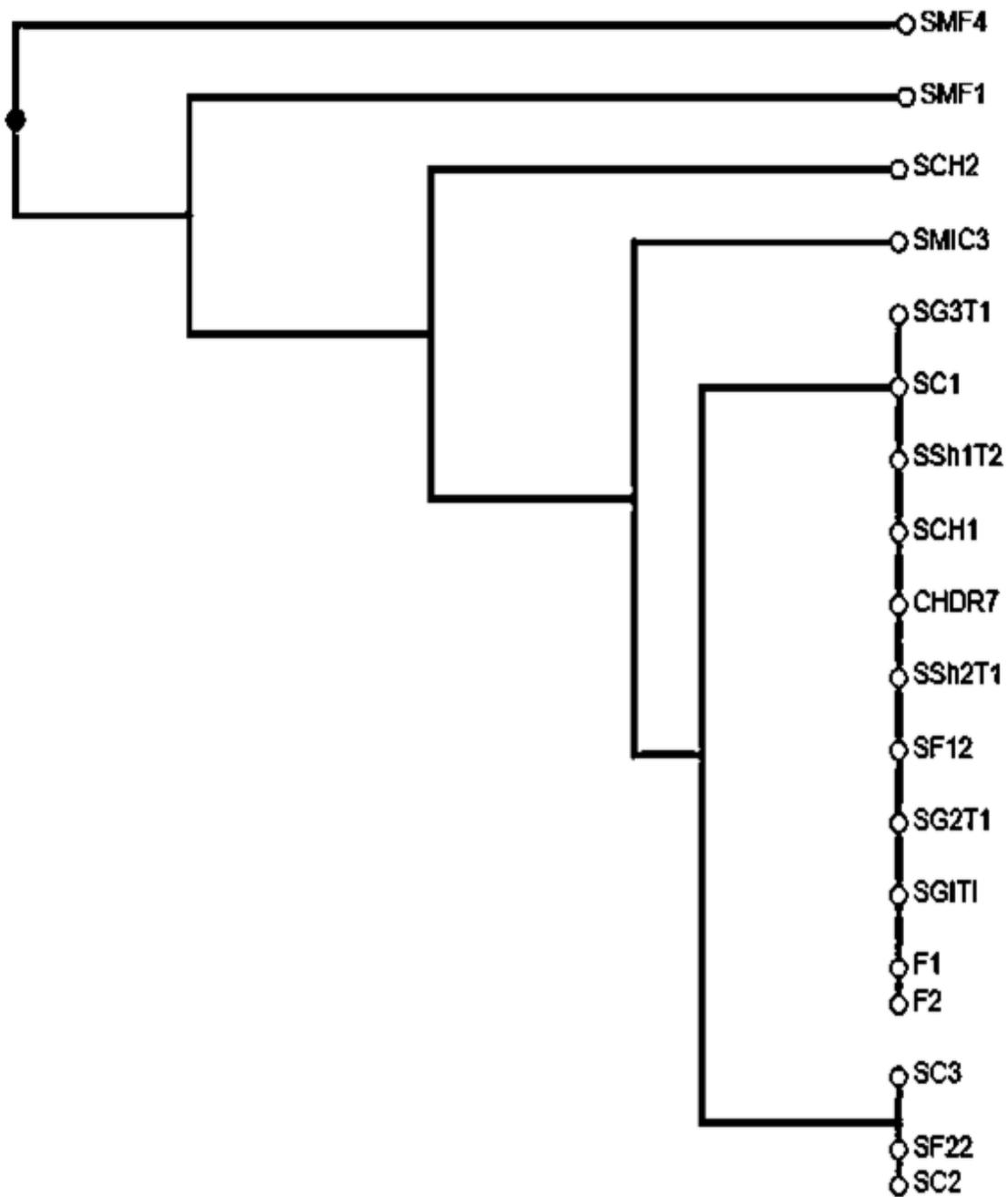


Figura 10. Dendrograma elaborado por UPGMA, coeficiente de similitud Jaccard, de MSP-PCR con GTG_5 de las 18 cepas de *S. cerevisiae* aisladas de fermentaciones naturales de sotol.

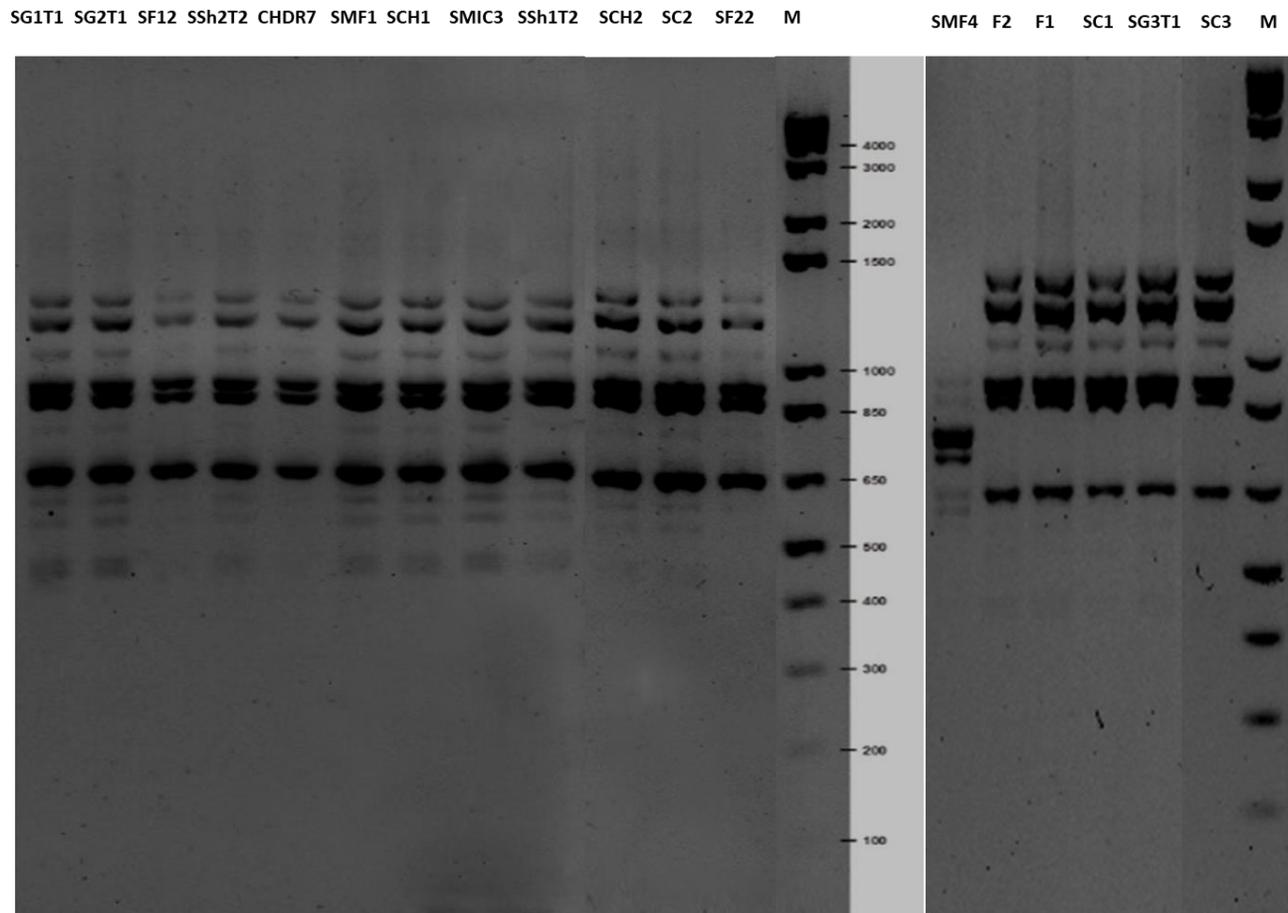


Figura 11. Gel de electroforesis de MSP-PCR-M13 de las 18 cepas de *S. cerevisiae* aisladas de fermentaciones naturales de sotol.

3. Tipificación molecular de cepas de *S. cerevisiae* por medio de fragmentos interdeltas

La tipificación con fragmentos 12δ y 21δ mostró mayor sensibilidad para diferenciar las cepas de *S. cerevisiae* en comparación con el método de microsatélites, sin embargo, el patrón de bandas suele cambiar de acuerdo con la cantidad de DNA.

Aunque se estandarizó la concentración de DNA, algunas bandas son difíciles de distinguir (ver figura VII). El dendograma de la figura 12, muestra dos grupos SC1, SC2, SC3, SCH1, SF1-2, SG3T1 SF2-2, SSh1T2, SSh2T2, F1, F2, SG3T1, SG2T1, SG1T1 y CHDR7 y en el otro grupo a SMF4, SMF1, SCH2 y SMIC3, la cepa con mayor disimilitud fue SMF4 y SMIC3. Este dendograma catalogó a las cepas SG1TI, SG2TI y SF2-2 como la misma cepa y F1 y F2 como similares.

Los métodos utilizados (fragmentos interdeltas y microsatélites) ayudaron a distinguir tres cepas con mayor grado de disimilitud genotípica, para poder realizar una preselección de cepas nativas de *S. cerevisiae* y optimizar tiempo y materiales en las cinéticas de fermentación.

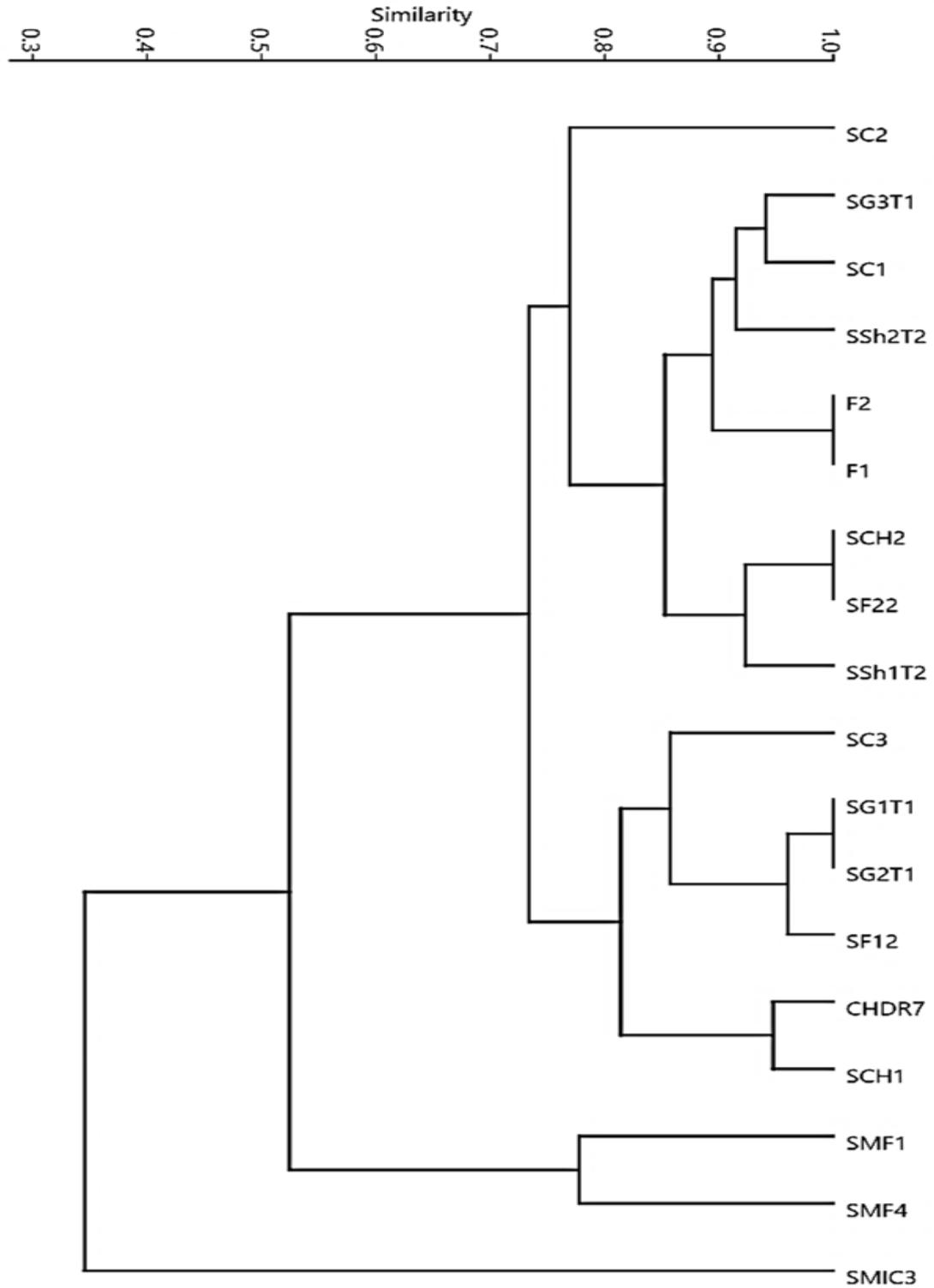


Figura 12. Dendrograma de fragmentos Interdeltas elaborado por Past 3, coeficiente de similitud de Dice, de las 18 cepas de *S. cerevisiae* de fermentaciones naturales de sotol.

4. Pruebas de tolerancia de las cepas SM1, SMF4 y SMIC3

4.1 Tolerancia celular a diferentes concentraciones de etanol

La tolerancia de las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 se puede observar en la imagen VIII y los resultados gráficos en la figura 13. En la figura 13, el eje de las X representa las concentraciones de etanol. En el eje de las Y el log de las UFC/mL de las tres cepas a las 48 h. Las cepas SMF4 y SMIC3 presentaron un comportamiento parecido, ambas cepas al 8 % de etanol mantuvieron 7 Log de UFC/mL, mismo número que el grupo control, pero al 10 % de etanol, decayeron 3 logaritmos de UFC/mL, es decir a 4 Log de UFC/mL, y a partir del 12 % no se presentaron colonias. En el caso de la cepa SMF1, es a partir del 8 % de etanol que su crecimiento disminuye a 5 log de UFC/mL. Al 10% de etanol desciende a 4 log de UFC/mL y al 12 % y 15 % no se visualizaron colonias al igual que en las cepas SMIC3 y SMF4.

En la figura 13b, el log de UFC disminuye conforme las concentraciones de etanol aumenta. Sin embargo, es menos drástico, ya que es hasta al 15 % de etanol que no se visualizaron UFC de las cepas SMF4 y SMIC3, pero si en SMF1. Estos resultados son similares a los reportados por Guimaraes *et al.*, (2006), donde extrajeron cepas de *S. cerevisiae* en diferentes tiempos de una fermentación de uva y encontraron que el 100 % de las cepas toleraban 10 % de etanol, pero al aumentar la concentración al 15 %, solo el 18.7 % tuvo crecimiento celular. Según Lacerda *et al.*, (2013), al evaluar 66 cepas silvestres de *S. cerevisiae* aisladas de caña de azúcar, 18 cepas mostraron tolerancia al 12%. Por el contrario, Belloch *et al.*, (2008), al analizar la tolerancia de etanol de cepas de *S. cerevisiae* en vinos, encontraron que las levaduras crecieron hasta 15 % de etanol a las 48 h. Es posible que ciertas cepas no toleren concentraciones altas de etanol, porque el alcohol inhibe el crecimiento celular al romperse la membrana, debido a que, se disuelven los ácidos grasos que las constituyen, se disminuye la producción de proteínas, así como su función, ya que también el etanol produce cambios conformacionales que pueden inhibir enzimas glucolíticas y afectar organelos como el retículo endoplásmico. (Gibson *et al.*, 2007). En tanto, otras cepas tengan la capacidad adaptativa para poder responder a estos cambios, estabilizando la membrana, aumentando los ácidos grasos insaturados aumentando la concentración de trehalosa en

la pared celular y modificando las vías de señalización (Chandler *et al.*, 2004; Doğan *et al.*, 2014).

A nivel genético, Chandler *et al.* (2004), adicionaron diferentes concentraciones de etanol a cultivos de *S. cerevisiae* y realizaron un análisis de microarreglos, hallando 100 genes asociados a la utilización de energía, transporte, interacciones de la superficie celular, y metabolismo de los lípidos inducidos por cambios fisicoquímicos provocados por la presencia de etanol, por otra parte a nivel metabólico, Avbelj *et al.*, (2015), encontraron que al adicionar 2 % de etanol a fermentaciones de *S. cerevisiae*, el crecimiento celular no se alteró, pero si reprimió levemente la producción de triptófol, tirosol y 2-feniletanol. Por lo que, el etanol no sólo tiene un efecto directo en el crecimiento celular, sino que también influye en las tasas de producción de otros alcoholes, probablemente porque el etanol interrumpe el transporte de aminoácidos y glucosa, al destruir la estructura y la función de las membranas.

Aunque no se tiene referencia de la producción de etanol en *Dasyilirion*, se ha inferido que es parecido a la producida en *Agaves* (De la Garza *et al.*, 2008). De acuerdo con Vera *et al.*, (2009), las producciones máximas de etanol fueron de 8.1% v/v a las 168 h en *A. angustifolia* y de 5.5 % v/v a las 72 h en *A. potatorum*. Por lo tanto, las características de sustrato y concentración de etanol en cada fermentado imponen una presión de selección sobre las cepas y en función de las capacidades de adaptación de cada una de ellas se puede observar una selección de fenotipos mejorados.

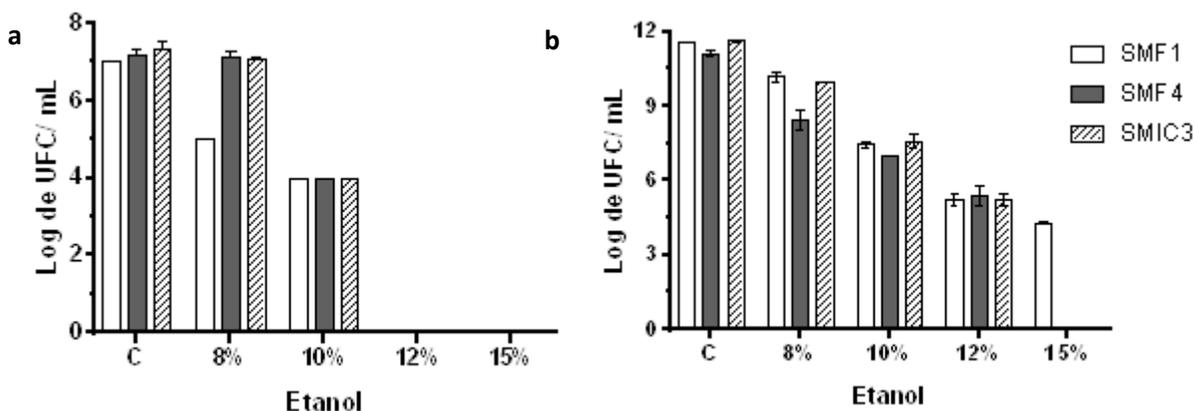


Figura 13. Crecimiento celular de las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 con 8 %,10 %,12 % y 15 % de etanol; a) en medio de cultivo YPDA, pH 5.8 y b) en medio de cultivo YPD, pH 5.8, después de 48 h de incubación. *C hace referencia al grupo control (sin etanol).

4.2 Tolerancia celular por choque Osmótico

En la figura 14, el eje X muestra un grupo control y los diferentes porcentajes de glucosa y el eje Y el log de UFC/mL de las tres cepas con un tiempo de incubación de 48 h. Las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 tuvieron un crecimiento similar entre ellas. Al comparar el grupo control contra las distintas concentraciones de glucosa de las tres cepas, no se detectó diferencias, por lo que, las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 toleran altas concentraciones de este compuesto. Estos resultados son parecidos a los obtenidos en los trabajos de Belloch *et al.*, (2008), donde las levaduras *S. cerevisiae*, fermentadoras de uva pueden tolerar hasta un 40% de glucosa. En la caracterización de los perfiles de azúcares de *A. angustifolia* y *A. potatozum* se encontró 22 g/100ml de sólidos solubles para *A. angustifolia* y 27 g/100mL de sólidos solubles en *A. potatozum*, sin embargo, la concentración de azúcares reductores en los *Agaves* y en *Dasyilirion* depende de la zona geográfica y del modo de cocción (De la Garza *et al.*, 2008; Vera *et al.*, 2009). Dado los resultados en la figura 14, según Folch *et al.*, (2004), menciona que evolutivamente *S. cerevisiae* se ha enfrentado a condiciones de estrés osmótico durante la fermentación, por lo que sobrevive a medios altos y medios pobres de azúcar, por lo que, *S. cerevisiae* posee mecanismos que le permiten percibir, responder y adaptarse a estos cambios, donde las proteínas hidrofóbicas de las membranas mitocondriales, nucleares y vacuolares, retículo endoplásmico, proteínas hidrofílicas citosólicas y la composición de ácidos grasos de la membrana celular lipídica juega un papel importante para defender a la célula de la toxicidad del etanol (You *et al.*, 2003; Fiore *et al.*, 2005).

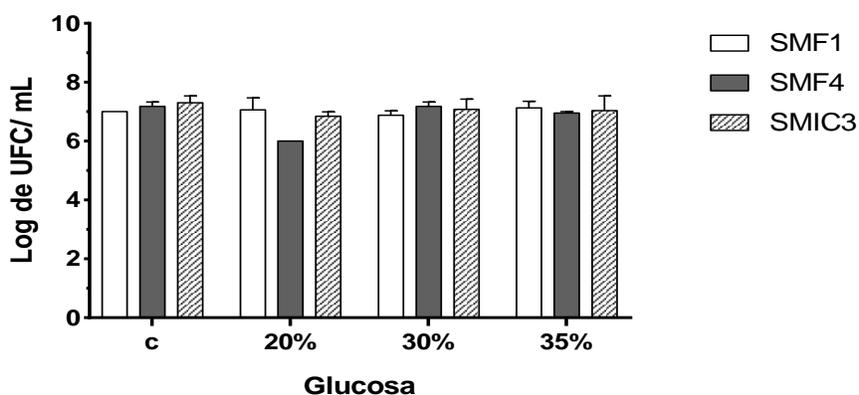


Figura 14. Crecimiento celular de SMF1, SMF4 y SMIC3 con 20 %,30 % y 35 % de glucosa en medio de cultivo YPDA, pH 5.8, después de 48 h de incubación. *C hace referencia al grupo control con 2% de glucosa.

4.3 Tolerancia celular ante pH bajo

En la figura 15 se muestra el comportamiento que tuvieron las tres cepas ante distintos pH. (control con pH 5.8 y los tratamientos con pH 4.0, 3.6 y 3.3). La cepa SMF1 mostró un crecimiento mayor cuando el medio YPDA poseía un pH de 3.6 alcanzando 8.1 Log de UFC/mL y toleró un rango de pH de 5.8 hasta 3.3 manteniendo 7.3 Log de UFC/mL. \pm 0.3 SEM. El crecimiento de la cepa SMF4 se mantuvo en un logaritmo de 7 UFC/mL en todos los tratamientos y cuando se expuso a pH 3.3 presentó 7.7 Log de UFC/mL \pm 0.61 SEM. La cepa SMIC3 también alcanzó mayor crecimiento a un pH de 3.3 con 8.0 Log de UFC/mL. Por lo que se puede decir que las tres cepas toleran un pH de 3.3 en YPDA. En las fermentaciones con mosto de *Agave* se ha observado que el pH es de 5.0 a 3.0 dependiendo de la especie (Vera *et al.*, 2009; Martínez, 2014) mientras que en vino es de hasta 2.7. La acidez afecta la composición de los β -glucanos que componen la pared celular (Gibson *et al.*, 2007). Las cepas haploides de *S. cerevisiae* de cerveza al sufrir un cambio de pH 5.5 a 3.5 en medios mínimos demostraron un aumento en la expresión de 36 genes, incluidos cuatro relacionados con la síntesis y composición de la pared celular (CWP1, HOR7, SPI1, YGP1), en el metabolismo de los carbohidratos (GCY1, GPD1, GPP2 / HOR2, GRE3, HXK1, HXT6, SOL4, TPS1, TSL1), en el metabolismo redox (ALD2, ALD3, MCR1, YER053C, YNL134C) entre otros involucrados en otras condiciones de estrés y genes de proteínas con función desconocidas (Kapteyn *et al.*, 2001). Se ha sugerido que la muerte de la levadura probablemente se debe a la acidificación intracelular como consecuencia de la incapacidad de la célula para liberar protones (Gibson *et al.*, 2007).

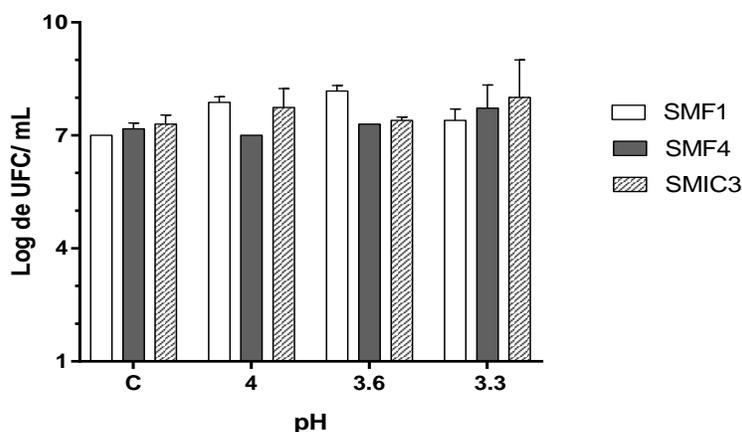


Figura 15. Crecimiento celular de las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 a diferentes pH, después de 48 h de incubación en medio YPDA. *C hace referencia al grupo control con pH 5.8.

4.4 Tolerancia celular por choque térmico e incubación a diferentes temperaturas

El comportamiento de las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 ante un choque térmico a 50 °C, durante diferentes periodos de tiempo, se muestran en la figura 16.

En la figura 16a las cepas SMF1 y SMF4 toleraron el choque térmico, durante 60 min. Sin embargo, al exponerlas durante 120 min la cuenta disminuyó casi cinco ordenes de magnitud, en tanto la cepa SMIC3 al exponerla a 120 min, la formación UFC disminuyó dos órdenes de magnitud. En la figura 16b se utilizó YPD durante los tratamientos de choque térmico, con una concentración celular de 11 log UFC/mL. Los resultados tuvieron un comportamiento similar que en el tratamiento de choque térmico en placa sólida (figura 16a). Las cepas seleccionadas mantuvieron similares logs de UFC/mL hasta 60 min y disminuyeron al exponerlas a 50 °C durante 120 min. El log de UFC/mL fue mayor en YPD que en medio YPDA en todos los casos, a pesar de haberse realizado un ajuste turbidimétrico con una absorbancia de 0.5 UA a 600 nm. Según lo reportado por López, (2016), las células de *S. cerevisiae* tienen un crecimiento optimo entre 25 °C hasta 37 °C. No obstante, a temperaturas alrededor de 41 °C el crecimiento disminuye y a 46 °C se suprime el crecimiento celular. Los resultados muestran que las cepas toleran altas temperaturas, pero no por mucho tiempo, probablemente porque las altas temperatura desnaturalizan las proteínas y desestabilizan la estructura de la membrana, provocando la muerte celular (López, 2016). Se ha reportado que las fermentaciones de mosto de *Agave* frecuentemente se realizan de 30-37 °C. Sin embargo, pueden llegar a temperaturas de 42 °C.

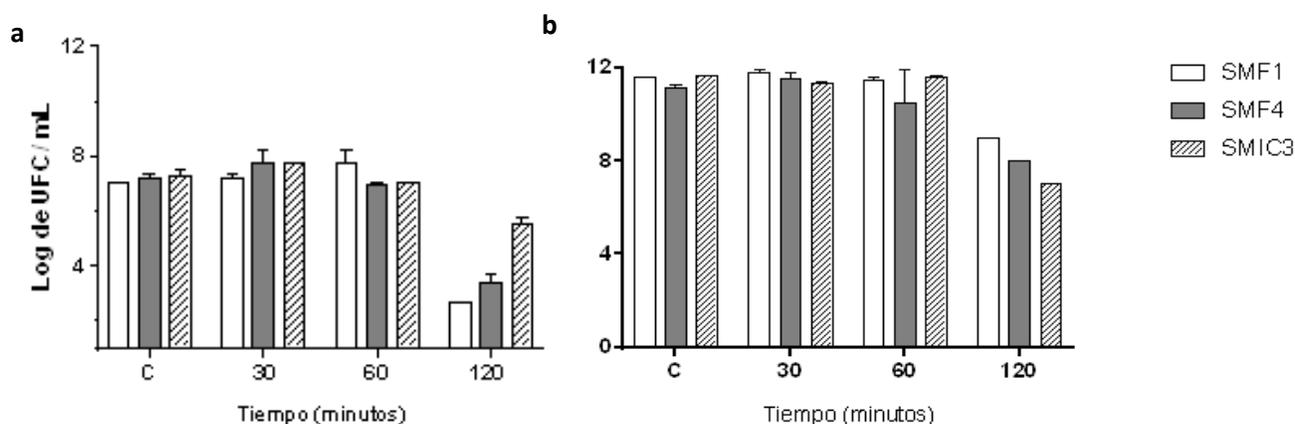


Figura 16. Crecimiento celular de las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 después de 48 h posterior a un choque térmico a 50 °C durante diferentes periodos de tiempo. a) en medio de cultivo YPDA, pH 5.8 y b) en medio de cultivo YPD, pH 5.8.

La tolerancia de las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 incubadas por 48 h a diferentes temperaturas se muestran en la figura 17. En el eje de las X se encuentra el grupo control, y las distintas temperaturas a las que fueron sometidas las cepas y en el eje de Y el Log de UFC/mL. Las cepas SMF1 y SMF4 tuvieron un comportamiento similar al tolerar temperaturas hasta los 40 °C. A diferencia de los tratamientos de choque térmico a 50 °C durante dos horas, donde la cepa SMIC3 fue la que más toleró, tuvo un comportamiento totalmente contrario en los tratamientos de incubación con diferentes temperaturas, conforme la temperatura aumentaba el Log de UFC/mL disminuía. No obstante, cuando las tres cepas se incubaron a 45 °C no se detectó colonias. Estos resultados son parecidos a los reportados por Munna *et al.*, (2015), que al igual que en este trabajo sometieron una cepa de *S. cerevisiae* SUBSC01 a diferentes incubaciones de temperatura, realizaron conteo de UFC, densidad óptica y observaciones en el microscopio óptico. Encontraron que la temperatura óptima de crecimiento para esta cepa es a 32.5 °C, ya que, el número de células aumentaba rápidamente, en aproximadamente 4 logs, mientras que a 30 °C dicha tendencia era un poco más lenta. Al exponerlas a temperaturas de 37 °C y 40 °C notaron un atraso de crecimiento de 90 min. Posiblemente el retraso en el crecimiento en temperaturas más altas a 30 °C se debe, a un tiempo más prolongado que las cepas de *S. cerevisiae* necesitan para hacer frente al estrés celular, causado por temperaturas más altas. Guimaraes *et al.*, (2006), incubaron 16 cepas de *S. cerevisiae* aisladas de fermentaciones de vino a 25 °C, 37 °C y 45 °C en las que solo 2 cepas toleraron los 45 °C. Los efectos del etanol y la temperatura están relacionados y afectan el crecimiento y la viabilidad de las células (Walker y Basso, 2019).

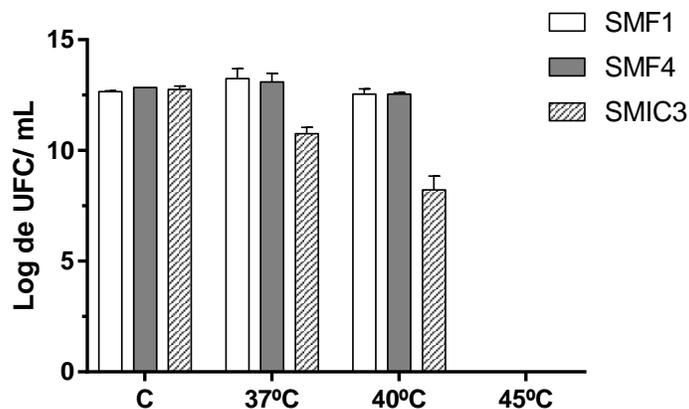


Figura 17. Crecimiento de UFC/mL de las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 incubadas a diferentes temperaturas en medio de cultivo YPD. *C hace referencia al grupo control.

4.5 Tolerancia celular de estrés mixtas

La cepa SMF1 tuvo 2 log de UFC/mL menos que las cepas SMF4 y SMIC3 en el tratamiento 30 % de glucosa, pH 3.2 incubada a 40 °C. Esto se debe a que se ha encontrado que el acoplamiento del estrés por calor, junto con el choque osmótico influyen en la degeneración celular junto con el retraso en la división celular en las levaduras (Muna *et al.*, 2015). Tanto las cepas SMF4 como SMIC3 mantuvieron concentraciones celulares similares en el tratamiento 30 % de glucosa, pH 3.2 incubada a 40 °C que con el grupo control. En el tratamiento con 10 % de etanol, pH 3.2 y 40 °C las tres cepas disminuyeron casi 5 log de UFC/mL. Por lo que las tres cepas toleran altas temperaturas con concentraciones altas de glucosa, pero no toleran las altas temperaturas con altas concentraciones de etanol. Según Vaughan y Martini, (1995), al aumentar la temperatura se disminuye la tolerancia alcohólica de la levadura, en consecuencia, se producen cambios en los fosfolípidos como fosfatidil-etanolamina, fatidil-colina, cardiolipina y fosfatidil-serian que conforman la membrana celular.

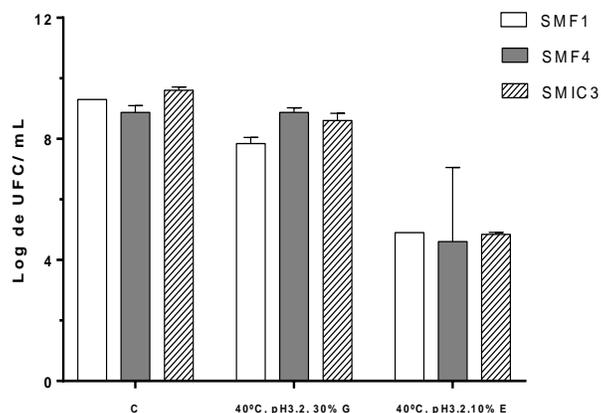


Figura 18. Crecimiento celular de las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 incubadas a diferentes condiciones mixtas en medio de cultivo YPD. *C hace referencia al grupo control (25°C, pH 5.8, 2% de glucosa).

5. Floculación de las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3

En la figura 19. se muestra el porcentaje de floculación de las tres cepas seleccionadas de *S. cerevisiae* de fermentaciones naturales de sotol, realizado por el ensayo de Helm.

La cepa SMF1 y la SMF4 fueron catalogadas según el ensayo, como cepas no floculantes, en tanto, la cepa SMIC3 se catalogó como cepa moderadamente floculante. Las condiciones del medio pueden promover señalizaciones que resulten en la formación de flóculos. Sin embargo, el ensayo de Helm se caracteriza por ser una prueba rápida, que nos muestra el porcentaje de floculación de las levaduras, independientemente de las condiciones del medio externo. En los estudios de Lacerda *et al.*, (2013), realizaron pruebas para clasificar 66 levaduras por su capacidad de floculación mediante el ensayo de Helm, catalogando 18 cepas como no floculantes, por lo que, es una prueba eficaz en estudios con un gran número de cepas.

Si bien en la figura 19 las diferencias de porcentaje son mínimas, las cepas que tienden a flocular repercuten en pérdidas en las fermentaciones a escala. En la industria de bioetanol puede obstruir las tuberías y reducir el contacto célula-sustrato (Lacerda *et al.*, 2013). En contraste, para la industria cervecera, las levaduras floculantes son consideradas como poseedoras de una característica importante y benéfica (Campos *et al.*, 2010; Schwan *et al.*, 2001; Stewart y Russell, 1981).

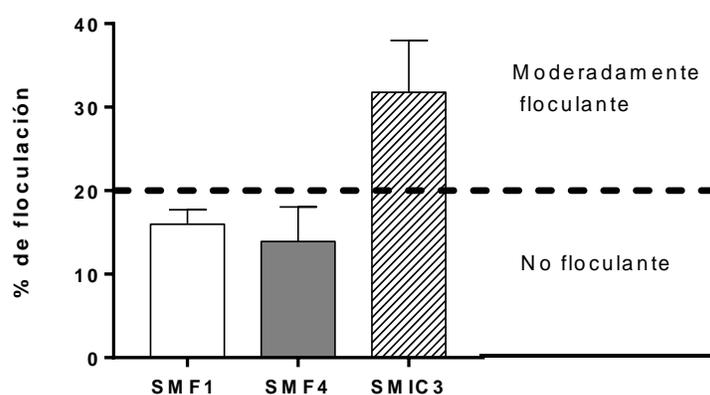


Figura 19. Porcentaje de la capacidad floculativa de cepas de *S. cerevisiae* usando el método de Helm, el cual menciona que menos del 20 % se considera a las cepas como no floculantes.

En estudios elaborados por Guimaraes *et al.*, (2006), encontraron que sólo una cepa de 16 analizadas de *S. cerevisiae* presentó floculación. Según Ceballos *et al.*, (2009), analizaron 121 muestras de tequila y 9 muestras de mezcal y encontraron que la concentración de calcio en promedio es de 1.36 mg / L, un compuesto que puede activar la cascada de señalización para flocular. Según Dengis *et al.*, (1995), encontraron que algunas cepas de *S. cerevisiae* aisladas de cerveza comienzan a flocular cuando se les adiciona 0.1 mM de CaCl₂ hasta el tercer día de crecimiento en 10 mM de amortiguador de acetato mientras que otras flocularon sin necesidad de la adición de CaCl₂. Por lo que las características de la cepa contribuyen al proceso de floculación. (Taylor y Orton, 1978; Miki *et al.*, 1980, 1982).

6. Fermentaciones

Al realizar las fermentaciones del mosto de sotol se hizo un ajuste a 10 °Brix. No obstante, durante el análisis de azúcares en el HPLC se encontró que la fructosa constituía 4.04 g/100mL, SD ± 0.16 y la glucosa 0.7 g/100mL SD ± 0.078 esto se debe a que los °Brix (g de sólidos solubles/100mL) incluye otros carbohidratos y minerales. En la figura 20, se muestra el log de UFC/mL de la cepa SMF1 durante las fermentaciones de mosto de sotol y medio semisintético, el cual se mantiene entre 6 y 8 log de UFC. El pH inicial del mosto de sotol fue de 4.5 y disminuyó al final de la fermentación a 3.5. En el caso de la fermentación semisintética tuvo un pH de 4.5 y terminó con 3.0.

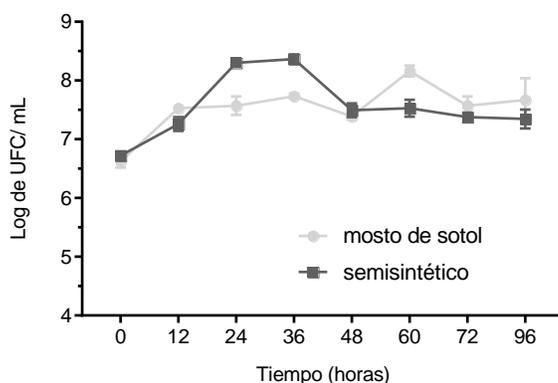


Figura 20. Crecimiento celular de *S. cerevisiae*,(cepa SMF1) en mosto de sotol y medio semisintético.

En la figura 21 se muestra la fermentación de la cepa SMF1 en mosto de sotol (N) y medio M11 (S). En la fermentación del mosto del sotol, la glucosa se consumió a las 72 h y la fructosa se consumió a las 96 h, la presencia de etanol se detectó a las 12 h. Por lo que, existe un consumo simultáneo de fructosa y glucosa en el mosto sotol. En la fermentación del medio M11 solo se elaboró con fructosa como única fuente de carbohidrato y aunque se añadió extracto de levadura, durante el análisis de HPLC no se detectó otro azúcar asimilable por *S. cerevisiae*. La concentración de fructosa en el medio M11 constituía un 9.5 % del volumen, al igual que en la fermentación del mosto de sotol la fructosa se consumió a las 96 h y el etanol se detectó a partir de las 12 h.

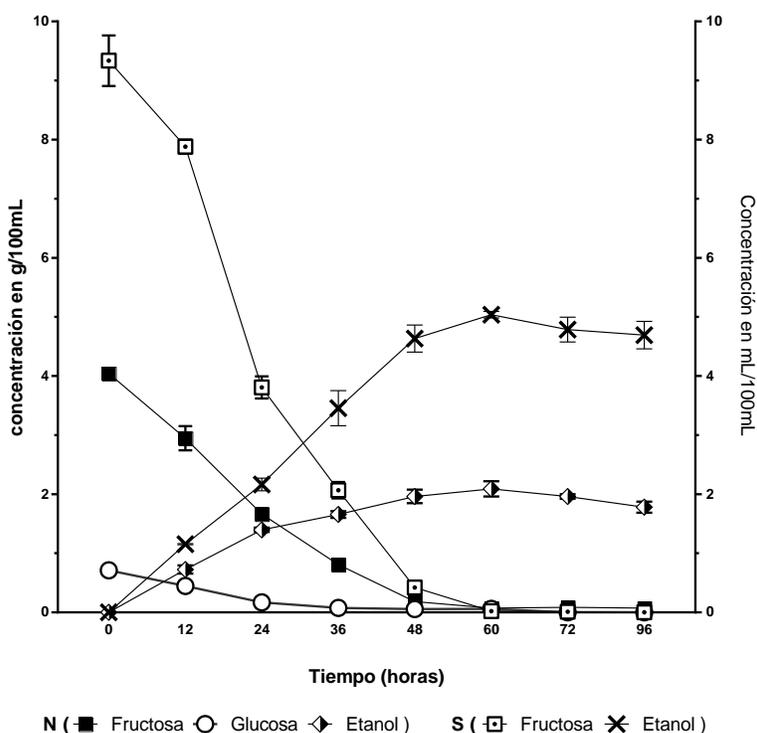


Figura 21. Curvas de consumo de carbohidratos, formación de etanol en mosto de sotol (N) y medio M11(S) de *S. cerevisiae*, cepa SMF1.

En la figura 22 se muestra el log de UFC/mL de la cepa SMF4 durante las fermentaciones de mosto de sotol y medio semisintético, el cual inicia con 6.9 log de UFC/mL y 6.2 log de UFC/mL incrementan hasta un 8 log de UFC y al final de la fermentación decrece en ambos sustratos. El mosto de sotol tuvo un pH de 4.5 inicial y 3.5 al final de la

fermentación, mientras que la fermentación semisintética tuvo un pH de 4.5 inicial y terminó con 3.0.

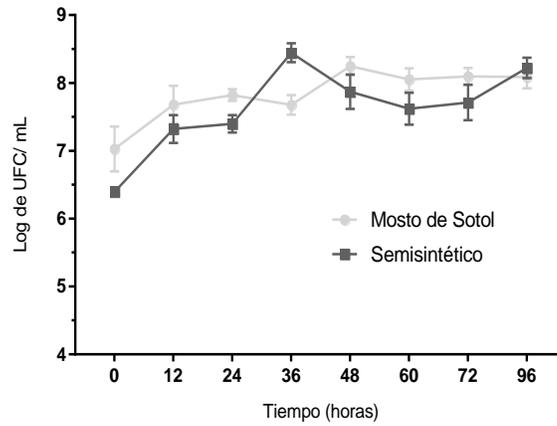


Figura 22. Crecimiento celular de *S. cerevisiae*, cepa SMF4 en dos medios de fermentación; mosto de sotol y medio semisintético.

En la figura 23 se muestra el consumo de los carbohidratos; glucosa y fructosa de la fermentación de mosto de sotol, así como la producción de etanol y la cinética del consumo de fructosa y la producción de etanol del medio M11 por parte de la cepa SMF4.

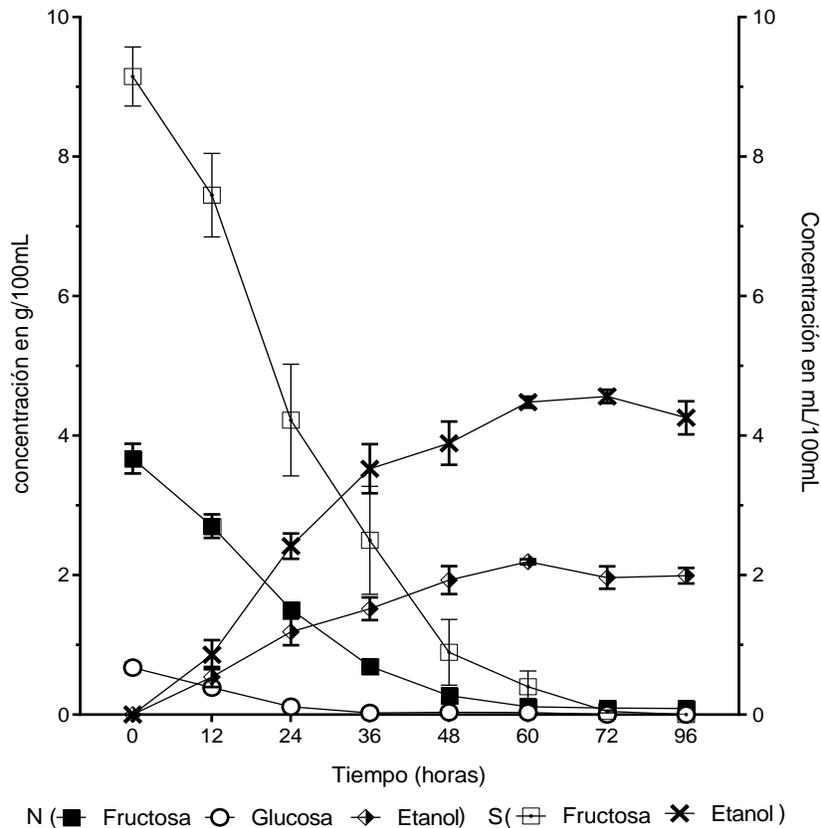


Figura 23. Curvas de consumo de carbohidratos y formación de etanol en mosto de sotol (N) y medio M11(S) de *S. cerevisiae*, cepa SMF4.

La fermentación, al igual que en el caso de la cepa SMF1, terminó a las 96 h, con un consumo simultáneo de la glucosa que se terminó a las 72 h y de la fructosa que se consumió a las 96 h, mientras que la presencia de etanol se detectó transcurridas 12 h.

En la figura 24 se muestra la cinética del crecimiento de la cepa SMIC3 representada en log UFC/mL. Se puede observar que la cepa tardó en adaptarse al mosto de sotol. Sin embargo, a las 36h su crecimiento 7 log UFC/mL, similar a la concentración celular en el medio semisintético. Al contrario de lo que ocurrió en el medio semisintético, la concentración celular se mantuvo constante y disminuyendo con el paso del tiempo. El pH inicial en la fermentación natural fue de 4.5 y 3.5 al final del proceso, en tanto el pH inicial de la fermentación semisintética fue pH de 4.5 y 3.0 al término del proceso. Estos, mismos resultados se obtuvieron en las fermentaciones con SMF1 y SMF4, donde el pH inicial del medio M11 al igual que en el mosto de sotol fue de 4.5 pero al final de la fermentación independiente de la cepa utilizada el medio M11 fue más ácido con un pH

de 3.0, por lo que la diferencia está relacionada por la composición de cada medio utilizado. De acuerdo con las fermentaciones de sotol realizadas por García, (2010), registró un pH de 4.0 al inicio y al quinto día hasta el final tuvo un pH de 3.0. Sin embargo, el mosto fue fermentado por diversos microorganismos en los que probablemente hay mayor producción y diversidad de compuestos ácidos sintetizados por cepas *no-Saccharomyces* y bacterias.

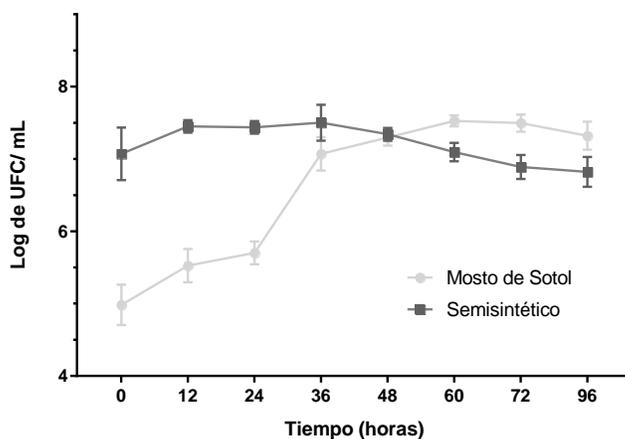


Figura 24. Crecimiento celular de *S. cerevisiae*, cepa SMIC3 en dos medios de fermentación; mosto de sotol y medio semisintético.

En la figura 25 se observa la cinética de consumo de glucosa y fructosa, así como la producción de etanol de las fermentaciones del mosto de sotol y del medio M11 llevada a cabo por la cepa SMIC3. La fermentación del mosto de sotol se monitoreó hasta las 96h cuando se llegó a 5 °Brix. Se tomó las 96 h como tiempo final para realizar los cálculos de rendimiento de etanol, para este tiempo la glucosa se había consumido por completo, pero no fue el caso para la fructosa. Durante la fermentación de mosto de sotol se observaron flóculos a partir de las 72 h, aumentado de tamaño a las 96 h a diferencia de las cepas SMF1 y SMF4 en las cuales no se formaron cúmulos. Durante la fermentación del medio M11 la fructosa tampoco se consumió por completo y también se observó la formación de flóculos transcurridas las 72 h.

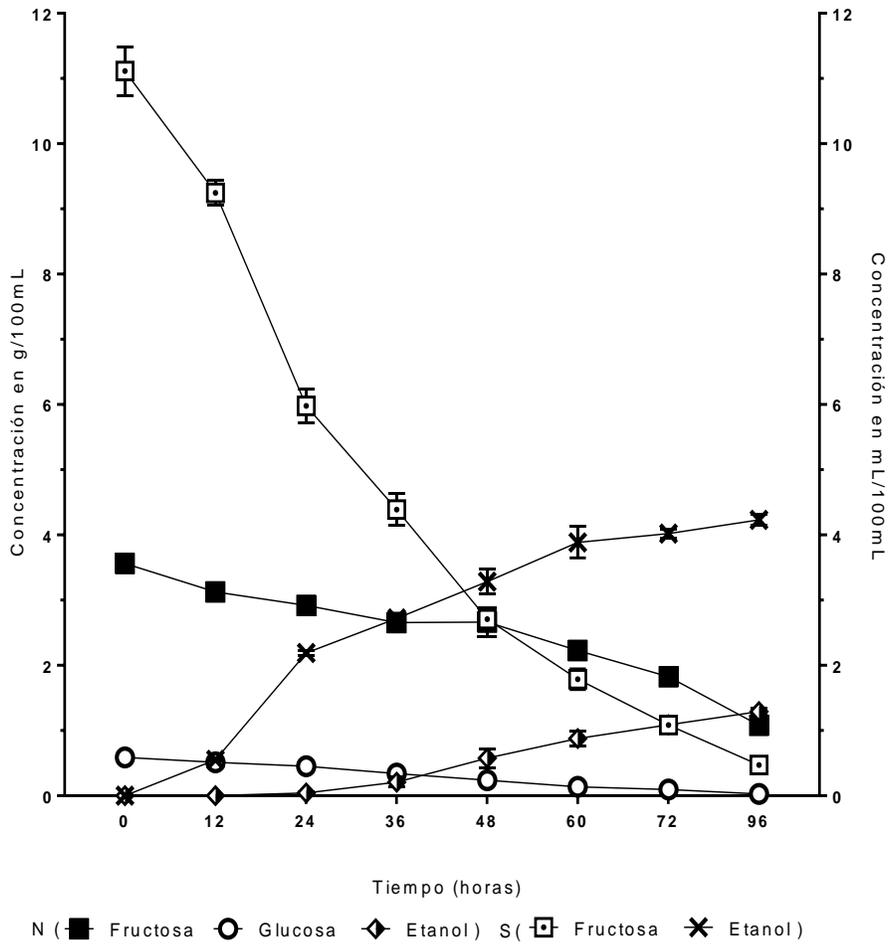


Figura 25. Curvas de consumo de carbohidratos y formación de etanol en mosto de sotol (N) y medio M11(S) de *S. cerevisiae*, cepa SMIC3.

7. Rendimiento de etanol

Tabla 5. Consumo de carbohidratos, rendimiento de etanol, productividad y producción de glicerol y ácido acético con su desviación estándar de cepas de *S. cerevisiae* (*SMF1*, *SMF4* y *SMIC3*), de fermentaciones de mosto de sotol y medio semisintético.

Fermentación de mosto de sotol	<i>SMF1</i>	<i>SMF4</i>	<i>SMIC3</i>
Consumo de Fructosa (%)	98.1 ± 0.04	97.63 ± 0.54	69.66 ± 2.9
[Fructosa] a las 96h (mg/mL)	0.072 ± 0.003	0.086 ± 0.013	1.079 ± 0.047
Consumo de Glucosa (%)	100	99 ± 0.03	96.2 ± 0.62
[Glucosa] a las 96h (mg/mL)	ND	ND	0.028 ± 0.007
Rendimiento de Etanol con respecto al sustrato (g/g)	0.39 ± 0.034	0.43 ± 0.06	0.35 ± 0.069
Productividad (g/L*h)	0.055 ± 0.004	0.06 ± 0.005	0.033 ± 0.006
Rendimiento de Etanol (%)	77.3 ± 6.81	84.5 ± 11.79	70.5 ± 13.54
Producción de mL/100mL de etanol	1.78 ± 0.163	1.99 ± 0.19	1.087 ± 0.208
Producción de glicerol mg/100mL	0.144 ± 0.008	0.13 ± 0.009	0.095 ± 0.015

Producción de Ác. Acético mL/100mL	ND	ND	ND
Fermentación de Medio M11			
	SMF1	SMF4	SMIC3
% Consumo de Fructosa	100	99.98 ± 0.03	98.34 ± 0.62
[Fructosa mg/mL] a las 96h	ND	0.001 ± 0.003	0.47 ± 0.15
Rendimiento de Etanol con respecto al sustrato (g/g)	*0.47 ± 0.034	0.42 ± 0.026	**0.39 ± 0.016
Productividad (g/L*h)	0.14 ± 0.014	0.12 ± 0.009	0.10 ± 0.003
% Rendimiento de Etanol	93.07 ± 6.67	84.27 ± 5.12	78.13 ± 3.15
Producción de mL/100mL de etanol	4.69 ± 0.402	4.25 ± 0.411	4.23 ± 0.155
Producción de glicerol mg/100mL	0.23 ± 0.023	0.227 ± 0.026	0.227 ± 0.013
Producción de Ác. Acético mL/100mL	0.016 ± 0.005	0.049 ± 0.055	0.009 ± 0.002

*Resultados significativos, ND: no detectado por HPLC.

La cepa que tuvo mayor porcentaje de consumo de fructosa y glucosa en el mosto natural de sotol fue la cepa SMF1. La cepa SMF4 presentó mayor rendimiento con respecto al sustrato y productividad. Aunque en la cepa SMF1 se consumió mayor cantidad de fructosa y glucosa se sabe que la conversión total de carbohidratos a etanol nunca se puede lograr por completo, porque parte de la glucosa/fructosa disponible se convierte en

nuevas células de levadura, carbohidratos de almacenamiento y metabolitos, además de que en la fase postdiáuxica las células usan como fuente de carbono el etanol producido durante la fase logarítmica (Folch *et al.*, 2004; Walker y Walker, 2018). De acuerdo con la prueba Kruskal-Wallis no existen diferencias significativas entre las cepas. Sin embargo, se ha reportado que en escalamientos de bioproceso estas pequeñas diferencias pueden producir ganancias económicas.

En el medio M11 se observó que la cepa SMF1 tiene mayor porcentaje de consumo de fructosa, mayores rendimientos de etanol con respecto al sustrato $0.47 \text{ g/g} \pm 0.034$ y productividad. Este rendimiento (p/s) es similar a lo encontrado por Delgado *et al.*, (2013), en la que una cepa de *S. cerevisiae* extraída de fermentaciones naturales del mezcal al fermentar *A. tequilana* para la producción de tequila obtuvo un (rendimiento p/s) $0.46 \text{ g/g} \pm 0.013$.

De acuerdo con la prueba estadística no hay diferencias significativas en el rendimiento con respecto al sustrato entre las cepas SMF1, SMF4, SMIC3, pero si se encontraron diferencias significativas entre las cepas SMF1 y SMIC3 con respecto al medio fermentable. El consumo de fructosa, así como la producción de etanol, aumentaron considerablemente en el medio semisintético.

Particularmente en el caso de la cepa SMIC3 dado a los resultados del ensayo de Helms donde se catalogó como moderadamente floculante podría ser la causa de un menor rendimiento de etanol en las fermentaciones en sotol y M11, debido a las agregaciones de las levaduras que impiden un contacto directo con el sustrato, esto coincide con lo mencionado por Basso *et al.*, (2008), que al evaluar las fermentaciones de 350 cepas autóctonas de *S. cerevisiae*, el 33 % eran floculantes.

Dentro de los factores que pudieran afectar a la cepa SMIC3 es la falta de adaptación a sustratos con insuficiencia o alto porcentaje de elementos básicos para su metabolismo. Según Ceballos *et al.*, (2009), los elementos más abundantes en los mostos de fermentación de tequila y mezcal son el sodio, potasio, calcio y azufre. En concentraciones menores se encuentra en promedio 0.34 mg/L de magnesio, 0.44 mg/L de cobre, 0.1 mg/L de hierro y 0.1 mg/L de zinc y 0.05 mg/L de Aluminio. Donde altas concentraciones de calcio inducen la floculación de las levaduras y bajas concentraciones de metales como magnesio, hierro o zinc perjudican el funcionamiento de las levaduras.

Durante la división celular y la supervivencia de las levaduras, se produce etanol, glicerol, acetaldehído y ácido acético (Henschke y Jiranek, 1993; Verstrepen *et al.*, 2004).

La cepa con mayor producción de glicerol tanto en fermentación natural como sintética fue SMF1. La concentración al final de la fermentación con mosto natural fue con $0.14 \text{ mg/100mL} \pm 0.008$ y en la fermentación con medio M11 fue de $0.23 \text{ mg/100mL} \pm 0.023$. El glicerol es un subproducto importante durante la fermentación alcohólica de la levadura *S. cerevisiae*. Se produce para mantener el equilibrio redox, es decir, sirve para reoxidar el exceso de NADH formado en la síntesis de biomasa y productos de fermentación secundaria, a NAD (Bideaux *et al.*, 2006). Esto le permite a la célula compensar la pérdida de agua como respuesta al estrés osmótico, aunque el glicerol puede considerarse como un atributo en ciertas bebidas como la cerveza y el vino, su producción puede disminuir el rendimiento del alcohol (Walker y Walker, 2018). De acuerdo con Erasmus *et al.*, (2004) la concentración promedio de glicerol en vinos es de 7 g/L.

Remize *et al.*, (1999) menciona que el aumento de glicerol no está correlacionado al aumento de ácido acético, por tanto, las cepas que experimentan la misma presión osmótica responden produciendo diferentes concentraciones de glicerol y ácido acético.

El ácido acético en las fermentaciones naturales con mosto de sotol no fue detectado por medio de HPLC, mientras que, en la fermentación semisintética, la cepa SMF4 presentó una producción con $0.049 \text{ mL/100mL} \pm 0.055$, la cepa SMF1 con $0.016 \text{ mL/100mL} \pm 0.005$ y SMIC3 0.009 ± 0.002 . Las levaduras producen ácido acético mediante la oxidación de acetaldehído a acetato por aldehído deshidrogenasas dependientes de NAD⁺ (Remize *et al.*, 2000). Por tanto, la elección de cepas que producen bajas concentraciones de ácido acético es crucial para la producción eficiente de etanol, ya que la capacidad de formar ácido acético durante una fermentación depende de la levadura (Delfini y Cervelli, 1991). Es prudente seleccionar cepas que produzcan la menor cantidad posible de ácido acético, ya que las condiciones prácticas de fermentación y la composición del mosto varían entre bodegas. Este compuesto es el responsable de la de la disminución de pH con el paso del tiempo en la fermentación.

En fermentaciones de *A. angustifolia* y *A. potatorum* con $544 \text{ mg/g} \pm 1.14$ y $290.4 \text{ mg/g} \pm 57.50$ produjeron $383 \text{ mg/L} \pm 11.71$ y $284 \text{ mg/L} \pm 13.42$ de ácido acético, respectivamente (Vera *et al.*, 2009) que a comparado con la producción de las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 es mucho mayor.

Dado los resultados de las fermentaciones con mosto de sotol como medio M11 las cepas SMF1 y SMF4 pueden ser consideradas para producir sotol, debido a su eficiencia para consumir los azúcares reductores y productividad y la cepa SMIC3 por su lenta fermentación, la formación de flóculos y la producción de ácido acético no es tan recomendable en producciones de sotol.

8. Identificación de compuestos congénicos mediante MEFS-CG-Masas

En la tabla 6, se muestran 65 compuestos volátiles identificados, por medio de MEFS-CG-Masas empleando una fibra de CAR/PDMS, de los cuales se encontraron 19 compuestos catalogados como alcoholes, 9 ácidos, 14 ésteres, 4 aldehídos, 1 cetona, 3 terpenos, 4 bencenos, 4 furanos y 7 compuestos de hidrocarburos. Estos compuestos se producen en el metabolismo secundario de *S. cerevisiae*, en el que se ha registrado la producción de alcoholes de fusel, ésteres, carbonilos, compuestos de azufre, tioles y terpenoides (Styger *et al.*, 2011). El metabolismo secundario está muy influenciado por el carbono fermentable, la composición de nitrógeno y el ambiente de fermentación (Henschke y Jiranek, 1993; Verstrepen *et al.*, 2004).

Tabla 6. Compuestos volátiles detectados por medio de la microextracción en fase sólida producidos por las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 de *S. cerevisiae* en fermentaciones de mosto de sotol y medio semisintético.

TR	Compuesto		Mosto			M11		
	Alcoholes	Características generales y organolépticas	SMF1	SMF4	SMIC3	SMF1	SMF4	SMIC3
2.5	Etanol	Alcohol	59.3% ± 4.36	72.3 % ±2.64	81.3%±7.18	74.36%±0.83	49.7%±12.61	83.3%±1.63
8.2	3-Metil butanol	Dulce frutal (1,2)	6.3% ±0.35	3.3% ±0.02	5.9%±0.31	1.1% ±0.17	3.4% ±0.4	1.5%±0.21
17.18	2-Etil, 4-metil pentanol	Antimicrobiano (3a)	-	0.01%±0.0005	-	-	-	-
17.10	4-Metil, 2-propil pentanol		0.04%±0.0005	-	-	0.04%±5E-06	-	-
12.1	1-Hexanol	Olor floral, pasto verde, tostado (1)	0.07%±0.013	-	0.06%±0.001	-	-	-
14.85	Alcohol isoheptílico	olor agradable (3b)	-	0.02%±0.0002	-	-	-	-
15.7	2-Etil hexanol	Olor terroso, floral (2); Rosa dulce (4)	0.1%±0.01	-	0.03%±2E-04	-	0.03%±0.02	0.02%±0.003
21.16	3-Mercaptohexanol	Metabolito reportado en <i>S. cerevisiae</i> (3c), olor desagradable (5)	-	-	0.01%±0.002	-	-	-
22.1	3-Metil-4-pentanol		-	-	0.009%±7E-04	-	-	-
22.0	3-Etil-2,4-pentadien-1-ol		-	0.03%±0.001	-	0.49%±0.07	0.2%±0.127	0.31%±0.0477
18.8	5-(2-Metilideneciclopropil) pentan-1-ol		-	0.01%±0.0007	-	-	-	-
26.3	Alcohol isoocilico		-	-	0.01%5E-04	-	-	-

14.8	1-Heptanol	Olor leñoso, aceitoso y un sabor picante (2)	0.1%±0.01	-	0.03%±0.001	-	-	-
17.37	1-Octanol	Olor fresco a naranja y rosa ligeramente herbáceo (2)	0.04%±0.001	0.02%±0.001	0.03%±0.004	-	-	0.01%±0.0001
13.2	(E)2- Octen-1-ol	Olor desagradable (2)	0.05%±0.0032	-	-	-	-	-
30.3	1-Octino-3-ol	Olor a seta, tierra (1)	-	0.04%±0.0008	0.009%±3E-04	-	-	-
22.08	1-Nonanol		0.04%±0.004	0.03%±0.001	0.03%±0.001	-	-	-
13.1	2-None-1ol		-	-	-	-	0.18%±0.1	-
26.1	1,2,3,4,5-Ciclopentanepentol		-	-	0.02%±3E-04	-	-	0.02%±6E-05

Ácidos

14.9	Ácido acético	Vinagre (1)	0.03%±0.0007	0.05%±0.002	0.02%±3E-05	0.5%±0.01	0.49%±0.28	0.18%±0.033
17.76	Ácido isobutírico	Olor a mantequilla rancia (1)	0.01%±0.0008	0.03%±0.002	-	0.01%±0.0002	0.02%±0.0024	-
23.9	Ácido caproico	Olor a levadura, sidra, queso, pasto o fruta (1)	0.38%±0.002	0.42%±0.01	0.23%±0.006	0.82%±0.0281	1.80%±0.01	0.67%±0.0017
20.1	Ácido 2-metilhexanoico		0.02%±0.002	0.03%±0.001	-	-	-	0.02%±0.003
28.3	Ácido caprílico	Ácido graso, con olor a sudor o queso (1) agente antimicrobiano, te de manzanilla (6)	1.57%±0.06	1.88%±0.0188	0.63%±0.053	9.21%±0.493	17.07%±1.80	7.81%±0.17
33.2	Ácido nonenoico	Olor seco a madera (1)	0.03%±0.013	-	-	-	-	-
32.1	Ácido cáprico	Olor seco a madera (1)	1.03%±0.65	-	-	3.8%±0.39	7.79%±0.68	2.13%±0.26
33.27	9-Metildecanoico		-	0.05%±0.01	0.03%±0.008	0.36%±0.0183	2.37%±0.2	0.53%±0.02
35.8	Ácido undecanoico	Olor desagradable, antifúngico	0.11%±0.0008	0.07%±0.002	0.022%±0.003	0.28%±0.02	0.52%±0.03	0.07%±4E-06

Ésteres

2.3	Acetato de etilo	Solvente, con olor dulce (4)	0.07%±0.004	0.05%±0.002	0.03%±0.008	0.09%±0.0016	0.67%±0.03	0.09%±0.01
8.9	3-Metilpentanoato de etilo		0.85%±0.04	-	0.355%±0.03	-	-	-
24.1	Decanoato de isoamilo	Olor dulce, canela, madera (1)	0.33%±0.001	0.38%±0.03	0.043%±0.005	0.03%±0.006	0.07%±0.0034	0.03%±0.0008
8.9	Ácido hexanoico éster etílico		-	-	-	-	-	0.35%±0.002
11.6	Heptanoato de etilo	Olor a manzana	0.06%±0.003	-	-	-	-	-
15.6	Ácido 3-heptenoico éster etílico		0.03%±0.009	0.03%±0.0006	-	-	-	-
20.4	6-Ácido heptanoico éster etílico		1.15%±0.08	0.6%±0.02	0.1%±0.009	0.2%±0.01	3.74%±0.34	0.31%±0.03
14.3	Octanoato de etilo	Aroma frutal.	3.9%±0.31	3.42%±0.19	0.64%±0.14	1.96%±0.15	-	1.41%±0.2237
19.6	3-Metilbutil octanoato		0.39%±0.0455	0.19%±0.0181	0.06%±0.01	-	-	-
27.9	Decanoato de metilo		-	-	-	-	0.08%±0.0058	-
19.2	Decanoato de etilo		6.17%±0.5213	2.79%±0.32	0.28%±0.05	1.3%±0.003	3.01%±0.35	0.47%±0.04
31.74	Ácido ciclohexanoacético, alfa etil éster metílico		0.17%±0.002	0.03%±0.004	-	0.03%±0.004	0.02%±0.005	0.054%±0.005
19.5	Tiocianato de bencilo	Metabolito de las Brassicas (3d)	-	-	0.2%±0.053	0.11%±0.0007	-	-
19.6	Fenilbutirato		-	-	-	-	0.07%±0.003	-

Aldehídos

35.6	2-Nonenal	Notas cítricas (2)	0.03%±0.002	0.02%±0.001	-	-	-	-
15.9	Decanal	Antifúngico aromático (3e)	-	-	0.015%±0.001	-	0.057%±0.006	0.01%±0.0009

19.89	7-Metoxi-3,7-dimetiloctanal		-	0.06%±0.002	-	-	-	-
918.8	2-Metilundecanal		-	-	-	-	-	0.007%±0.002
Cetonas								
23.32	Metil bencil cetona	Olor acre agradable (3f)	0.14%±0.007	0.08%±0.0021	0.16%±0.009	0.11%±0.007	0.31%±0.028	0.25%±0.0027
Terpenos								
21.44	Carvona	Olor a menta, (antifúngico) (3g)	-	0.009%±0.001	-	0.007%±0.0002	0.03%±0.0006	0.003%±0.0004
20.6	Mircenol	Metabolito vegetal	0.05%±0.002	0.05%±0.0009	0.04%±9E-04	-	-	0.01%±0.003
16.4	Sabinene	Aceites esenciales de varias especies de plantas.	0.05%±0.0056	0.03%±0.0016	0.03%±9E-04	-	-	-
Bencenos								
25.3	Metilbenceno	Picante, tóxico	15.01%±0.69	10.7%±0.11	8.16%±0.34	4.4%±0.06	7.3%±0.02	0.009%±0.0006
27.33	Fenol	Olor afrutado, vino (3)	0.02%±0.0008	0.01%±4.9E-05	0.02%±0.002	-	0.07%±0.0005	0.004%±0.0007
30.9	Alcohol 2-nitrobencílico		1.6%±0.017	2.37%±0.012	0.8%±0.032	0.014%±0.0002	0.31%±0.053	0.09%±0.011
23.21	1,4-Fenilendimetanol		-	0.012%±0.00022	0.018%±0.003	0.037%±0.0009	-	0.024%±0.001
Furanos y furfurales								
19.9	2-Furametanol	olor a "quemado", sabor a azúcar cocida (2)	0.06%±0.0009	-	0.06%±0.001	-	-	-
17.8	2-Metilfurano	olor a chocolate (2)	-	-	-	0.27%±0.0031	0.12%±0.0007	0.067%±0.0001
27.65	5-Pentil-3H-furano-2-ona	olor dulce y herbáceo a tabaco (2)	0.35%±0.0017	0.4%±0.015	0.24%±0.006	0.015%±0.0002	-	-
27.64	5-Metiltetrahidro-2-furanil) metanol		-	-	-	-	0.01%±0.0014	0.014%±0.005

Hidrocarburos

21.08	3,3,5-Trimetil-1-hexano	-	-	-	-	0.072%±0.001	-
21.8	1-Dimetil-2-octilciclobutano	-	0.021%±0.004	-	-	-	-
18.1	1,1-Dimetil-2- (2-metil-1-propenil) ciclopropano	-	-	0.02%±3E-04	0.03%±0.0011	-	-
19.5	Cicloheptatrieno	-	0.1%±0.006	-	-	-	-
17.8	1-ciclohexenometanol	0.013%±0.002	0.023%±0.00084	0.011%±4E-04	-	-	-
17.4	3-oxabicyclo [3.2.0] hept-6-eno-2,4-diona	-	-	-	0.082%±0.002	0.1%±0.0017	0.03%±0.0003
34.38	1,6-heptadien-3-yne	-	-	0.15%±0.007	0.048%±0.004	0.045%±0.01	0.021%±0.004

1. (Molina et al., 2007)
2. (Vázquez P. y Rodríguez M. 2012).
3. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database a, b, c, d, e, f, g; 2019.
4. Zhu et al., 2015
5. Ferreira 2002
6. Callejón et al., 2008

En la figura 26 se muestran los porcentajes de las áreas cromatográficas por familia de volátiles de cada fermentación. Se observaron porcentajes más altos en la familia de alcoholes en comparación con otras familias de compuestos.

Entre los diferentes medios existe mayor concentración porcentual en las fermentaciones semisintéticas que en las fermentaciones de mosto de sotol. Por otra parte, la concentración de compuestos perjudiciales para el crecimiento de las levaduras *S. cerevisiae* y para consumo humano presentes en las bebidas alcohólicas como bencenos y furanos es mayor en las fermentaciones naturales.

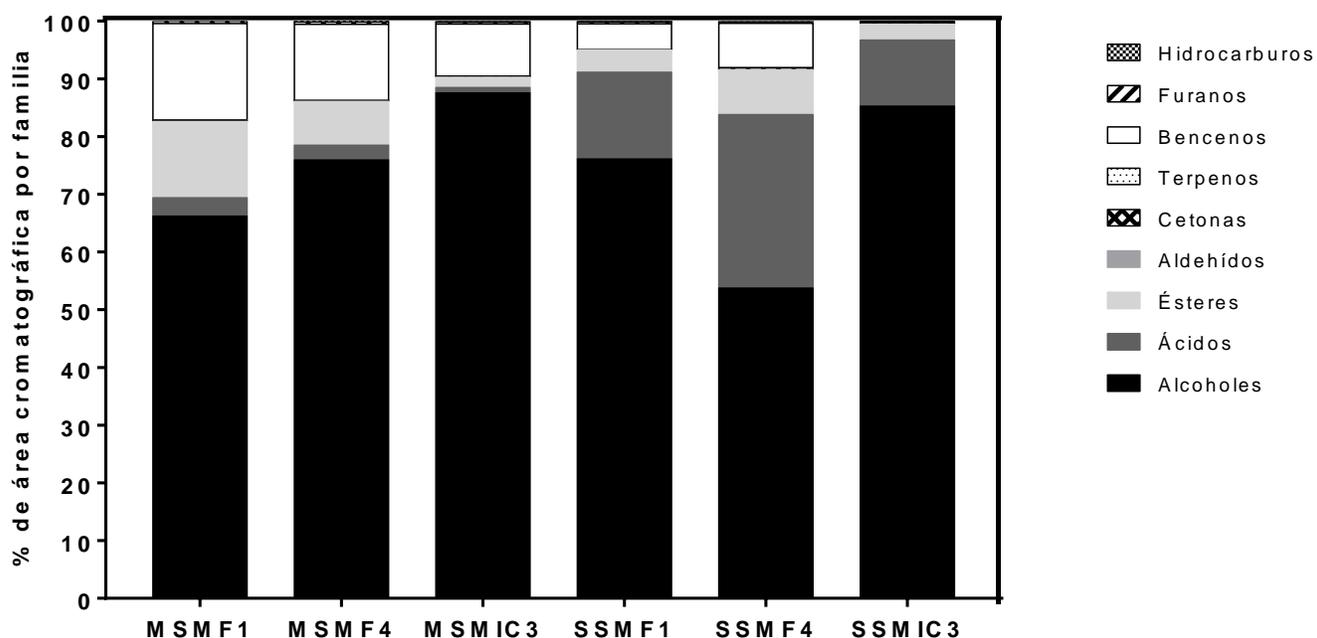


Figura 26. Distribución de los porcentajes de áreas cromatográficas de las familias de compuestos volátiles producidos por las cepas de *S. cerevisiae* de fermentaciones de mosto de sotol representadas con las claves MSMF1, MSMF4 y MSMIC3 y medio semisintético, representadas con las claves SSMF1, SSMF4 y SSMIC3 detectados por medio de la microextracción en fase sólida

8.1 Identificación de alcoholes superiores

Varios de los alcoholes reportados en este trabajo se han registrado en otras bebidas, tal es el caso del isobutanol, 3-metil butanol, 1-hexanol, 1-octanol y 1-nonanol entre otros que han sido observados en tequila y mezcal. Según Verstrepén *et al.*, (2004), estos compuestos caracterizan a las bebidas alcohólicas

Los alcoholes superiores, se generan en altas concentraciones respecto a otros compuestos volátiles y producen un impacto en el aroma y el sabor de las bebidas alcohólicas, usualmente se producen en la fase lag de la fermentación a partir de la síntesis o la degradación de aminoácidos (utilizando piruvato y acetil-CoA en el primer

caso o después de la asimilación de la fuente de nitrógeno en el segundo) (Loviso y Libkind, 2019).

En la figura 27 se muestra los alcoholes superiores de las diferentes fermentaciones. Las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 que fermentaron mosto natural de sotol presentaron más tipos de alcoholes en comparación con las fermentaciones con medio semisintético, esto puede deberse a la fuente de nitrógeno, ya que según la vía de Erlich la fuente de nitrógeno en forma de aminoácidos da lugar a una gama de los alcoholes superiores (Dzialo *et al.*, 2017). Se ha demostrado que alcoholes superiores como isobutanol, alcohol isoamílico, alcohol amílico y feniletanol, se puede formar a través de esta vía. La formación de los alcoholes superiores mantiene la relación NADH/NAD⁺ y, por lo tanto, el balance redox dentro de la célula, remueve los aldehídos tóxicos y puede ser fuente alternativa para obtener nitrógeno (Dzialo *et al.*, 2017).

Algunos de los alcoholes superiores juegan un rol importante en la morfología de la levadura por ejemplo el alcohol isoamílico induce un crecimiento pseudohifal, lo que indica una vía de señalización de quórum, que vincula la detección ambiental de las moléculas de auto señalización y la morfogénesis (Hazelwood *et al.*, 2008).

El medio sintético que se utilizó contenía amonio, nitrato y 1% de extracto de levadura. A diferencia del mosto natural en el que puede haber otras fuentes de este compuesto. Sin embargo, no hay información sobre la cantidad y fuente de nitrógeno en las plantas de *Dasyllirion* ssp. En investigaciones donde comparan la producción de alcoholes amílicos y superiores de fermentaciones de jugo de *Agave* y medio M11, las levaduras tuvieron mayor producción de alcoholes amílicos en las fermentaciones con jugo de *Agave* que en el medio M11 (Segura *et al.*, 2014). En este trabajo se encontró que las tres cepas produjeron en promedio 12 compuestos pertenecientes a alcoholes amílicos, cuando la fermentación se realizó con mosto de sotol, en tanto, en medio M11 se encontraron en promedio 7 alcoholes amílicos. Dentro de los alcoholes encontrados solo en las fermentaciones naturales con mosto de sotol fueron: 2-etil-4-metil pentanol, 1-hexanol, alcohol isoheptílico, 3-mercaptohexanol, 3-metil-4-pentenol, 5-(2-metilideneciclopropil) pentan-1-ol, alcohol isooctílico, 1-heptanol, (E)2- octen-1-ol, 1-octino-3-ol y 1-nonanol.

En el estudio realizado por Campos *et al.*, (2010), fermentaron cepas de *S. cerevisiae* silvestres aisladas de caña de azúcar las cuales presentaron 300 mg/100mL de alcohol isoamílico y 300 mg/100 mL de alcohol isobutílico niveles que se encuentran de acuerdo con la legislación brasileña.

Los alcoholes superiores pueden tener un efecto positivo o negativo según su concentración, altas concentraciones de alcoholes superiores (>300 mg/L) crea una sensación de calentamiento en boca (Loviso y Libkind, 2019). El 3-metil butanol se encontró en todas las fermentaciones y es característico por su aroma a dulce frutal (Vázquez y Rodríguez, 2012). Según González y Cook, (2016), reportan que el 3-metilbutanol es uno de los 60 odorantes que influyen en el sabor del tequila. De acuerdo con Lachenmeier et al., (2006), el sotol tiene menos concentración de 3-metilbutanol en comparación con el tequila, mezcal y bacanora.

Estudios realizados con *A. tequilana* de ocho y nueve años de crecimiento reportan una cantidad de nitrógeno asimilable en planta de 0.02 a 0.03 % (Sánchez y Hope, 1953), por lo que, para fines industriales, existe escasez de este nutriente, siendo necesario adicionar fuentes de nitrógeno como el sulfato de amonio para activar la fermentación (Arrizon y Gschaedler, 2002).

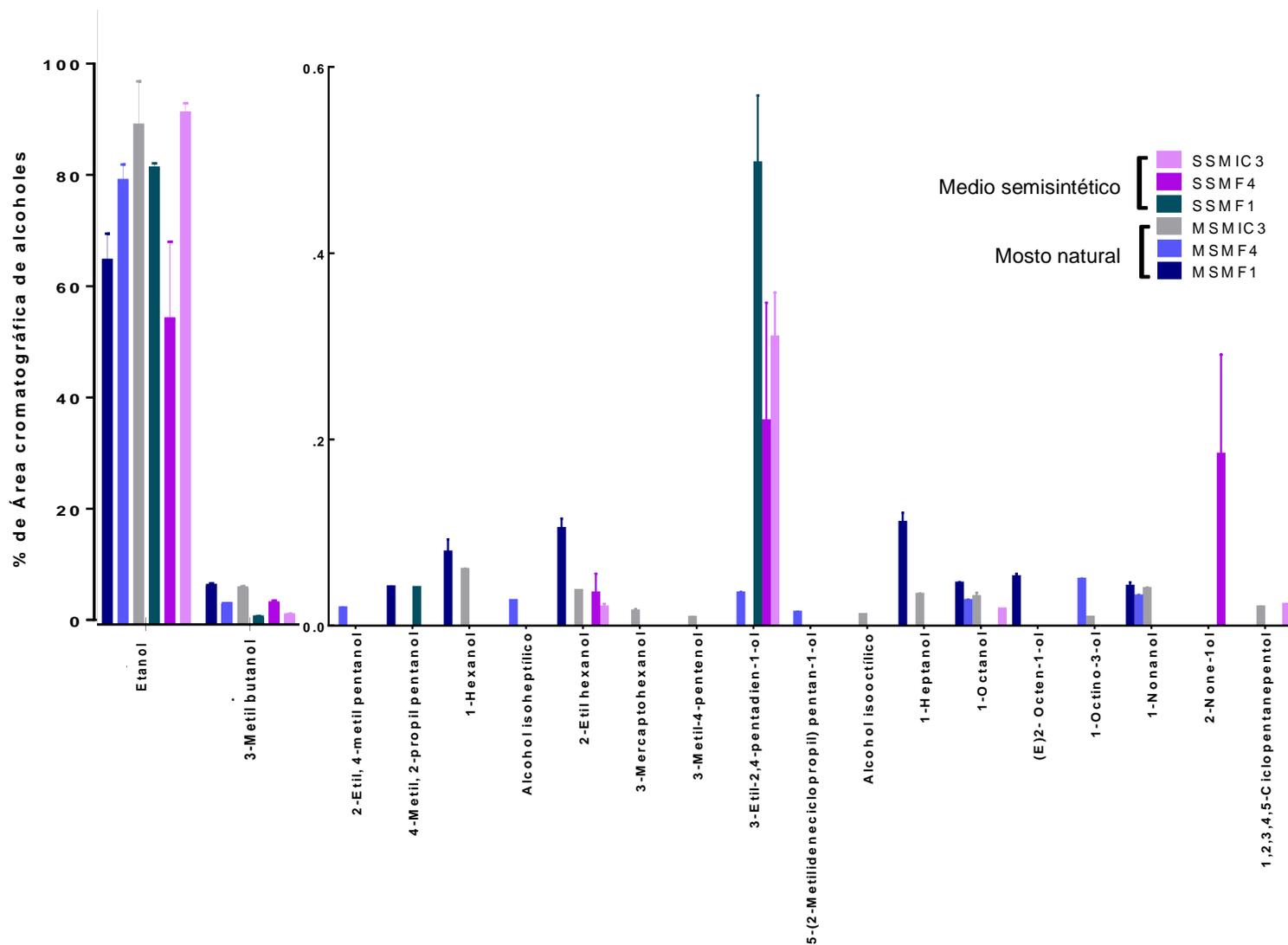


Figura 27. Distribución porcentual de la familia de los alcoholes presentes en las fermentaciones de mosto de sotol y medio semisintético, realizadas por las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 de *S. cerevisiae*, detectadas a través de la microextracción en fase sólida

8.2 Identificación de ácidos orgánicos

Los ácidos reconocidos en este proyecto no solo se han encontrado en bebidas alcohólicas como el vino, el tequila y el mezcal, sino también en jugos y vinagres de frutas (Zhu *et al.*, 2015). Por medio de MEFS-CG-Masas se encontraron nueve ácidos de los

cuales siete se reportan como descriptores de aromas a grasa y queso principalmente (Molina *et al.*, 2007). Los compuestos más abundantes en este tipo de bebidas como el mezcal, tequila, bacanora y sotol son: el ácido acético, propanoico, 2 metil-propanoico, butanoico, 2-metil butanoico hexanoico octanoico nonanoico y decanoico (Benn y Peppard, 1996; López y Dufour, 2001; De León-Rodríguez *et al.*, 2006; Molina *et al.*, 2007). De acuerdo con Molina *et al.*, (2007), los ácidos se caracterizan por la sensación grasosa.

Los ácidos encontrados en todas las fermentaciones fueron el ácido caprílico con aroma a queso, el ácido capróico con olor grasoso y el ácido undecanoco (Molina *et al.*, 2007).

La biosíntesis de los ácidos grasos producidos durante la fermentación alcohólica inicia mediante la formación de acetil-coA, que reacciona con la malonil-coA para formar ácidos grasos de cadena lineal saturados con un número par de cuatro a 18 átomos de carbono; La aparición de ácidos grasos con un número impar de átomos de carbono, así como insaturados depende de las condiciones de fermentación (Cedrón, 2004; Pires *et al.*, 2014).

Los ácidos grasos volátiles contribuyen al sabor de las bebidas fermentadas como el vino o la cerveza y su concentración generalmente se encuentra entre 100 y 250 mg/100 mL En los destilados, la concentración de ácidos grasos libres es significativamente menor debido a la esterificación (Hirst y Richter, 2016).

La acidez es importante en el proceso de elaboración de las bebidas alcohólicas. Existen diferentes ácidos, en estado libre o compuesto, algunos derivados del sustrato y otros que surgen de los diferentes procesos de fermentación, por ejemplo, en los vinos (Hirst y Richter, 2016).

En la figura 28 se puede observar que el ácido caprílico está presente en mayor porcentaje en todas las fermentaciones mientras el ácido isobutílico y el ácido nonenoico son los de menores porcentajes.

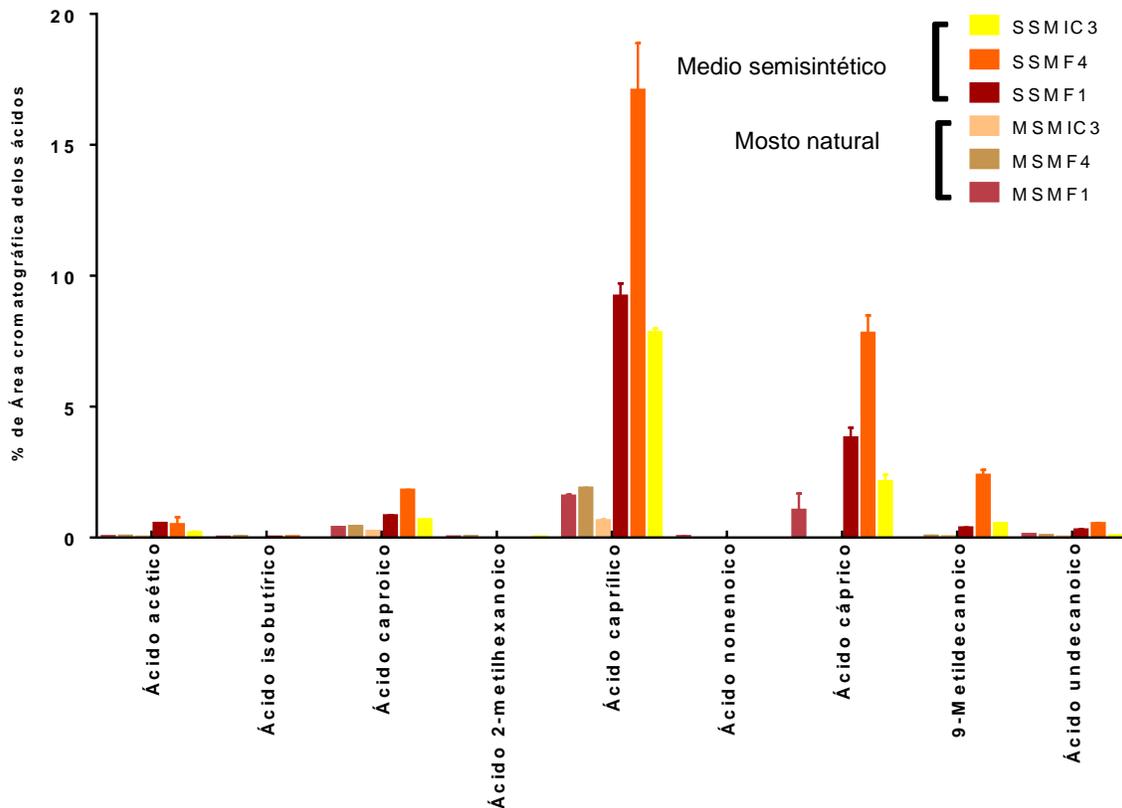


Figura 28. Distribución porcentual de la familia de los ácidos presentes en las fermentaciones de mosto de sotol y medio semisintético, realizadas por las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 de *S. cerevisiae*, detectadas a través de la microextracción en fase sólida

8.3 Identificación de ésteres

Los ésteres se forman principalmente en las últimas etapas de fermentación (Lamikanra *et al.*, 1996; Hernández *et al.*, 2016). En este trabajo se hallaron 14 ésteres en las fermentaciones naturales y semisintéticas, con las tres cepas, los cuales se pueden observar en la figura 29. Entre los ésteres identificados se encontró el acetato de etilo, este es un compuesto común en las bebidas alcohólicas, su concentración está relacionada con la cantidad de glucosa y fructosa (Hirst y Richter, 2016) y se encuentra en la lista de sustancias peligrosas para la salud, de acuerdo con la norma oficial mexicana “NOM-159-SCFI-2004, bebidas alcohólicas-sotol en especificaciones y pruebas” y establece como valor máximo 0.27 g/L. También se identificó, decanoato de isoamilo, el cual se caracteriza por olores dulces, octanoato de etilo que proporciona un aroma frutal, decanoato de etilo y decanoato de metilo que conforman el grupo de ésteres de aceto,

derivados de la condensación enzimática del ácido acético y un alcohol superior (Klosowski y Czuprynski, 2006; Molina *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2015).

Otros ésteres encontrados en diferentes bebidas e identificados en las fermentaciones realizadas en este trabajo son el acetato de isoamilo, acetato de 2-metilbutilo y acetato de feniletilo (Saerense *et al.*, 2010; Pires *et al.*, 2014).

Dentro de los ésteres etílicos que son formados por ácidos grasos de cadena media y el etanol (Hirst y Richter, 2016). Se identificó al 6-ácido heptanoico éster etílico como metabolito secundario en las tres cepas, tanto en mosto natural como sintético. Mientras que el ácido ciclohexanoacético, alfa etil éster metílico se encontró en todas las cepas menos en la fermentación SMIC3 en mosto natural. El ácido 3-heptenoico éster etílico solo se detectó en las fermentaciones de SMF1 y SMF4 en mosto natural y el ácido hexanoico éster etílico solo en la fermentación de SMIC3 en medio semisintético.

Según Verstrepen *et al.*, (2003), mencionan que entre más largas sean las cadenas de los ésteres etílicos de ácidos grasos es menos probable que sean exportados al medio, Según Nordstriim, (1963 y 1964) menciona que los sólidos y lípidos del mosto promueven el crecimiento de la levadura y, por tanto, el uso de acetyl-CoA se encuentra menos disponible para la producción de éster. Mientras que Lee *et al.*, (1995) y Yoshimoto *et al.*, (2002), encontraron que los alcoholes superiores, puede ser el principal factor limitante para la síntesis de éster. Por ejemplo, Yoshimoto *et al.*, (2002) menciona que la cantidad de 3-metilbutanol influyen en la cantidad de acetato isoamílico. Sin embargo, en esta investigación se identificó 3-metilbutanol, pero no el éster. En contra parte Yoshioka y Hashimoto, (1984) observaron que los niveles altos de oxígeno y ácido graso insaturado aumentan la producción de alcohol fusel, pero disminuyen los niveles de éster. Además, Verstrepen *et al.*, (2003b) demostraron que las cepas de levadura de cerveza genéticamente modificadas que sobreexpresan genes ATF producen más acetato de isoamilo y acetato de etilo lo que demuestra que la síntesis de éster en las fermentaciones de cerveza no está limitada por la disponibilidad de sustratos. Por lo que la producción de ésteres está dada por la actividad enzimática de las enzimas involucradas en la formación de ésteres de la levadura.

Los ésteres contribuyen a las características florales y frutales que caracterizan a las bebidas como vinos y cerveza (Mallouchos *et al.*, 2003; Saerens *et al.*, 2010). Generalmente mostos que contiene niveles más altos de glucosa y fructosa producen más

ésteres que los mostos con alto contenido de maltosa debido a que el metabolismo de glucosa produce mayores cantidades de acetil-CoA, lo que resulta en la producción mejorada de éster (Engan1972; Younis y Stewart 1998,1999).

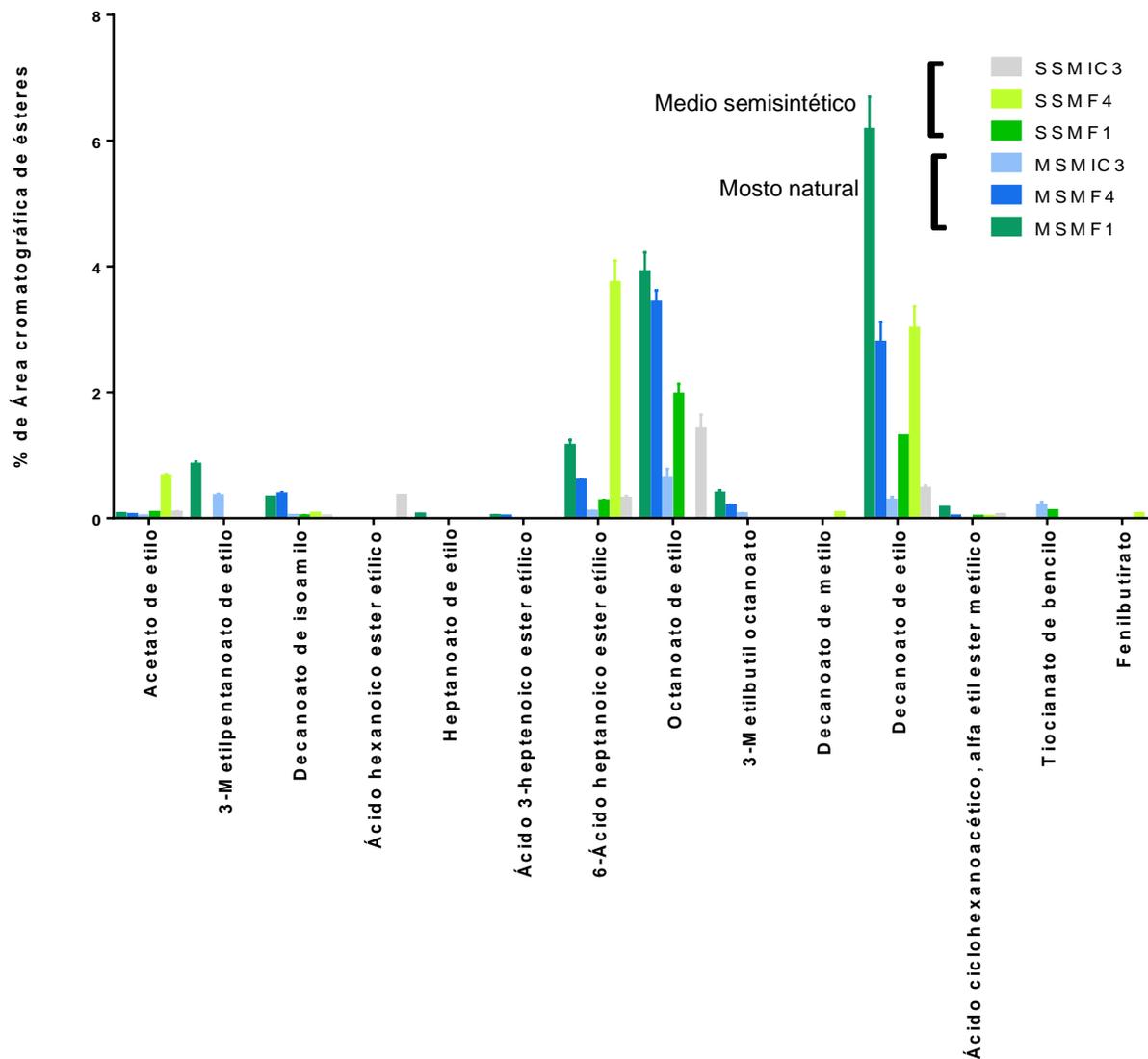


Figura 29. Distribución porcentual de la familia de los ésteres presentes en las fermentaciones de mosto de sotol y medio semisintético, realizadas por las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 de *S. cerevisiae*, detectadas a través de la microextracción en fase sólida

8.4 Identificación de aldehídos y cetonas

En la figura 30 se muestran los aldehídos y cetonas. Dentro del grupo de los aldehídos se encontraron 2-nonenal, decanal, 7-metoxi-3,7-dimetiloctanal y 2-metilundecanal. Durante la identificación de compuestos volátiles no se logró detectar acetaldehído debido a la forma de inyección. Sin embargo, el acetaldehído es el principal compuesto carbonílico importante de la fermentación alcohólica y se forma como compuesto intermedio por degradación del piruvato (Christoph y Christoph, 2007). Por otro lado, solo se logró identificar un compuesto de la familia de cetonas; metil bencil cetona.

8.5 Identificación de terpenos

Se identificó mayor porcentaje de terpenos en las fermentaciones naturales que en las fermentaciones semisintéticas. El terpeno carvona se encontró en ambos medios. Según National Center for Biotechnology Information. PubChem Database 2019, este monoterpenoide es un antifúngico. La producción de terpenoides se ha atribuido principalmente a la hidrólisis de enlaces glucosídicos; sin embargo, *S. cerevisiae* es capaz de producir monoterpenos a través de la vía del ácido mevalónico. En esta vía, los monoterpenos se forman de novo en las mitocondrias y se unen al catabolismo de leucina y a una nueva GPP sintasa (Hirst y Richter, 2016).

Se detectó mircenol, el cual tiene una fragancia a lavanda, este compuesto también se identificó en fermentaciones de Raicilla (Lappe et al., 2008). También se detectó sabinine, el cual se puede observar su distribución en la figura 30.

La presencia de compuestos terpénicos como el α -terpineol, el linalol y el citronelol no se detectaron posiblemente porque su concentración aumenta a través de la maduración de la bebida (Prado *et al.*, 2015). En vino estos compuestos son sensibles a las condiciones ácidas y aumentan con la temperatura de maduración y el tiempo de almacenamiento (Marais, 1983).

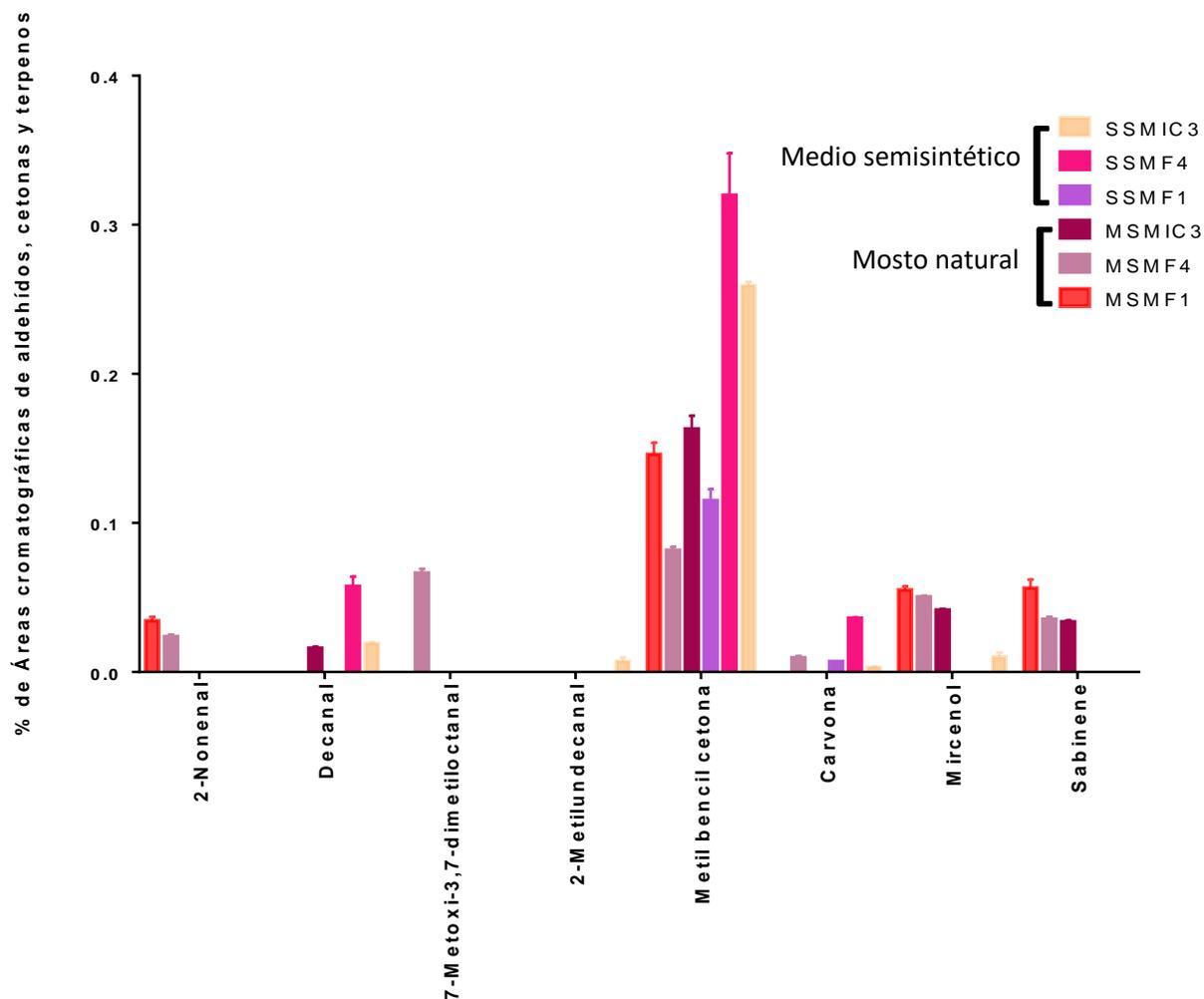


Figura 30. Distribución porcentual de aldehídos, cetonas y terpenos presentes en las fermentaciones de mosto de sotol y medio semisintético, realizadas por las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 de *S. cerevisiae*, detectadas a través de la microextracción en fase sólida

8.6 Identificación de compuestos

Entre los compuestos dañinos se encontró compuestos fenólicos en las fermentaciones, naturales excepto en la fermentación sintética de SMIC3; en la figura 31, se observa que los porcentajes de áreas son mayores en las fermentaciones naturales que en las semisintéticas. No obstante, no se identificaron compuestos como eugenol, guaiacol, 4-etil guaiacol y vainillina, presentes en otros destilados como el vino y el mezcal. Esto podría deberse a las propiedades de cada sustrato, más que de los organismos que intervienen

en las fermentaciones, es decir, este tipo de compuestos se encuentran más relacionados a las plantas, ya que son utilizados para procesos fisiológicos, por ejemplo, el eugenol se ha encontrado en extractos de plantas y es utilizado como antimicrobiano, por otra parte en la uva se han identificado más de 500 compuestos fenólicos (Mosedale y Puech, 1998).

8.7 Identificación de furanos

Los furfurales identificados fueron 2-furametanol, 2-metilfurano, 5-pentil-3H-furan-2-ona y 5(metiltetrahydro-2- furanil) metanol, estos compuestos ofrecen notas ahumadas, olor a madera o caramelo quemado. Según Arellano *et al.*, (2008), el 2-furametanol y el 5(metiltetrahydro-2- furanil) se produce al hornear las piñas con carbón de leña, debido a las reacciones de Maillard (Christoph y Christoph, 2007). Modig *et al.*, (2002), encontraron que altas concentraciones de furfural inhiben enzimas esenciales como la piruvato-deshidrogenasa y la aldehído-deshidrogenasa.

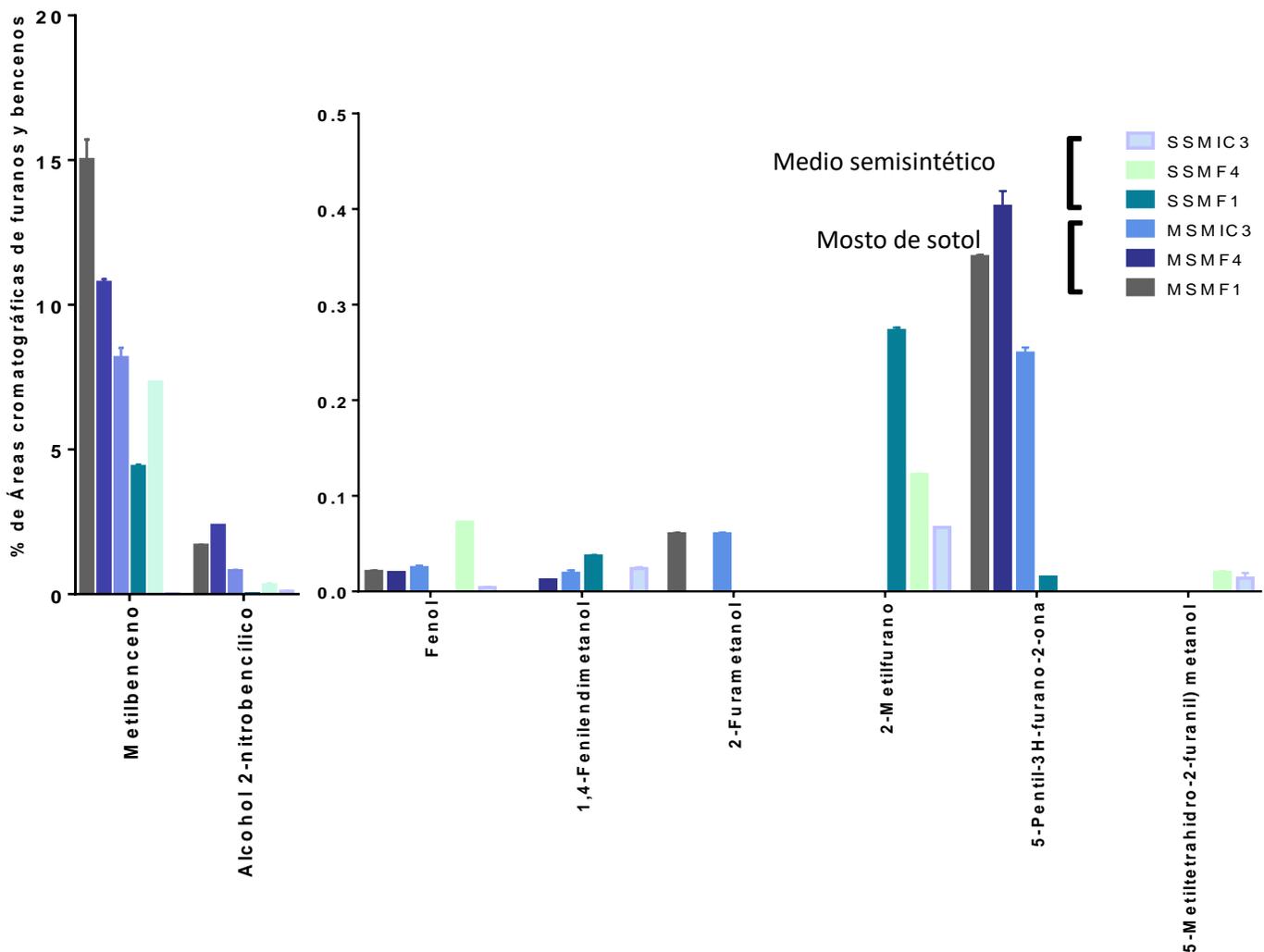


Figura 31. Distribución porcentual de furanos presentes en las fermentaciones de mosto de sotol y medio semisintético, realizadas por las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 de *S. cerevisiae*, detectadas a través de la microextracción en fase sólida

8.8 Otros compuestos

En la figura 32 se muestra los siete hidrocarburos presentes en las fermentaciones naturales y semisintéticas de las tres cepas. El porcentaje de esta familia es pequeña a comparación de las otras familias de volátiles. Dentro de estos compuestos el 1,6-heptadien-3-yne es el que se encuentra en la mayoría de las fermentaciones.

Al comparar la cantidad de hidrocarburos entre las fermentaciones naturales y semisintéticas, existe mayor diversidad de hidrocarburos en las fermentaciones

semisintéticas. A diferencia del trabajo de Contreras, (2016), no se encontraron aminas. Por otro lado, la cantidad de compuestos cíclicos aromáticos identificados en muestras de sotol recolectadas en sotoleras de los municipios de Aldama y Madera fue mayor. Esto puede deberse a que la producción en estos municipios es artesanal y no hay un control de la fermentación, donde se han encontrado levaduras *no-Sacharomyces*, hongos y bacterias que pueden aportar otros metabolitos (Contreras, 2016). Tampoco se detectaron compuestos azufrados porque estos se encuentran asociados con el periodo de añejamiento, donde la bebida está en contacto con las barricas de madera (Ceballos *et al.*, 2009).

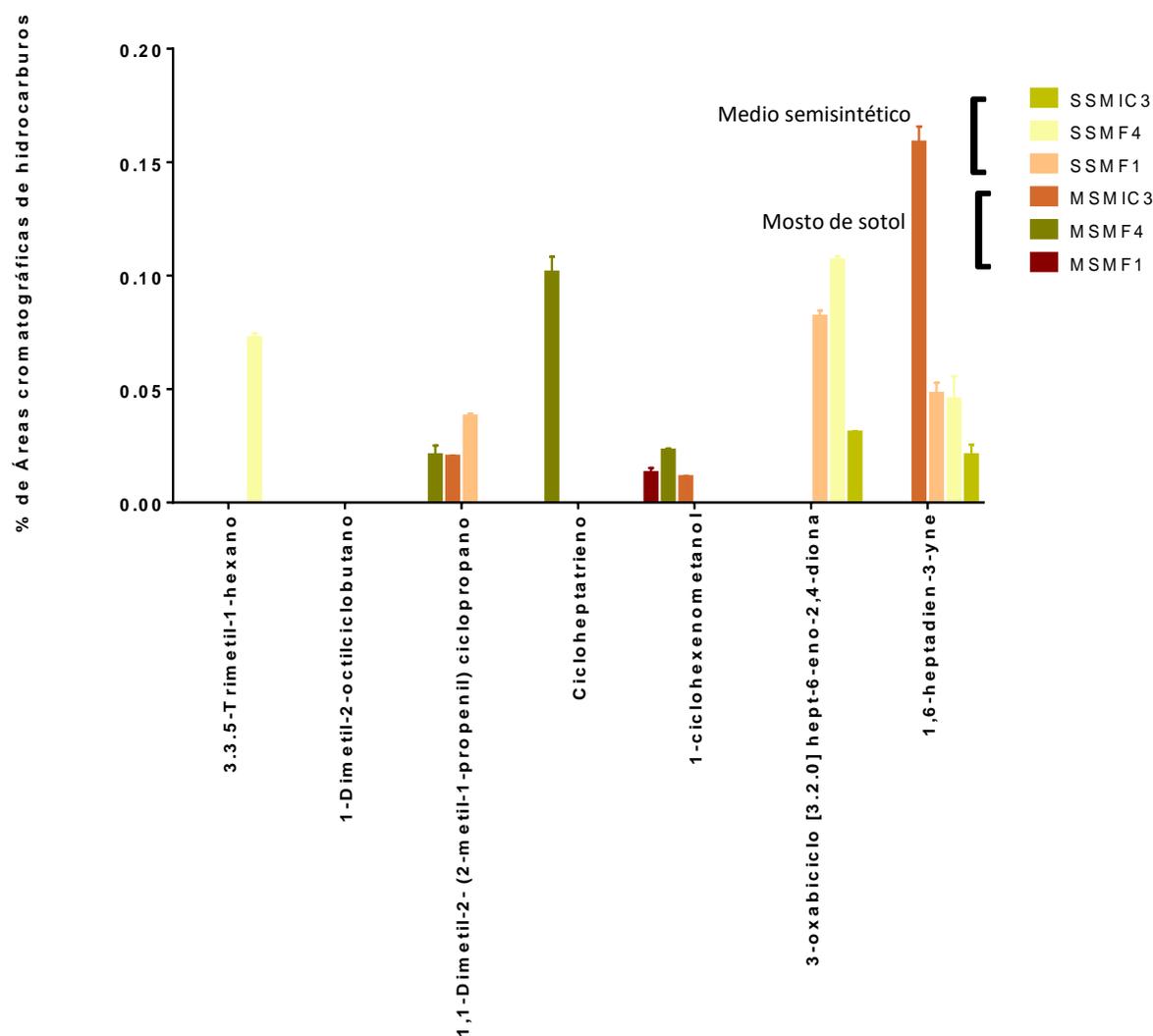


Figura 32. Distribución porcentual de otros compuestos presentes en las fermentaciones de mosto de sotol y medio semisintético, realizadas por las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 de *S. cerevisiae*, detectadas a través de la microextracción en fase sólida.

Los compuestos identificados dependen en parte del tipo de método de extracción, de los solventes seleccionados, del tiempo y las condiciones de extracción (Caldeira *et al.*, 2007; Martín Del Campo *et al.*, 2011). MEFS-CG-Masas es ampliamente utilizado para evaluar compuestos volátiles por ser un método rápido, selectivo y ecológico que en esta investigación permitió detectar diferentes compuestos. Otras investigaciones (López y Guevara, 2001), reportaron que los compuestos volátiles en sotol son muy parecidos a los que se encuentran en mezcal y son más complejos y ricos que en tequila.

CONCLUSIONES

Las 18 levaduras aisladas de fermentaciones artesanales de sotol y de mezcal previamente identificadas con pruebas bioquímicas y de acuerdo con los resultados del RFLP de la región ITS-5.8 de ADN ribosomal, pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

Se determinó que las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 tienen mayor grado de disimilitud con respecto a las 15 cepas restantes, por medio de la amplificación de secuencias de fragmentos deltas 12 y 21 y de la amplificación de microsatélites con las secuencias GTG₅ y M13 ampliamente utilizadas en la tipificación de especies estrechamente emparentadas.

Se recomienda la utilización de las cepas nombradas SMF1, SMF4 y SMIC3 por ser osmotolerantes, tolerantes a pH bajos (3), tolerantes a concentraciones de 12 % de etanol y de soportar temperaturas de hasta 40 °C, ya que, la concentración de carbohidratos varía según la cocción del tallo de sotol; el pH suele ser bajo debido a los posibles consorcios que se encuentran en las fermentaciones artesanales no controladas por los productores, las altas temperaturas en las que se mantienen las tinas de fermentación, y al tolerar mayor grado de etanol pueden contrarrestar contaminantes bacterianas durante la fermentación.

La floculación de la cepa SMIC3 puede ser la responsable del bajo rendimiento de etanol, y de los residuos de carbohidratos, en tanto las cepas SMF1 y SMF4 produjeron altos rendimientos de etanol, sin residuos de carbohidratos y sin la formación de flóculos, independientemente del sustrato fermentativo, por tanto, se podría recomendar su uso para evitar fermentaciones estancadas.

El tipo de sustrato fermentativo afectó el tiempo de producción de etanol de la cepa SMIC3. Dado los resultados de rendimiento de las fermentaciones semisintéticas, la gama de compuestos volátiles generados y al ser aislada de fermentaciones artesanales de mezcal se puede recomendar su uso en la producción de esta bebida.

Los compuestos congénicos identificados en las fermentaciones realizadas con las cepas seleccionadas se han encontrado en otras bebidas en las que aportan aromas agradables, cuerpo y sabor, por tanto, se pueden utilizar como únicos iniciadores, suficientes para emplearse en fermentaciones controladas de sotol.

Finalmente se puede concluir que las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 pueden ser propuestas para realizar escalamientos de fermentaciones de sotol y recomendadas para hacer fermentaciones controladas en otras bebidas artesanales mexicanas cómo el mezcal, rancilla y bacanora que son bebidas destiladas tradicionales en el sur de México y para la producción de bioetanol, ya que su rendimiento y productividad de etanol y compuestos volátiles no tiene diferencias significativas entre los diferentes sustratos fermentativos empleados.

ANEXOS

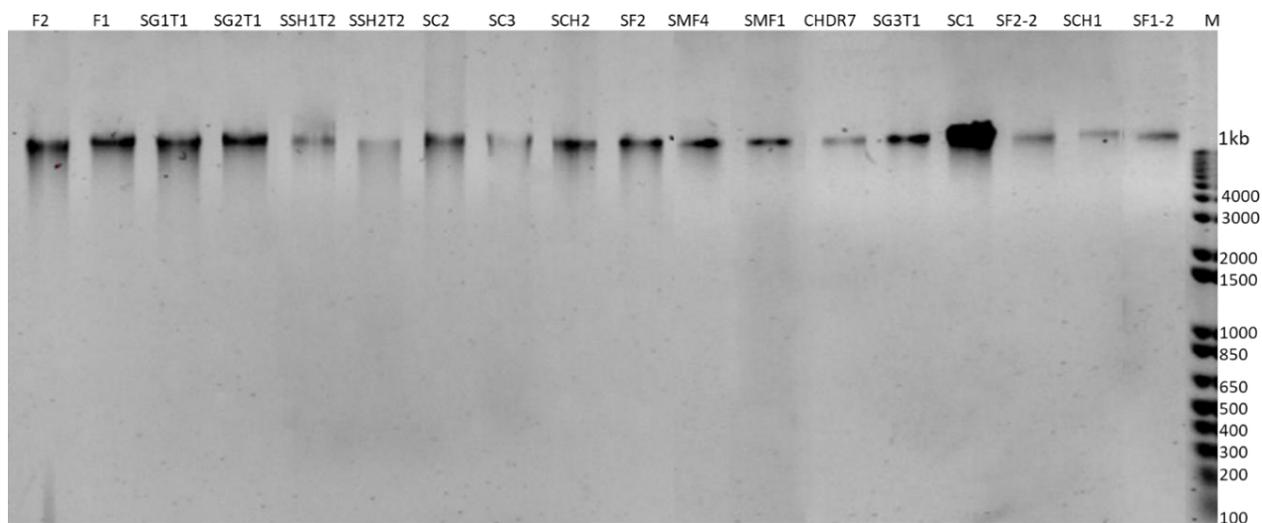


Figura I. Extracción de DNA de 18 cepas de *S. cerevisiae* aisladas de fermentaciones naturales de sotol, por el método de fenol-cloroformo descrito por Esteve *et al.*, (1999).

(M) corresponde al marcador de DNA 1Kb Invitrogen.

CEPA	Correlación a 260	Correlación a 280	concentración	CV (%)	Desviación estándar	Radio 260/280
F2	0.3135	0.1525	313.5025	8.45	26.491	2.0555
F1	0.397	0.1915	396.646	0.764	3.031	2.0715
SC1	0.9805	0.461	980.2345	5.38	52.781	2.1285
SG1-T1	0.2485	0.122	248.612	8.12	20.185	2.0385
SG2-T1	0.238	0.1195	238.0845	0.399	0.95	1.997
SF1-2	0.253	0.1305	252.9705	1.19	3.016	1.94
SSh2-T2	0.342	0.1755	354.136	0.0967	0.331	1.947
CHDR7	0.354	0.1685	283.347	4.88	17.292	2.099
SMF1	0.283	0.144	576.536	2.43	6.892	1.97
SCH1	0.5765	0.2715	580.8335	0.63	3.633	2.1
SMF4	0.581	0.2785	320.8485	2.39	13.906	2.08
SMIC3	0.321	0.1685	320.8485	0.299	0.959	1.9
SSh1 -T2	0.6745	0.311	674.7915	1.14	7.695	2.1
SCH2	0.793	0.36	792.88	0.31	2.459	2.2
SC2	0.5895	0.265	589.249	1.37	8.068	2.2
SF2-T2	0.3215	0.174	321.4725	0.464	1.49	1.8
SG3-T1	0.486	0.2255	485.7005	0.0188	0.091	2.15
SC3	0.6505	0.299	650.367	0.0364	0.237	2.17

Tabla 7. Cuantificación de DNA por medio del equipo Take-3-Epoch (BioTek, Vermont, EUA) de las 18 cepas aisladas de fermentaciones naturales de sotol y de mezcal.

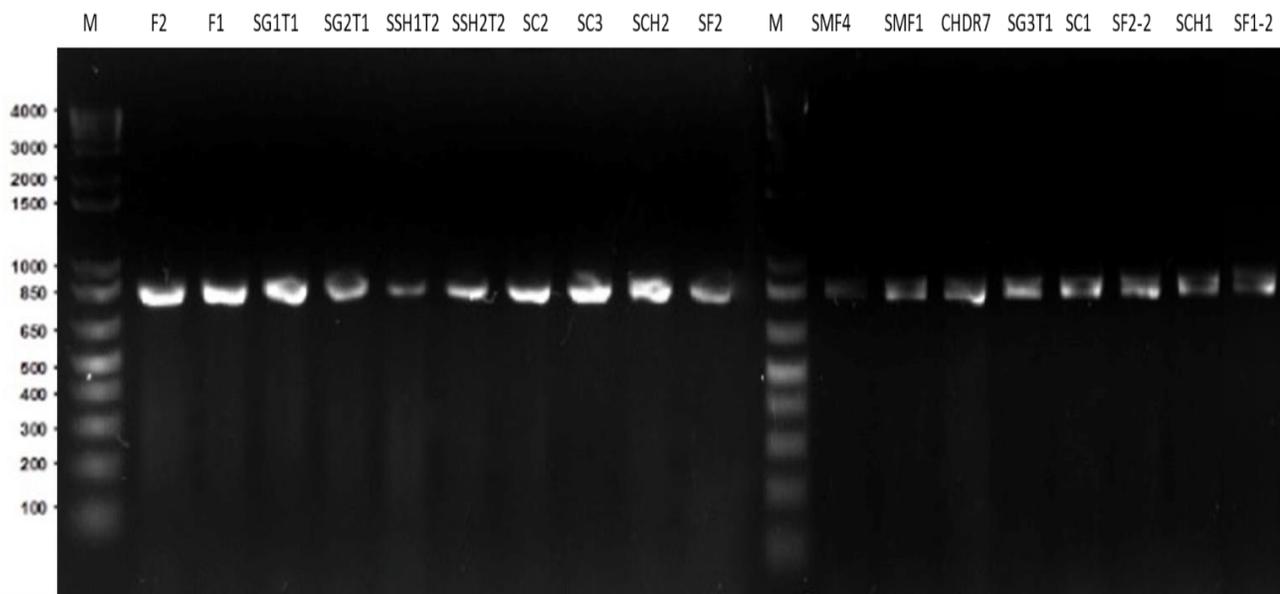


Figura II. Amplificación de la región ITS1-5.8- ITS2 de las 18 cepas de *S. cerevisiae*, mediante PCR. Gel de agarosa al 1.5 %. Electroforesis a 80V por 40min, utilizando TBE 0.5X teñido con SYBR Safe DNA Gel Stain, M: Marcador de DNA de 1Kb Invitrogen

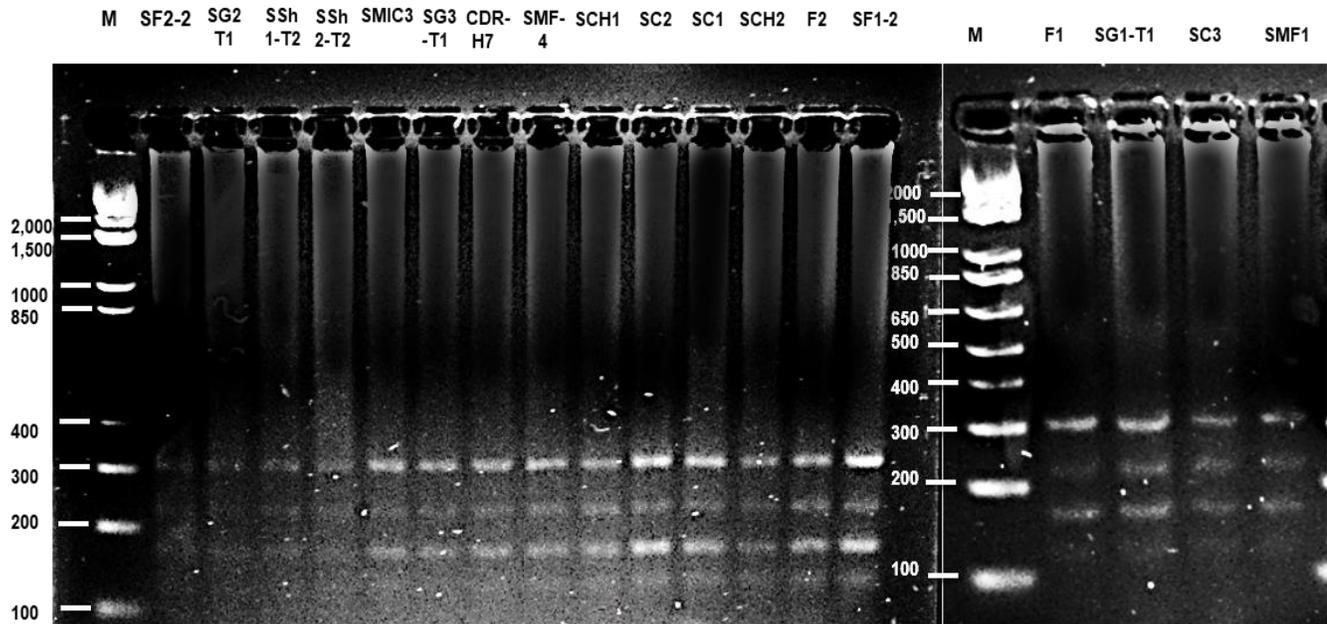


Figura III. Corte con la enzima *Hae* III FD. Gel de agarosa al 3 %. Electroforesis a 70 V por 90min, utilizando TBE 0.5X teñido con SYBR Safe DNA Gel Stain, M. Marcador de DNA de 1 Kb Invitrogen.

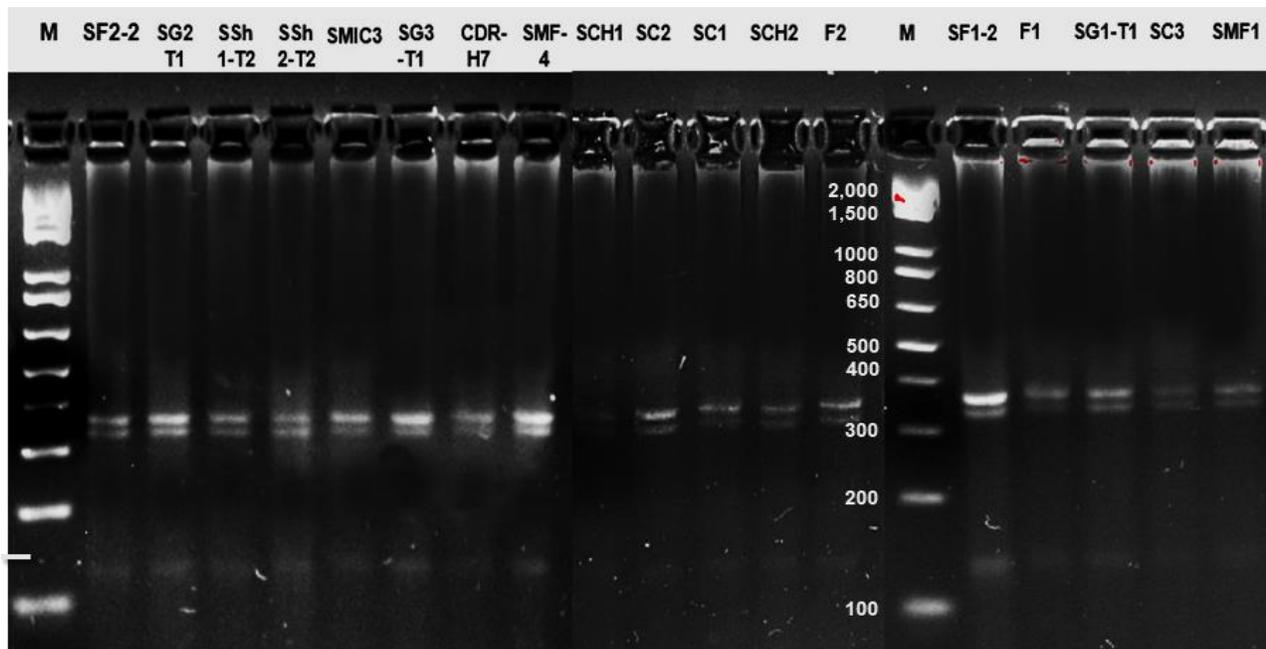


Figura IV. Corte con la enzima *Hha* I FD. Gel de agarosa al 3 %. Electroforesis a 70V por 90min, utilizando TBE 0.5X teñido con SYBR Safe DNA Gel Stain, M. Marcador de DNA de 1 Kb Invitrogen.

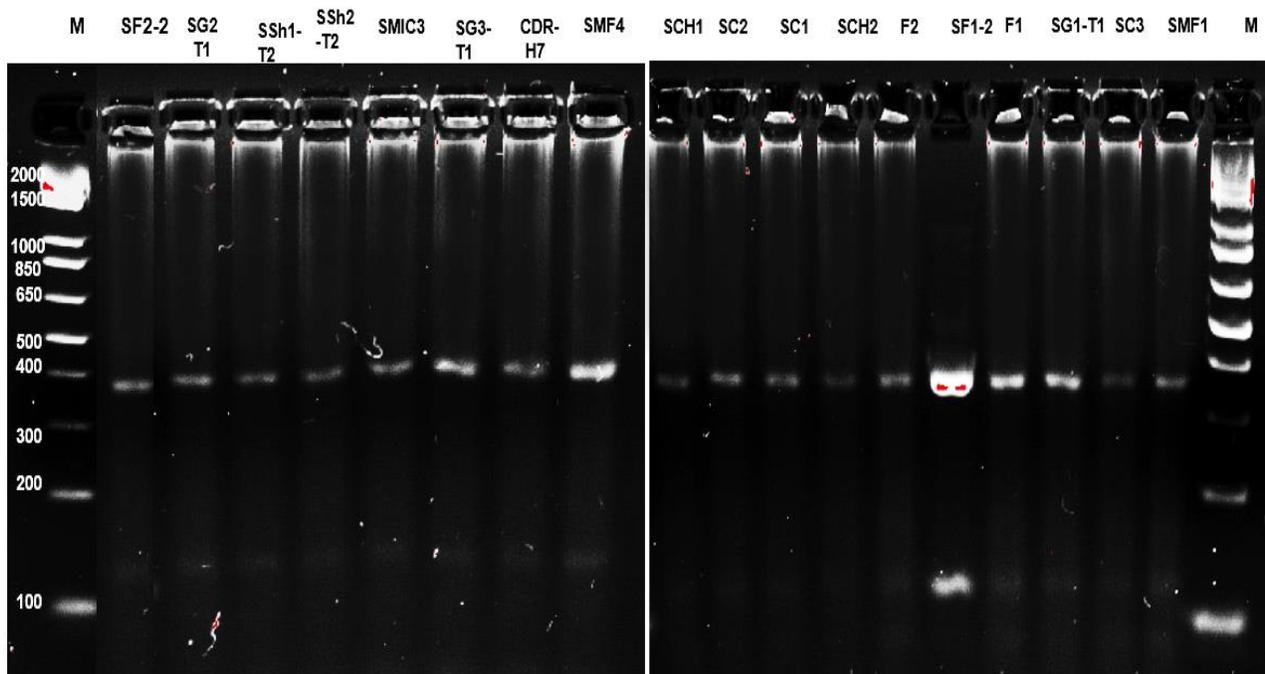


Figura V. Corte con la enzima *Hinf* I FD. Gel de agarosa al 3 %. Electroforesis a 70V por 90min, utilizando TBE 0.5X teñido con SYBR Safe DNA Gel Stain, M. Marcador de DNA de 1Kb Invitrogen.

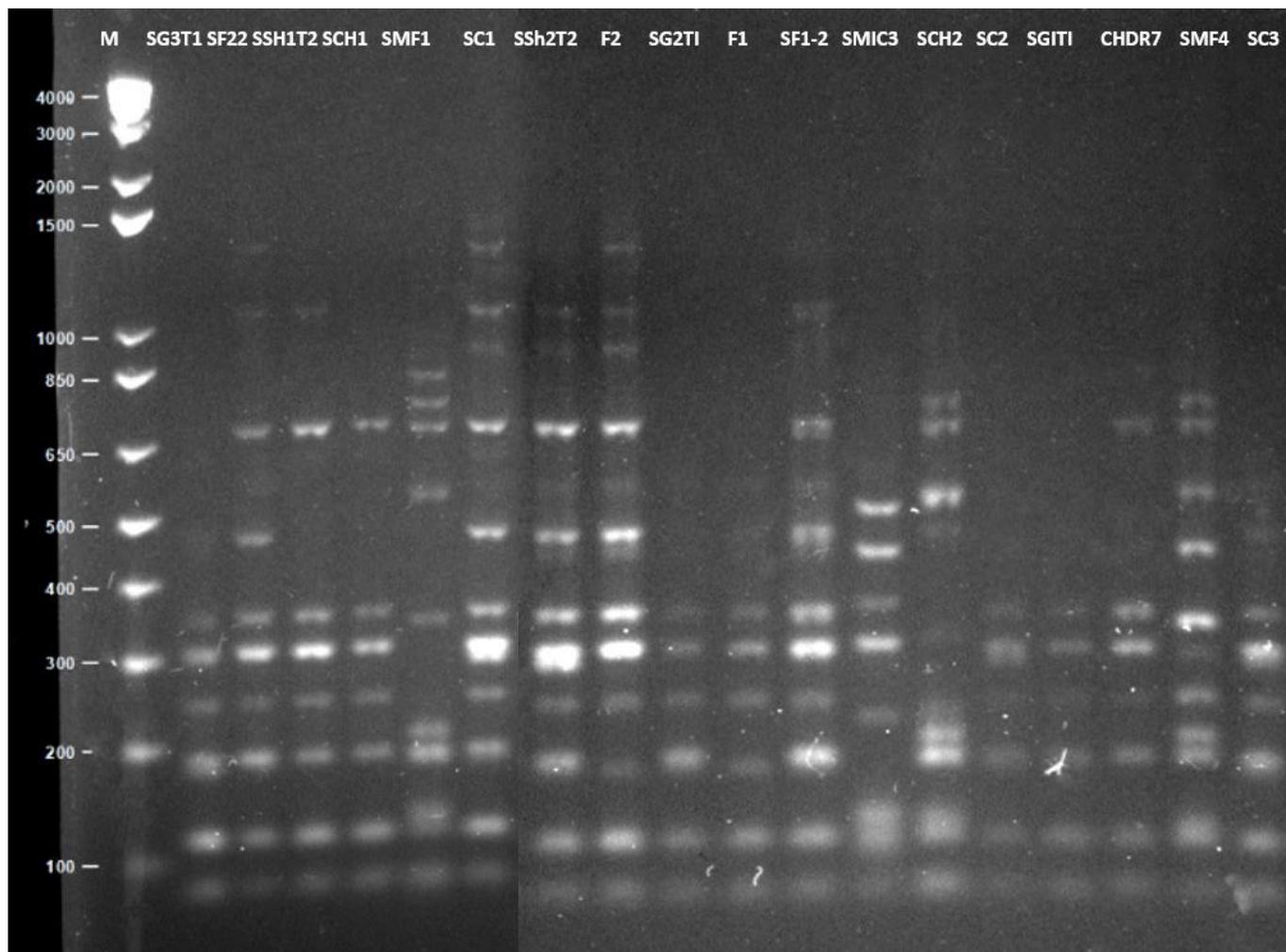


Figura VI. Gel de electroforesis de la amplificación con Fragmentos Interdelta con los cebadores 12δ y 21δ, con 200ng de DNA de las 18 cepas de *S. cerevisiae* aisladas de fermentaciones naturales de sotol

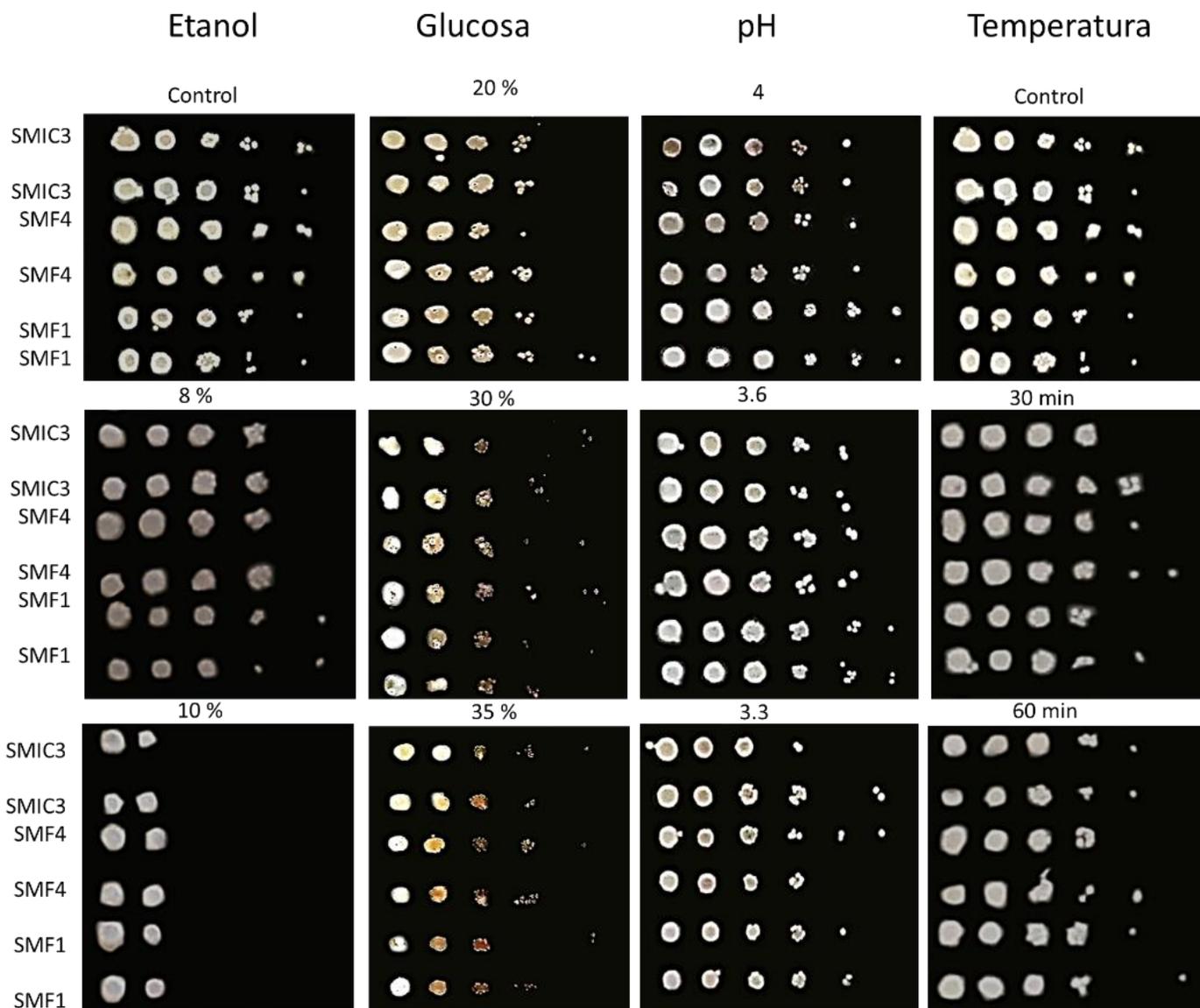


Figura VII. Crecimiento de las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 en dilución seriada (1:1, 1:10, 1:100, 1:1 000, 1:10 000, 1:100 000) en YPDA a las 48 h, con las condiciones de estrés: Etanol 8 % y 10 %. Choque osmótico con glucosa al 20 %, 30 % y 35 %. pH 4.0, 3.6, 3.3 y Choque térmico a 50 °C por 30 min y 60 min.

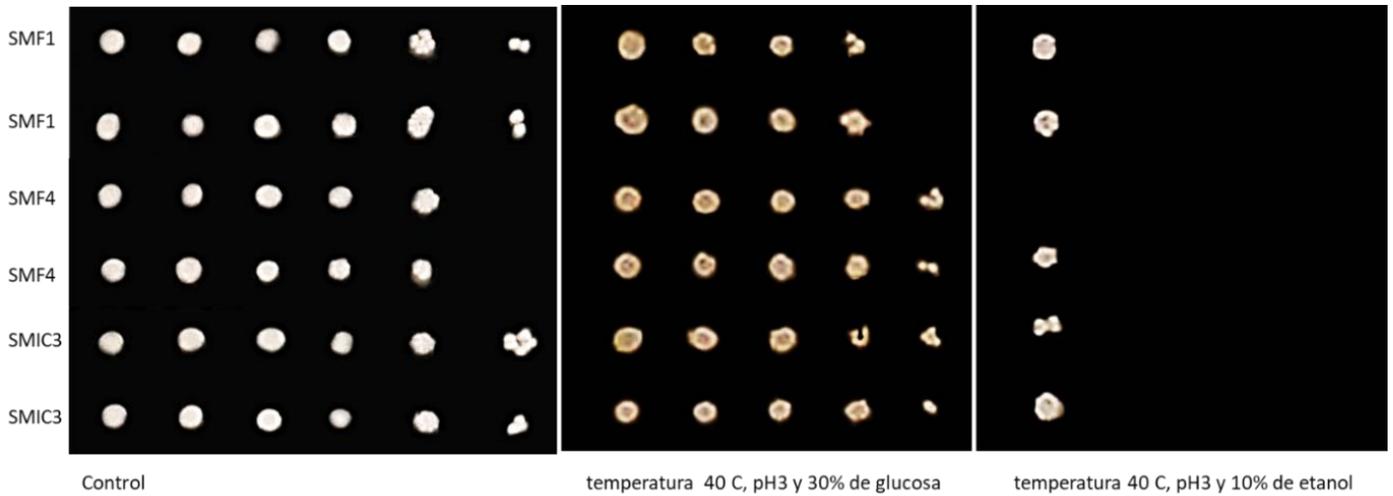


Figura VIII. Crecimiento de las cepas SMF1, SMF4 y SMIC3 en dilución seriada (1:1, 1:10, 1:100, 1:1 000, 1:10 000, 1:100 000) en YPDA a las 48 h, después de una incubación de 24 h en caldo YPD con diferentes tratamientos a) control, b) incubación 40 °C con pH 3.0 y 30 % de glucosa y c) incubación 40 °C con pH 3.0 y etanol al 10 %.

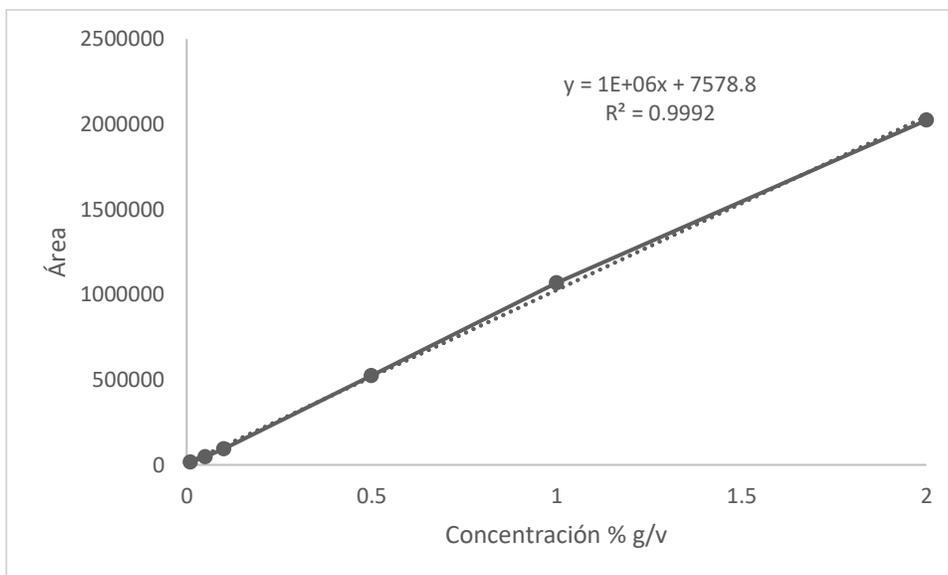


Figura IX. Curva patrón de la concentración en porcentaje g/v de la glucosa, realizada en el cromatógrafo de líquidos Waters 1525 con un detector de IR (Waters 2414) y con una columna Aminex HPX-87H, 300mm x 7.8 mm (Bio-Rad).

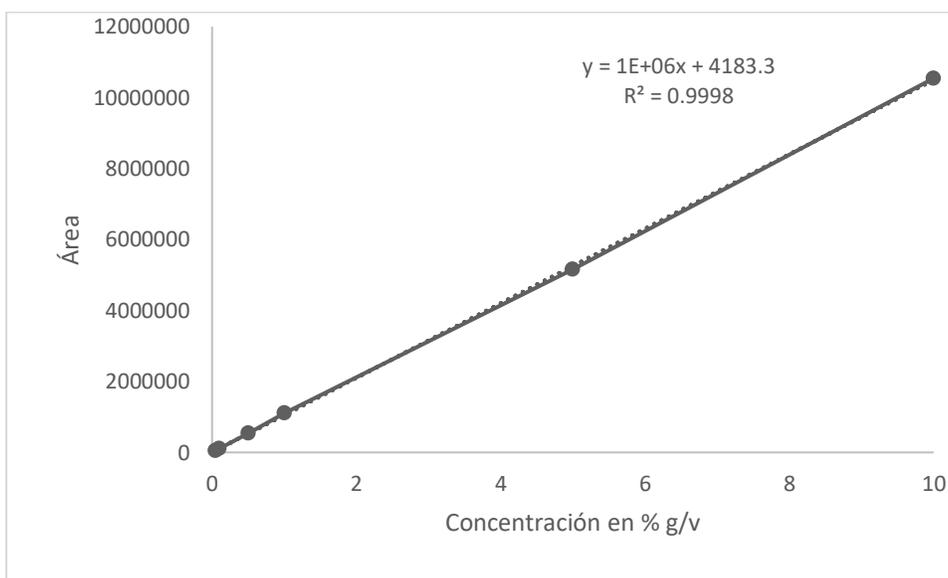


Figura X. Curva patrón de la concentración en porcentaje g/v de la fructosa, realizada en el cromatógrafo de líquidos Waters 1525 con un detector de IR (Waters 2414) y con una columna Aminex HPX-87H, 300mm x 7.8 mm (Bio-Rad).

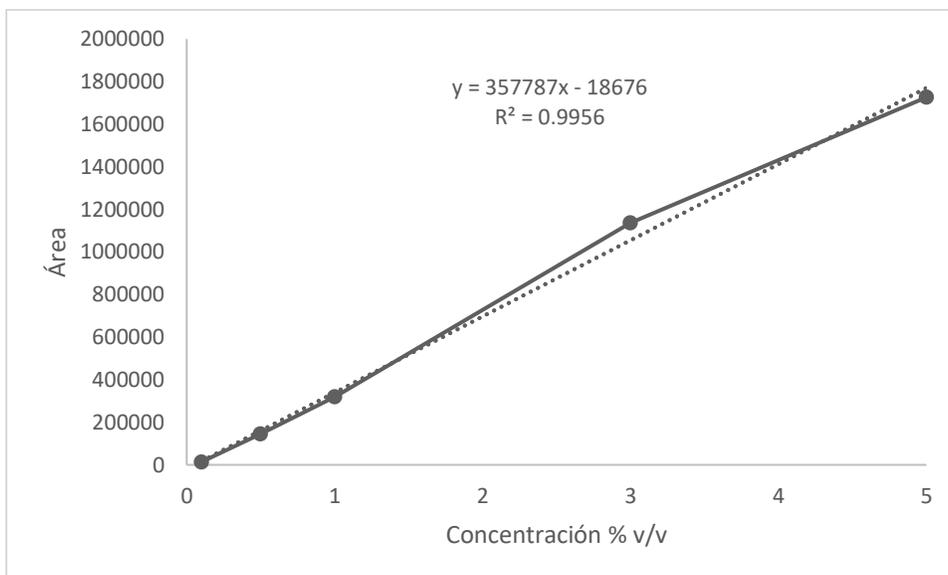


Figura XI. Curva patrón de la concentración en porcentaje v/v del etanol, realizada en el cromatógrafo de líquidos Waters 1525 con un detector de IR (Waters 2414) y con una columna Aminex HPX-87H, 300mm x 7.8 mm (Bio-Rad).

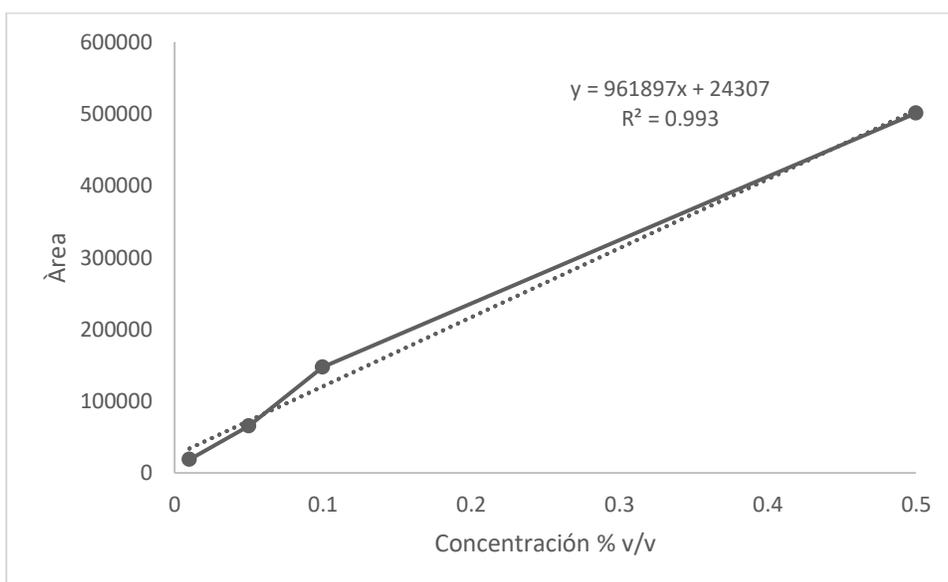


Figura XII. Curva patrón de la concentración en porcentaje v/v del glicerol, realizada en el cromatógrafo de líquidos Waters 1525 con un detector de IR (Waters 2414) y con una columna Aminex HPX-87H, 300mm x 7.8 mm (Bio-Rad).

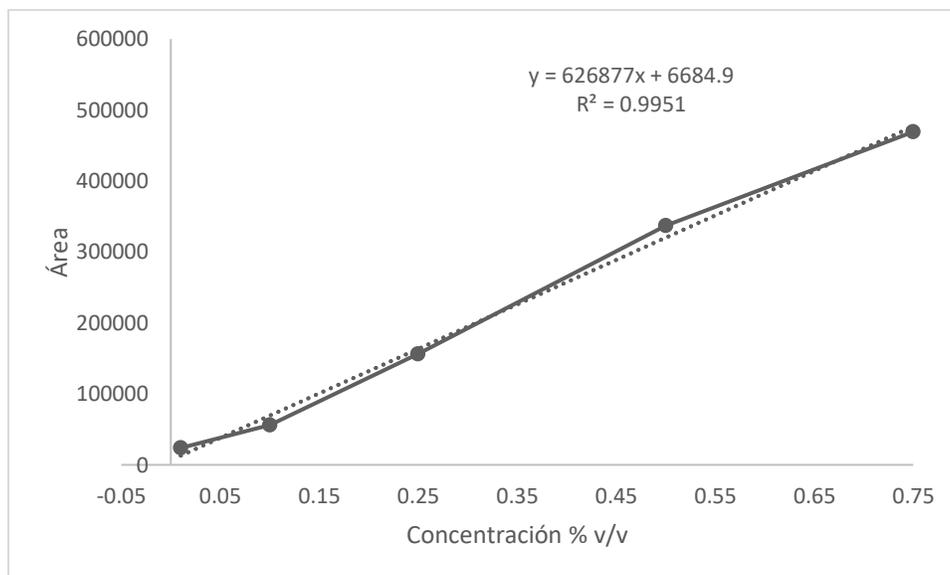


Figura XIII. Curva patrón de la concentración en porcentaje v/v de ácido acético, realizada en el cromatógrafo de líquidos Waters 1525 con un detector de IR (Waters 2414) y con una columna Aminex HPX-87H, 300mm x 7.8 mm (Bio-Rad).

REFERENCIAS

- Aldrete J., Miranda D., Arvizu S. and Hernández M. (2018). Selection of yeast strains for tequila fermentation based on growth dynamics in combined fructose and ethanol media. *J. Food Sci.* 83, 419–423.
- Álvarez F., da Mata F., Macedo T., Fernandes B., Mota F., Ribeiro L., de Miranda I. and Lopes R. (2014). Variable flocculation profiles of yeast strains isolated from Cachaça distilleries. *International Food Microbiol.* 190, 97–104.
- Álvarez L., García A. González Ríos H., Moreno A., De la Torre M., Zamora K. and Acedo E. (2021). Characterization and selection of native yeast isolated from natural fermentation for the production of the artisanal beverage. *Biocencia* 23, 21–27.
- Araque E., Parra C., Rodríguez M., Freer J. and Baeza J. (2008). Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. *Enzyme Microb. Technol.* 43, 120–123.
- Arellano M., Pelayo C., Ramírez J. and Rodríguez (2008). Characterization of kinetic parameters and the formation of volatile compounds during the tequila fermentation by wild yeasts isolated from agave juice. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 835–841.
- Arrizon J. and Gschaedler A. (2002). Increasing fermentation efficiency at high sugar concentrations by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of the tequila fermentation process. *Can. J Microbiol.* 48, 965–970.
- Arrizon J., Fiore C., Acosta G., Romano P. and Gschaedler A. (2006). *Fermentation behaviour and volatile compound production by agave and grape must yeasts in high sugar Agave tequilana and grape must fermentations.* *Antonie van Leeuwenhoek* 89, 181–189.
- Astorga, M. (2008), “Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura”, in A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (Eds.), *FAO Actas de Pesca y Acuicultura*, No. 12, Roma, 277–287.
- Avbelj M., Zupan J., Kranjc L. and Raspor P. (2015). Quorum-sensing kinetics in *Saccharomyces cerevisiae*: A symphony of ARO genes and aromatic alcohols. *Agric. Food Chem.* 63, 8544–8550.

- Basso L., De Amorim H., De Oliveira A. and Lopes M. (2008). Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil *FEMS Yeast Res* 8, 1155–1163
- Belloch C., Barrio E., Uruburu F., García, M. and Querol A. (1997). Characterization of four species of the genus *Kluyveromyces* by mitochondrial DNA restriction analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* 20, 397–408.
- Belloch C. Orlic S., Barrio E. and Querol A. (2008). Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Int. J. Food Microbiol.* 122, 188–195.
- Bendiak D., Van der Aar P., Barbero F., Benzing P., Berndt R., Carrick K., Dull C., Dunn S., González M., Hayashi N., Lawrence D., Miller J., Phare K., Pugh T., Rashel L., Rossmore K., Smart K., Sobczak J., Speers A. and Casey G. (1996). Yeast flocculation by absorbance method. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 54, 245–248.
- Benn S. y Peppard T. (1996). Characterization of Tequila flavor by instrumental and sensory analysis. *Agric. Food Chem.* 44, 557–566.
- Bideaux C., Alfenore S., Cameley X., Molina C., Uribelarrea J. and Guillouet S. (2006). Minimization of glycerol production during the high-performance fed-batch ethanolic fermentation process in *Saccharomyces cerevisiae*, using a metabolic model as a prediction. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2134–2140.
- Boer V., Leg S., Vuralhan Z., Arifin Y., Walsh M., Piper M., De winde J. and Daran J. (2007). Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and non-preferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Res.* 7, 604–620.
- Bongler D. (1994). Taxonomy and phylogeny of *Dasyliirion nolinaceae*. PhD thesis, The University of Texas at Austin. USA. 564–583.
- Bony M., Thines D., Barre P., and Blondin, B., (1997). Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. *J. Bacteriol.* 179, 4929–4936.
- Caldeira M., Rodrigues F., Perestrelo R., Marques J. and Camara, J. (2007). Comparison of two extraction methods for evaluation of volatile constituents patterns in commercial Whiskeys elucidation of the main odour-active compounds. *Talanta* 74, 78–90.
- Callejón M., Morales L., Ferreira S. and Troncoso M. (2008). Defining the typical aroma of sherry vinegar: sensory and chemical approach. *Agric. L. Food Chem.* 56, 8086–8095.

- Cameron J., Loh E. and Davis R. (1979). Evidence for trans-position of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell* 16, 739–751.
- Campos C., Silva C., Dias D., Basso L., Amorim H. and Schwan R. (2010). Features of *Saccharomyces cerevisiae* as a culture starter for the production of the distilled sugar cane beverage, Cachaça in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1871–1879.
- Carmelo V., Bogaerts P. and Sacorreia I. (1996). Activity of plasma membrane H⁺-ATPase and expression of PMA1 and PMA2 genes in *Saccharomyces cerevisiae* cells grown at optimal and low pH. *Arch. Microbiol.* 166, 315–20.
- Casas A. (2014). Diversidad microbiana cultivable y no cultivable durante la fermentación de sotol. Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Coahuila, p. 100.
- Casas A., Aguilar C., De la Garza H., Morlett Ch., Montet D. and Rodríguez R. (2015). *Non-Saccharomyces* yeast importance during fermentation of alcoholic beverages *Inv. Cienc. Univ. Ags.* 65, 73–79.
- Castellucci F. (2011). Molecular tools for identification of *Saccharomyces cerevisiae* Wine yeast and other yeast species related to winemaking. *Resolution OIV-OENO.* 408, 1–7.
- Ceballos S., Jurado J., Martín M. and Pablos F. (2009). Quantitation of twelve metals in Tequila and mezcal spirits as authenticity parameters. *Agric. Food Chem.* 57, 1372–1376.
- Cedrón M. (2004). Estudio analítico de compuestos volátiles en Vino, caracterización quimiométrica de distintas denominaciones de origen. Tesis doctoral. Universidad de Rioja. España 26–34.
- Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. (CIATEJ.) (2014). Manual para la estandarización de los procesos de producción del mezcal Guerrerense. CIATEJ. Guadalajara, Jalisco. México 198p
- Chandler M., Stanley G., Rogers P. and Chambers (2004). A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. Microbiol.* 54, 427–454.
- Chi Z. y Arneborg N. (2000). *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance exhibit different adaptive responses to produced ethanol. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 24, 75–8.

- Christoph N., and Christoph B. (2007). Flavour of spirit drinks: Raw materials, fermentation, distillation, and ageing. *Flavours and Fragrances*, 219–239.
- Contreras R. (2016). Caracterización de compuestos volátiles de sotol artesanal de Aldama y Madera a través de las técnicas de SPME y Headspace. Tesis de licenciatura, Chihuahua, México. 1–103.
- Cray J., Stevenson A., Ball P., Bankar S., Eleutherio E., Ezeji T., Singhal R., Thevelein J., Timson D. and Hallsworth J. (2015). Chaotropicity: a key factor in product tolerance of biofuel-producing microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 33, 228–259.
- Cronquist A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. U.S.A. The New York Botanical Garden. 1243 p.
- Cruz M., Garza H., Aguilar C., Aguilera A., Reyes H., Rutiaga M. and Rodríguez R. (2013). Chemical and molecular properties of sotol plants (*Dasyilirion cedrosanum*) of different sex and its fermentation products. *Int. J. Basic Appl. Chem. Sci.* 3, 41–49.
- Cruz M., Rodríguez R., Aguilar C., De la Garza H. y Aguilera A. (2007). Caracterización fisicoquímica de las plantas de diferente sexo de sotol. Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Universidad Autónoma de Coahuila.
- Cruz M., De la Garza H., Aguilar C and Rodríguez R. (2008). sotol a liqueur with a great past but with a better future. In Thangadurai D, Tripathi L, Vasanthaiah HKN, Jasso-Cantu D. Crop Improvement and Biotechnology. Bioscience Publications Krishnagiri TN, India, pp 119-128
- De la Garza H., Martínez L., Rodríguez R. and Rodríguez J. (2008). Production of a Mexican alcoholic beverage: sotol. *J. Biol. Sci.* 3, 556–571.
- De Souza A., Vicente A., Klein C., Fietto G., Coutrim X., De Cássia J., Dias L., Alves P., Maduro L., Miranda I. and Brandão, R. (2011). Strategies to select yeast starters cultures for production of flavor compounds in Cachaça fermentations. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101, 379–392.
- Delfini C. and Cervetti F. (1991). Metabolic and technological factors affecting acetic acid production by yeasts during alcoholic fermentation. *Vitic. Enol. Sci.* 46, 142–150.

- Delgado A., Herrera E., Arrizon J., Arellano M. and Gschaedler, A. (2013). Performance evaluation of *Pichia kluyveri*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in industrial Tequila fermentation. *World J. Microbiol. and Biotechnol.* 29, 875–881.
- Dengis P., Nellisen L. and Rouxhet P. (1995). Mechanisms of yeast flocculation: Comparison of top and bottom fermenting strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 718–728.
- Deparis Q., Claes A., Foulquie M. and Thevelein J. (2017). Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories. *FEMS Yeast Res.* 17, 1–35.
- Ding J., Huang X., Zhang L., Zhao N., Yang D. and Zhang K. (2009). Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 253–263.
- Doğan A., Demirci S., Aytakin A. and Şahin F. (2014). Improvements of tolerance to stress conditions by genetic engineering in *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 174, 28–42.
- Domínguez M. (2006). Aislar, identificar y clasificar las levaduras de la fermentación alcohólica del sotol (*Dasytirion ssp.*). Tesis. P. 17.
- Dzialo M., Park P., Steensels J., Lievens B. y Verstrepen K. (2017). Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, S95–S128.
- Engan S. (1972). Wort composition and beer flavour II: The influence of different carbohydrates on the formation of some flavour components during fermentation. *J. Inst. Brew.* 78, 169–173.
- Erasmus D., Cliff M. and Van Vuuren H. (2004). Impact of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol, and the sensory attributes of icewine *Am. J. Enol. Vitic.* 55, 371–378.
- Esteve B., Belloch C., Uruburu F. and Querol A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 329–37.
- Fernández M., Esteve B., Querol A. and Barrio, E. (2000). RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78, 87–97.

- Ferreira V., Ortín N., Escudero A., López R. and Cacho J. (2002). Chemical characterization of the aroma of grenache Rosé Wines: Aroma extract dilution analysis, quantitative determination, and sensory reconstitution studies. *Agric. Food Chem.* 50, 4048–4054.
- Field D. y Wills C. (1998). Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1647–1652.
- Fiore, C., Arrizon, J., Gschaedler, A. and Romano P. (2005). Comparison between yeasts from grape and *Agave* musts for traits of technological interest. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 1141–1147.
- Flanzy F. (2003). *Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. 2 ed., España: Mundi-Prensa, 699.
- Flecher E., Feizi A., Bisschops M., Hallström B., Khoomrung S., Siewers V. and Nilsen J. (2017). Evolutionary engineering reveals divergent paths when yeast is adapted to different acidic environments. *Metab. Eng.* 39, 19–28.
- Folch M., Garay A., Lledías F. y Covarrubias A. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 46, 24–46.
- García D. (2010). Aislamiento de microorganismos probióticos a partir de bebidas fermentadas: Aguamiel, Pozol y sotol. Universidad Autónoma Agraria Saltillo, México. 1–96.
- Gallone B., Steensels J., Prah T., Soriaga L., Saels V., Herrera B., Merlevede A., Roncoroni M., Voordeckers K., Miraglia L, Teiling C., Steffy B., Taylor M., Schwartz A., Richardson T., White C. Baele G., Maer S. and Verstrepen K. (2016). Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer yeasts. *Cell* 166, 1397–1410.
- Gibson B., Stephen J., Leclaire J., Powell C. and Smart K. (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling, *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 535–569.
- González A., Jubany S., Carrau F. and Caggero C., (2001). Differentiation of industrial Wine yeast strains using microsatellite markers. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 71–75.
- González I. and Cook D. (2016). The impact of maturation on concentrations of key odour active compounds which determine the aroma of Tequila. *J. Inst. Brew.* 122, 369–380.

- Goossens K. and Willaert R. (2010). Flocculation protein structure and cell–cell adhesion mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Letters*, 32, 1571–1585.
- Guillamón J., Sabaté J., Barrio E., Cano J. and Querol, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal ITS regions. *Arch. Microbiol.* 169, 387–392.
- Guimaraes T. Moriel D., Manchado L., Fadel C. and Bonfim T. (2006). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains of winery interest. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 42, 120–126.
- Gutiérrez M., Acedo E. and Valenzuela A. (2007). Bacanora industry and its process of production. *Cienc. y Tecno. Alimentaria* 5, 394–404
- Hazelwood L., Daran J., Van Maris A., Pronk J. and Dickinson R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Appl. Environ. Microb.* 74, 2259–2266.
- Henderson C. y Block D. (2014). Examining the role of membrane lipid composition in determining the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microb.* 80, 2966–72.
- Hennenquin C., Thierry A., Richard G., Lecointre G., Nguyen C., Gaillardin C. and Dujon B. (2001). microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Clin. Microbiol.* 39, 551–559.
- Henschke P. and Jiranek V. (1993). Yeasts metabolism of nitrogen compounds. In wine microbiology and biotechnology. Fleet GH (Ed.), Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland pp. 77–164.
- Hernández A. (2008). Caracterización morfológica, anatómica e histológica de sotol (*Dasyilirion cedrosanum*). Tesis Ingeniero en Agrobiología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila.
- Hernández A., Alfaro I. y Arrieta R. (2003). Microbiología industrial. *EUNED. Costa Rica.* 111–117.

- Hernández E., Chávez M. and González J. (2016). Review of *Agave* and mezcal. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 18, 148–164.
- Hirst M. and Richter Ch. (2016). Review of aroma formation through metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in beverage fermentations *Am. J. Enol. Vitic.* 67, 361–370
- Huffer S., Clark M., Ning J., Blanch H. and Clark D. (2011). Role of alcohols in growth, lipid composition, and membrane fluidity of yeasts, bacteria, and archaea. *Appl. Environ. Microb.* 77, 6400–8.
- Ibáñez C., Pérez R., Chiva R., Guillamón J, Barrio E., and Querol, A. (2014). Comparative genomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from fermentations of traditional beverages unveils different adaptive strategies. *Int. J. Food Microbiol.* 171, 129–135.
- IMPI (2002). Instituto Mexicano de protección de la industria. Declaración de la denominación de origen del sotol.
- Ingram L. and Buttke T. (1984). Effects of alcohols on microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* 25, 253–300.
- Jin Y. and Speers A. (200). Effect of environmental conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 58, 108–116.
- Jolly N., Augustyn O. and Pretorius I. (2003). The effect of *Non-Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 24, 55–62.
- Kapteyn J., Ter B., Vink E., Bland S. De nobel H., Van Den Ende H. and Klis F. (2001). Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol. Microbiol.* 39, 469–479.
- Kłosowski G., and Czupryński B. (2006) Kinetics of acetals and esters formation during alcoholic fermentation of various starchy raw materials with application of yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Food Eng.* 72, 242–246.

- Lacerda C., Ferreira W., Freire A., Ribeiro D., Araújo E. and Freitas R. (2013). Evaluation of stress tolerance and fermentative behavior of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* Brazilian. *J. Microbiol.* *44*, 935–944.
- Lachenmeier D., Sohnius E, Attig R. y López M. (2006). Quantification of selected volatile constituents and anions in mexican *Agave* spirits (tequila, mezcal, sotol, bacanora). *Agric. Food Chem.* *54*, 3911–3915.
- Lamas R., Sandoval G., Osuna A., Prado R. y Gschaedler A. (2004). Cocimiento y molienda, ciencia y tecnología del tequila; avances y perspectivas. Logiprint digital, Jalisco, México p. 41–50.
- Lamikanra O., Grimm C. and Inyang D. (1996). Formation and occurrence of flavor components in Noble muscadine wine. *Food Chem.* *56*, 373–376.
- Lappe O., Moreno R., Arrizo J., Herrera T., García A. and Gschaedler A. (2008). Yeast associated with the production of Mexican alcoholic and distilled *Agave* beverages. *Yeast Res.* *8*, 1037–1052.
- Leao C., and Van Uden N. (1984). Effects of ethanol and other alkanols on passive protoninflux in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* *774*, 43–48.
- Lee S., Villa K. and Patino H. (1995). Yeast strain development for enhanced production of desirable alcohols/esters in beer. *J. Am. Sot. Brew. Chem.* *53*, 153–156.
- Legras J. and Karst F. (2003). Optimisation of interdelta for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. *FEMS Microbiol. Lett.* *221*, 249–255.
- Legras J., Ruh O., Merdinoglu D. and Karst F. (2005). Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int. J. Food Microbiol.* *102*, 73–83.
- Libkind D. (2007). Evaluación de la técnica de MSP-PCR para la caracterización molecular de aislamientos de *Rhodotorula mucilaginosa* provenientes de la Patagonia noroccidental. *Rev. Argentina de Microbiol.* *39*, 133–137.
- Liti G., Carter M., Moses M., Warringer J., Parts L., James A. and Louis J. (2009). Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature* *458*, 337–341.

- Liu X., Jia B., Sun X., Ai J., Wang L., Wang C., Zhao F., Zhan J. and Huang W. (2015). Effect of initial pH on growth characteristics and fermentation properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Inst. of Food Technologists*, 1–9.
- Lopes A., Rodríguez M., Sangorrin Querol A. and Caballero A. (2007). Patagonian wines: The selection of an indigenous yeast starter. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 539–546.
- López L. (2005). El sotol en Coahuila, potencialidades y limitaciones en bebidas y regiones. Historia e impacto de la cultura etílica en México. Universidad Autónoma Agraria, Antonio Narro. Universidad Autónoma de Yucatán. Editorial. Consejo para la cultura y las artes de Nuevo León. México 63–84.
- López M. y Guevara S. (2001). Tequila, mezcal y sotol: volátiles marcadores de origen y planta (especie de *Agave*). *Investigación y Ciencia* 24, 28–32.
- López M., Mancilla N. and Mendoza G. (2003). Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. *Azul*. *Agric. Food Chem.* 51, 7835–7840.
- López M. 1999. Tequila aroma, En: Shaidi, F. Ho, J.C. (eds.). Flavor chemistry of ethnic foods. Plenum, New York. 211–217.
- López R. (2016). Caracterización de compuestos volátiles de sotol artesanal de Aldama y Madera a través de las técnicas de SPME y Headspace. Tesis de licenciatura. Chih. México p 103.
- Loviso C. and Libkind D. (2019). Síntesis y regulación de los compuestos del aroma y sabor derivados de la levadura en la cerveza: alcoholes superiores. *Rev. Argent. Microbiol.* 1–12.
- Madeira A., Leitao L., Soveral G., Díaz P., Prista C., Moura T. and Loureiro C. (2010). Effect of ethanol on fluxes of water and protons across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 10, 252–258.
- Magasanik B. and Kaiser C. (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290, 1–18.
- Mallouchos A., Skandamis P., Loukatos M., Koutinas A. and Kanellaki M. (2003). Volatile compounds of Wines produced by cells immobilized on grape skins. *Agric. Food Chem.* 51, 3060–3066.

- Mancilla N. and López, M. (2002). Generation of Maillard compounds from inulin during the thermal processing of *Agave tequilana* Weber Var. Azul. *Agric. Food Chem.* 50, 806–812.
- Mancilla N. and López, M. (2006). Water soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyilirion* species. *Agric. Food Chem.* 54, 7832–7839.
- Manginot C., Roustan J. y Sablayrolles J. (1998). Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of stationary phase. *Enzyme Microbiol. Tech.* 23, 511–517.
- Mansure J., Panek D., Crowe M. and Crowe J. (1994). Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1191, 309–316.
- Marais J. (1983) Terpenes in the aroma of grapes and wines: A review, *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 4, 49–60
- Martín del campo S., Gómez H., Gutiérrez H., Escalona H., Estarrona M. y Cosío R. (2011). Volatile composition of Tequila. Evaluation of three extraction methods. *CyTA, J. Food* 9, 152–159.
- Martínez P. (2014). Evaluación de la tolerancia a diversas condiciones de estrés y determinación de las diferencias a nivel molecular de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de palenques de mexcal en el estado de Oaxaca. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. México, D.F. 35–39.
- Mas A., Beltrán G., Sancho M., Gutiérrez a., Chiva R. y Guillamón J. (2013). Metabolismo nitrogenado de *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación vínica. *SEEBM.* 176, 9–13.
- Matsheka J. Zappe H. and Elisha B. (2006). The use of (GTG)₅ oligonucleotide as a RAPD primer to type *Campylobacter concisus*. *Appl. Microbiol.* 42, 600–605.
- Mejía A., Montoya R., Cortés C. y Saavedra A. (2016). Levaduras termotolerantes: aplicaciones industriales, estrés oxidativo. *CIT* 27, 3–16.
- Mercado L., Dalcero A., Masuelli R. and Combina M. (2007). Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: analysis of their contribution to fermentative flora of

Malbec Wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiol.* 24, 403–412.

Miki B., Poon N., James A. y Seligry V. (1980). Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of cell-cell interactions. In Stewart, G. G. and Russell, I. (Eds), current developments in yeast research. Pergamon press Canada Ltd, Toronto.

Miki B., Poon N., James A. and Seligry V. (1982). Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 150, 878–889.

Miles A y Misra S. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hygiene* 38, 732–749.

Miranda D., Ortiz E., Arvizu S., Ramiro J., Aldrete J. and Martínez R. (2015). Isolation, selection and identification of native *Saccharomyces spp.* yeasts from vineyards in Queretaro, Mexico. *Agro.* 49, 759–773.

Modig T., Liden G. and Taherzadeh J. (2002). Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochem, J.* 363, 769–776.

Molina J., Botello J., Estrada A., Navarrete J., Jiménez H., Cárdenas M. y Rico R. (2007). Compuestos volátiles en el mezcal. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 6, 41–50.

Mosedale J. and Puech L. (1998) Wood maturation of distilled beverages, *Trends Food Sci. Technol.* 9, 95–101.

Munna M., Humayun S. and Noor R. (2015). Influence of heat shock and osmotic stresses on the growth and viability of *Saccharomyces cerevisiae* SUBSC01. *BMC Res. notes* 8, 1–8.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Benzyl thiocyanate, CID=18170, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzyl-thiocyanate> (accessed on Dec. 16, 2019).

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Carvone, CID=7439, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carvone> (accessed on Dec. 16, 2019)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Decanal, CID=8175, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Decanal> (accessed on Dec. 16, 2019)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 2-Ethyl-4-methylpentan-1-ol, CID=7821, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Ethyl-4-methylpentan-1-ol> (accessed on Dec. 16, 2019).

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 4-Methyl-2-propyl-1-pentanol, CID=103862, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Methyl-2-propyl-1-pentanol> (accessed on Dec. 16, 2019)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 5-Methyl-1-hexanol, CID=12331, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-Methyl-1-hexanol> (accessed on Dec. 16, 2019).

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 3-Mercapto-1-hexanol, CID=521348, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3-Mercapto-1-hexanol> (accessed on Dec. 16, 2019).

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Methylbenzene-d5, CID=11815823, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methylbenzene-d5> (accessed on July 18, 2020)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Sabinene CID=18818, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/sabinene> (accessed on Dec. 16, 2019).

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Phenol, CID=996, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenol> (accessed on July 18, 2020).

National Institute Standards Technology, Database Benzyl methyl ketone acceso 16 de diciembre, 2019 en <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=103-79-7>

Ness F., Lavallée F., Dubordieu D., Aigle M. and Dulau L. (1993). Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J. Sci. Food Agric.* 62, 88–94.

Nordstriim K. (1963). Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast IV: metabolism of acetyl coenzyme A. *J. Inst. Brew.*, 69, 142–153.

Nordstriim K. (1964). Formation of esters from alcohols by brewer's yeast. *J. Inst. Brew.*, 70, 328–336.

- Norma Oficial Mexicana. (2004). NOM-159-SCFI-2004. Bebidas alcohólicas sotol. Especificaciones y Métodos de Prueba. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial, 1–29.
- Peña A., Sánchez N., Álvarez H., Calahorra M. y Ramírez J. (2015). Effects of high medium pH on growth, metabolism and transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Res.* 15, 1–13.
- Pérez M., Gallego F., Martínez I. and Hidalgo P. (2001b). Detection and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 461–466.
- Pham T., Wimalasena T., Box W, Koivuranta K., Storgårds E., Smart A. y Gibson B. (2011). Evaluation of ITS PCR and RFLP for differentiation and identification of brewing yeast and brewery “wild” yeast contaminants. *J Inst. Brew.* 117, 556–568.
- Piper W. (1995). The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol. Lett.* 134, 121–127.
- Piper W., Talreja K., Panaretou B., Modres P., Byrne K., Praekelt M., Mea P. Recnacq M. and Boucherie H. (1994). Induction of major heat-shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical threshold. *Microbiol.* 140, 3031–3038.
- Pires E., Teixeira J., Brányik T. and Vicente A. (2014). Yeast: the soul of beer’s aroma: a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 1937–1949.
- Prado N., Estarrón M., Escalona H., Cosío R. and Martín S. (2015) Volatile compounds generation during different stages of the Tequila production process. A preliminary study, *LWT- Food Sci. Technol.* 61, 471–483.
- Pretorius I. (2000). Tailoring Wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675–729.
- Querol A., Barrio E., Huerta T. and Ramon D. (1992) Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2948–2953.

- Querol A., Fernández M., Del Olmo M. and Barrio E. (2003). Adaptive evolution of wine yeast. *Int. J. of Food Microbiol.* 86, 3–10.
- Ramírez M., Camargo D., Inostrosa M. and Valente P. (2014). (GTG)₅ MSP-PCR fingerprinting as a technique for discrimination of Wine associated yeasts? *Plos one* 9, 1–9.
- Ramírez N. y Torres J. (2016). Caracterización molecular de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* empleadas en la producción de tequila. Jóvenes en la ciencia, *Rev. Divulg. Cient.* 2, 485–489.
- Remize F., Andrieu E. and Dequin S. (2000). Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae*: Role of the cytosolic Mg(2+) and mitochondrial K(+) acetaldehyde dehydrogenases Ald6p and Ald4p in acetate formation during alcoholic fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3151–3159.
- Remize F., Roustan, Sablayrolles J., Barre P. and Dequin S. (1999). Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in byproduct formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 143–149.
- Reyes E., Martínez C. y De Jesús F. (2021). Aislamiento, selección y caracterización de la cinética fermentativa de *Saccharomyces* (IT0YISV001) obtenida de mostos de fermentación del proceso de producción de mezcal artesanal de Oaxaca. *Frontera Biotecnológica* 19, 4–8.
- Reyes H. Palacios R., Rivas E., Robledo A., Bautista A., Valdes C., Villarreal J. and Benavides A. (2019). The sustainability of Mexican traditional beverage sotol: ecological, historical, and technical issues chapter 4. Engineering approach in beverage industry. Engineering tools in the beverage industry. Woodhead Publishing 1–25.
- Reyes H., Benavides A., Ramírez H. y Villareal J., (2012a). Biología e importancia del sotol (*Dasyliirion spp*). Parte I: Sistemática, genética y reproducción. *Planta* 14, 11–13.
- Reyes H., Benavides A., Ramírez H. y Villareal J., (2012b). Biología e importancia del sotol (*Dasyliirion spp*). parte II: Ecofisiología, usos e interrogantes *Planta* 17, 16–20.

- Rojas V., Gil J., Piñaga F. and Manzanares P. (2001). Studies on acetate ester production by *non-Saccharomyces* Wine yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 283–289.
- Sánchez A. and Hope H. (1953). Agave juice, fermentation and chemical composition studies of some species. *J. Agric. Food Chem.* 1, 246–249.
- Saerens S., Delvaux F., Verstrepen K. and Thevelein J. (2010). Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Biotechnol* 3, 165–177.
- Sajbidor J. and Grego J. (1992). Fatty acid alterations in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ethanol stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 93, 13–16.
- Schwan R., Mendonça A., Da Silva J., Rodrigues V. and Wheals A. (2001) Microbiology and physiology of Cachaça (aguardente) fermentations. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79, 89–96.
- Segura L. Taillandier P., Brandam C. and Gschaedler A. (2014). Fermentative capacity of *Saccharomyces* and *non-Saccharomyces* in Agave juice and semi-synthetic médium. *J Food Sci Technol.* 1–8.
- Segura L., Kirchmayr M., Flores E. and Gschaedler A. (2010). PCR-RFLP of the ITS-5.8S regions as an identification tool for yeasts: advantages and disadvantages. *E-genosis* 8, 1–12.
- Serjeant K., Tang R., Anfang N., Beggs J. and Goddard M. (2008). Yeasts associated with the New Zealand nothofagus honeydew system. *NZ J. Ecol.* 32, 209–213.
- Sierra J., Lara C., Carrillo R., Melgoza A., Morales C. y Royo M. (2008). Los sotoles (*Dasyilirion spp.*) de Chihuahua. Folleto Técnico 20 INIFAP-CIRNOC. México. 58 p.
- Silva E., Da Santos S., Do Monte A., Falcao M., De Morais M. and Ardaillon D. (2005). Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie Van Leeuwenhoek* 88, 13–23.
- Singer M., and Lindquist S. (1998). Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: The yin and yang of trehalose. *Trends Biotechnol.* 16, 460–468.
- Soares E. (2010). Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a Review. *J. Appl. Microbiol.* 110, 1–18.

- Steensels J., Snoek T., Meersman E., Picca M., Voordeckers K. and Verstrepen K. (2014). Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 947–995.
- Stewart G. and Russell I. (1981) Yeast flocculation. In: Pollock, J.R.A. (eds). *Brewing Science*. Academic Presspp, Toronto, 61–92.
- Stratford M. (1989). Yeast flocculation: calcium specificity. *Yeast* 5, 487–496.
- Stratford M. and Assinder S. (1991). Yeast flocculation: Flo1 and NewFlo phenotypes and receptor structure. *Yeast* 7, 559–574.
- Styger G., Prior B. and Bauer F. (2011). Wine flavor and aroma. *J Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38,1145–1159.
- Swiegers H., Francis I., Herderich M. and Pretorius I. (2006). Meeting the consumer expectations through management in vineyard and winery the choice of yeast for fermentation offers a great potential to adjust the aroma of Sauvignon Blanc Wine. *Wine Ind. J.* 21, 34–42.
- Takagi H., Takaoka M., and Kawaguchi A. (2005). Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8656–62.
- Tamas M and Hohman S. (2003). Chapter 4. The osmotic stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Stress Responses*. (Ed.) Springer p. 121–200.
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17,6463–6471.
- Taylor N. and Orton W. (1978). Aromatic compounds and sugars in flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.* 84, 113–114.
- Téllez P. y Cedeño M. 1997. El Tequila y su elaboración. *Biotecnología*.2, 55–63.
- Teunissen A., Holub E., Van Der Hucht, J., Van Den Berg, J. and Steensma H. (1993). Sequence of the open reading frame of the FL01 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 9, 423–427.
- Thomas S., Hossack J. and Rose H. (1978). Plasma membrane lipid composition and ethanol tolerance. *Arch. Microbiol.* 117, 239–245.

- Torija J., Beltran G., Novo M., Poblet M., Guillamón J., Mas A. and Rozés N. (2003). Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *Int. J. Food Microbiol.* 85, 127–136.
- Ulloa J., Espinosa H., Cruz G., Ulloa P., Ulloa R. y Ramírez J. (2010). Los fructanos y su papel en la promoción de la salud. *Rev. Fuente.* 2, 57–62.
- Vallejo J., Sánchez A., Martínez J. and Villa T. (2013). Cell aggregations in yeasts and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 2305–2318.
- Vaudano E. and García E. (2008). Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis. *Food Microbiol.* 25, 56–64.
- Vaughan M. and Martini A. (1995). Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *J. Ind. Microbiol.* 14, 514–522.
- Vázquez J., Ramírez M. y Monsalve Z. (2016). Actualización en caracterización molecular de levaduras de interés industrial. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 18, 129–139.
- Vázquez P. and Rodríguez M. (2012). Chapter 15. Tequila processing and flavor. flavor chemistry of Wine and other alcoholic beverages. (Ed.) American Chem. S., USA. 237–276.
- Vera A., Santiago P. and López M. (2009). Aromatic volatile compounds generated during mezcal production from *Agave angustifolia* and *Agave potatorum* *Rev. Fitotec. Mex.* 32, 273–279.
- Verstrepen K, Derdelinckx G., Dufour J., Winderickx J., Thevelein J., Pretorius I. and Delvaux F. (2003a). Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer. *J. Biosci. Bioeng.* 96, 110–118.
- Verstrepen K., Iserentant D., Malcoprs P., Derdelinckx G., Van Djick P., Winderickx J. Pretorius I., Thevelein J., and Delvaux F. (2004). Glucose and sucrose: Hazardous fast food for industrial yeast? *Trends Biotechnol.* 22, 531–537.
- Verstrepen K., Moonjai N., Derdelinckx G., Dufour J., Winderickx J., Thevelein J., Pretorius S. and Delvaux F. (2003b). Genetic regulation of ester synthesis in brewer's yeast: new facts, insights and implications for the brewer. In Smart, K. (Ed.), *Brewing yeast fermentation performance*, 2nd ed. Blackwell Science, Oxford, UK. p. 234–248.

- Viana F., Gil J., Genovés S., Vallés S. and Manzanares P. (2008). Rational selection of non-*Saccharomyces* Wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiol.* 25, 778–785.
- Waleckx E., Gschaedler A., Colonna B. and Monsan, P. (2008). Hydrolysis of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul during the cooking step in a traditional Tequila elaboration process. *Food Chemistry*, 108, 40–48.
- Walker G. (1998). *Yeast Physiology and Biotechnology*. (Ed.) John Wiley and Sons Ltd. West Sussex, England 362
- Walker G. and Basso T. (2019). Mitigating stress in industrial yeasts. *Fungal Biology*, 1–11.
- Walker G. and Walker R. (2018). *Advances in Applied Microbiology*, Chapter 3. Enhancing yeast alcoholic fermentations. (Ed.) Gadd G. and Sima Sariaslani. 105, 1–226.
- Welke J., Zanús M., Lazzarotto M. and Zini C. (2014). Quantitative analysis of headspace volatile compounds using comprehensive two-dimensional gas chromatography and their contribution to the aroma of Chardonnay wine. *Food Res. Int.* 59, 85–96.
- Willaert R. (2007). The beer brewing process: wort production and beer fermentation. In: Hui YN (Ed.) *Handbook of food products manufacturing*. Wiley, Hoboken, New Jersey, 443–506
- Yalcin S. and Ozbas Z. (2008). Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* from Turkey. *Brazilian J. Microbiol* 39, 325–332.
- Yoshimoto H., Fukushige T., Yonezawa T. and Sone H. (2002). Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 501–508.
- Yoshioka K. and Hashimoto N. (1984). Acetyl-CoA of brewer's yeast and formation of acetate esters. *Agric. Biol. Chem.* 48, 207–209.
- You K., Rosenfield C. and Knipple D. (2003). Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1499–503.

- Younis O. and Stewart G. (1998). Sugar uptake and subsequent ester and higher alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.* 104, 255–264.
- Younis, O. and Stewart G. (1999). The effect of malt wort, very high gravity malt wort and very high gravity adjunct wort on volatile production in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 57, 39–45.
- Zhu H., Zhu J., Wang L., and Li Z. (2015). Development of a SPME-GC-MS method for the determination of volatile compounds in Shanxi aged vinegar and its analytical characterization by aroma wheel. *J. Food Sci. Technol.* 53, 171–183.
- Zhao X. and Bai F. (2009) Mechanisms of yeast stress tolerance and Its manipulation for efficient fuel ethanol production. *Biotechnol.* 144, 23–30.