



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**“AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y
BIOQUÍMICA DEL CONSORCIO MICROBIANO ASOCIADO A
LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA PARA LA PRODUCCIÓN
DE MEZCAL EN MICHOACÁN”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

PRESENTA:

IBQ. ROSA MARÍA DAMIÁN ROBLES

ASESOR: D. C. CARLOS CORTÉS PENAGOS

CO-ASESOR: D. C. MA. DEL CARMEN CHÁVEZ PARGA

MORELIA, MICHOACÁN

MARZO, 2012

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. GENERALIDADES.....	5
1.2. AGAVE.....	6
1.2.1. CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO AGAVE.....	7
1.2.2. DESCRIPCIÓN.....	7
1.2.3. USOS Y APLICACIONES	9
1.3. MEZCAL	10
1.3.1. PROCESO DE ELABORACIÓN	11
1.3.1.1. RECOLECCIÓN	11
1.3.1.2. COCCIÓN	11
1.3.1.3. MOLIENDA.....	12
1.3.1.4. FERMENTACIÓN.....	13
1.3.1.5. DESTILACIÓN	15
1.3.1.6. REFINACIÓN.....	16
1.3.1.7. COMPOSICIÓN	16
1.3.1.8. MADURACIÓN	17
1.3.1.9. ENVASADO	17
1.4. CLASIFICACIÓN DEL MEZCAL	17
1.5. TIPOS DE MEZCAL	18
1.6. DENOMINACIÓN DE ORIGEN	19
1.6.1. LA DENOMINACIÓN DE ORIGEN EN MICHOACÁN.....	20
1.6.2. MARCO NORMATIVO.....	20
1.6.2.1. INDUSTRIA DEL MEZCAL Y SU NORMATIVIDAD.....	20
1.6.2.2. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-070-SCFI-94	21
1.6.2.3. ESPECIFICACIONES	21
2. MARCO TEÓRICO	22

2.1	CULTIVOS PUROS Y MIXTOS	22
2.2.	CONSORCIOS MICROBIANOS.....	23
2.3.	AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.....	24
2.4.	LEVADURAS.....	24
2.4.1.	CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS LEVADURAS	25
2.4.2.	LEVADURAS DE IMPORTANCIA INDUSTRIAL.....	26
2.4.3.	GÉNERO <i>Saccharomyces</i>	27
2.5.	IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS	27
2.5.1.	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LEVADURAS	28
2.5.2.	MÉTODOS CLÁSICOS DE IDENTIFICACIÓN.....	29
2.5.2.1.	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN A NIVEL ESPECIE.....	30
2.5.2.2.	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN A NIVEL CEPA	30
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
4.	JUSTIFICACIÓN.....	33
5.	HIPÓTESIS	34
6.	OBJETIVOS.....	34
6.1.	OBJETIVO GENERAL	34
6.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
7.	MATERIALES Y METODOS	35
7.1	MATERIALES.....	35
7.1.1	MATERIA PRIMA	35
7.1.2	EXTRACTO.....	35
7.1.3	MEDIOS DE AISLAMIENTO Y SELECCIÓN	36
7.1.4	ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.....	38
7.2	MÉTODOS EXPERIMENTALES	40
7.2.1	AISLAMIENTO. OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y CULTIVOS	40
7.2.2	ANÁLISIS MACROSCÓPICO Y MICROSCÓPICO BAJO CRITERIOS MORFOLOGICOS.	41
7.2.3	ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE LAS LEVADURAS AISLADAS.....	42
7.2.3.1	AISLAMIENTO DE DNA GENÓMICO	42

7.2.3.2	CUANTIFICACIÓN	44
7.2.3.3	ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	44
7.2.4	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	44
7.2.4.1	PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)	44
	GEL PARA VISUALIZACIÓN DEL AMPLIFICADO	45
7.2.4.2	DIGESTIONES CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	46
7.2.5	CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.....	46
7.2.5.1	PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE LABORATORIO.	46
7.2.5.2	PRUEBAS BIOQUÍMICAS ESTANDARIZADAS (SISTEMA API)	47
7.2.5.3	BIOLOG.....	48
8.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	49
8.1.	SITIO DE ORIGEN, MUESTREO Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	49
8.2.	AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.....	50
8.3.	ANÁLISIS MACROSCÓPICO Y MICROSCÓPICO DEL CONSORCIO MICROBIANO.	52
8.4.	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS LEVADURAS AISLADAS.....	64
8.4.1.	EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	65
8.4.2.	TAMAÑOS DE PRODUCTOS DE PCR	66
8.4.3.	PERFILES GERERADOS CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	67
8.5.	CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.....	76
8.5.1	ANALISIS BASADOS EN EL EMPLEO DE SISTEMAS API (20C AUX,NE,E). 76	
8.5.2	ANALISIS BASADOS EN EL EMPLEO DEL EQUIPO BIOLOG.....	78
9.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	80
9.1.	CONCLUSIONES	80
9.2.	RECOMENDACIONES	81
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Agave cupreata de la región de Etúcuaro, Mich.	7
Figura 2. Hojas de Agave cupreata.	8
Figura 3. Quiote del Agave.	8
Figura 4. Semilla de Agave cupreata.	9
Figura 5. Horno utilizado para la cocción de las piñas de Agave.	12
Figura 6. Piña de Agave cocida y triturada.	13
Figura 7. Reposado de mezcal en barricas de roble.	17
Figura 8. Estados comprendidos por la Denominación de Origen.	19
Figura 9. Región del gen rRNA amplificado por PCR con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4.	45
Figura 10. Metodología empleada en el uso del BIOLOG.	48
Figura 11. Sustratos de la placa YT para el BIOLOG.	49
Figura 12. Inoculación a) en placa de la muestra del agave. b) En placa de los fermentos de las ME1, ME2 y ME3.	50
Figura 13. Aislamiento del consorcio microbiano asoc. a la fermentación alcohólica.	51
Figura 14. Cultivos puros de levaduras en medio enriquecido YPD.(a) <i>Lev1</i> ME1, (b) <i>Lev 2</i> ME1, (c) <i>Lev 5</i> ME1(d) <i>Lev 8</i> ME1.	52
Figura 15. Cultivos puros de levaduras en medio enriquecido YPD, 48 h, 30°C.(a) <i>Lev 3</i> ME2, (b) <i>Lev 6</i> ME2, (c) <i>Lev 9</i> ME2(d) <i>Lev 11</i> ME2.	52
Figura 16. Cultivos puros de levaduras en medio enriquecido YPD, 48 h, 30°C.(a) <i>Lev 4</i> ME3, (b) <i>Lev 7</i> ME3, (c) <i>Lev 10</i> ME3(d) <i>Lev12</i> ME3.	53
Figura 17. Observación microscópica la levadura 1 ME1. a) 40 X, b) 100 X.	54
Figura 18. Observación microscópica la levadura 2 ME1. a) 40 X, b) 100 X.	54
Figura 19. Observación microscópica la levadura 5 ME1. a) 40 X, b) 100 X.	55
Figura 20. Observación microscópica la levadura 8 ME1. a) 40 X, b) 100 X.	55
Figura 21. Observación microscópica la levadura 3 ME2. a) 40 X, b) 100 X.	56
Figura 22. Observación microscópica la levadura 6 ME2 . a) 40 X, b) 100 X.	56
Figura 23. Observación microscópica la levadura 9 ME2. a) 100 X, b) 40 X.	57
Figura 24. Observación microscópica la levadura 11 ME2. a) 100 X, b) 40 X.	57
Figura 25. Observación microscópica de la levadura 4 ME3. a) 100 X, b) 40X.	58
Figura 26. Observación microscópica de la levadura 7 ME3. a) 100 X, b) 40 X.	58
Figura 27. Observación microscópica de la levadura 10 ME3. a) 100 X, b) 40 X.	59
Figura 28. Observación microscópica de la levadura 12 ME3. A) 100X, b) 40X.	59
Figura 29. . Cultivos puros de levaduras en medio Biggy. (a) <i>Lev1</i> ME1, (b) <i>Lev 2</i> ME1, (c) <i>Lev5</i> ME1 (d) <i>Lev 8</i> ME1.	60
Figura 30. Cultivos puros de levaduras en medio Biggy.(a) <i>Lev 3</i> ME2, (b) <i>Lev 6</i> ME2, (c) <i>Lev9</i> ME2 (d) <i>Lev 11</i> ME2.	61

Figura 31. Cultivos puros de levaduras en medio Biggy.(a) Cultivos puros de levaduras en medio Biggy.(a) <i>Lev 4</i> ME3, (b) <i>Lev 7</i> ME3, (c) <i>Lev10</i> ME3 (d) <i>Lev 12</i> ME3.	61
Figura 32. Cultivos puros de Bacterias en medio Mueller Hinton. a) <i>Bact 1</i> ME1, (b) <i>Bact 4</i> ME1, (c) <i>Bact 8</i> ME1.	61
Figura 33. Cultivos puros de bacterias en medio Mueller Hinton. .(a) <i>Bact 2</i> ME2, (b) <i>Bact 5</i> ME2, (c) <i>Bact 7</i> ME2.	62
Figura 34. Cultivos puros de puros de Baterías en medio Mueller Hinton.(a) <i>Bact 3</i> ME3, (b) <i>Bact 6</i> ME3.	62
Figura 35. Cultivos puros de Hongos en medio PDA observación a 100x.(a) <i>Hongo 1</i> (<i>Agave</i>),(b)Observación microscópica a 100x del hongo 1. (c) <i>Hongo 2</i> (<i>Agave</i>), (d) Observación microscópica a 100x del <i>hongo 2</i>	63
Figura 36. Cultivos puros de Hongos en medio PDA observación a 100x.(a) <i>Hongo 3</i> (ME1),(b)Observación microscópica a 100x del <i>hongo 3</i> . (c) <i>Hongo4</i> (ME2), (d) Observación microscópica a 100x del <i>hongo 4</i>	64
Figura 37. Cultivos puros de Hongos en medio PDA observación a 100x.(a) <i>Hongo 5</i> (<i>Agave</i>),(b)Observación microscópica a 100x del <i>hongo5</i> . (c) <i>Hongo 6</i> (ME2), (d) Observación microscópica a 100x del <i>hongo 6</i>	64
Figura 38. Células de los cultivos puros de cada cepa para la extracción de DNA.	65
Figura 39. Electroforesis en gel de agarosa y cuantificación de DNA.	65
Figura 40. Gel de agarosa al 1% con ADN genómico de levaduras.	66
Figura 41. Gel de agarosa con los productos de PCR del rDNA de las 12 cepas aisladas.	67
Figura 42. Análisis de perfiles de restricción de la Levadura 1 con las endonucleasas.	68
Figura 43. Análisis de perfiles de restricción de la Levadura 2 con las endonucleasas.	68
Figura 44. Análisis de perfiles de restricción de la Levadura 3 con las endonucleasas.	68
Figura 45. Análisis de perfiles de restricción de la Levadura 4 con las endonucleasas.	69
Figura 46. Análisis de perfiles de restricción de la Levadura 5 con las endonucleasas.	69
Figura 47. Análisis de perfiles de restricción de la Levadura 6 con las endonucleasas.	69
Figura 48. Análisis de perfiles de restricción de la Levadura 7 con las endonucleasas.	70
Figura 49. Análisis de perfiles de restricción de la Levadura 8 con las endonucleasas.	70
Figura 50. Análisis de perfiles de restricción de la Levadura 9 con las endonucleasas.	70
Figura 51. Análisis de perfiles de restricción de la Levadura 10 con las endonucleasas.	71
Figura 52. Análisis de perfiles de restricción de la Levadura 11 con las endonucleasas.	71
Figura 53. Análisis de perfiles de restricción de la Levadura 12 con las endonucleasas.	71
Figura 54. Pruebas API a) Placas 20CAUX b) Placas 20NE.	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación científica del agave.....	7
Tabla 2. Especificaciones físicas y químicas para mezcal tipo I y II establecidas por la Norma Oficial del Mezcal.	21
Tabla 3. Enzimas de Restricción y sitios de corte.	39
Tabla 4. Condiciones de tiempo y temperatura de PCR.....	45
Tabla 5. Sustratos de la galería API 20C AUX.....	47
Tabla 6. Sustratos de la galería API 20 NE.....	47
Tabla 7. Sustratos de la galería API 20 E.....	47
Tabla 8. Consorcios encontrados en las tres mezcaleras estudiadas y el agave cupreata.....	51
Tabla 9. Características morfológicas de las levaduras.....	53
Tabla 10. Morfología celular de las levaduras.	60
Tabla 11. Características morfológicas de las bacterias.....	62
Tabla 12. Morfología celular de las bacterias.	63
Tabla 13. Identificación, productos de PCR y fragmentos de restricción para levaduras aisladas de fermentaciones espontáneas de tres mezcaleras de Villa Madero Mich.	72
Tabla 14. Identificación, productos de PCR y fragmentos de restricción para levaduras con las endonucleasas Alu I, Dde I, ScrF I y Taq I.	73
Tabla 15. Resultados de la galería API 20C AUX a las levaduras.....	77
Tabla 16. Resultados de la galería API 20 NE a las Bacterias.	77
Tabla 17 . Resultados empleando el equipo de Biolog.	78

RESUMEN

En el proceso de fermentación natural de la producción de mezcal las levaduras juegan un papel muy importante ya que son las responsables de la fermentación alcohólica, la cual, consiste en transformar los azúcares presentes en el mosto en alcohol, por lo que es necesario identificarlas. Se han desarrollado diferentes técnicas moleculares que permiten diferenciar y clasificar diferentes tipos de microorganismos como la electroforesis de cariotipo, al análisis de microsátélites, el polimorfismo de longitud del DNA mitocondrial, el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción del RNA ribosomal, entre otras. A finales de los años 90 se propuso la técnica de análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de las regiones ITS-5.8S como una herramienta rápida y confiable para identificarlas.

En el presente estudio se realizó el análisis del consorcio microbiano presente en los mostos de fermentaciones espontáneas de tres mezcaleras en Michoacán, del cual se aislaron 12 cepas de levaduras en medio sólido YPD, 8 cepas de bacterias en medio sólido Mueller Hinton y 6 tipos de hongos filamentosos en medio sólido PDA. Se procedió a la observación macro y microscópica de cada cepa mediante tinciones con azul de metileno en el caso de las levaduras, tinción de Gram para bacterias y azul de lactofenol para los hongos. Aisladas las levaduras se procedió a su caracterización molecular mediante la técnica RFLP en la cual se analizaron los perfiles de restricción mediante la comparación de los patrones de restricción de diferentes regiones de la zona ribosomal. Aislados las levaduras se procedió a su caracterización molecular mediante la técnica RFLP en la que se utilizaron las enzimas de restricción: *Hae* III, *Hha* I y *Hinf* I. Se analizaron los patrones de bandas publicados hasta el momento para la determinación del género y especies de las levaduras, comprobando que esta técnica es rápida y confiable en la mayoría de los casos. Sin embargo para algunas especies de levaduras existen ambigüedades en los patrones publicados por lo que, en este estudio, se generaron nuevos perfiles de restricción con nuevas enzimas endonucleasas: *Alu* I, *Dde* I, *ScrF* I y *Taq* I. El uso y análisis de las técnicas de biología molecular para la identificación, permitió nombrar algunas de ellas como: *Saccharomyces cerevisiae*, *Clavispora lusitanae*, *Kluyveromyces marxianus* var. *Drosophilarum* y, probablemente *Zygosaccharomyces bailii*.

Además en una segunda técnica de caracterización se evaluó la capacidad que tiene cada levadura que conforma el consorcio microbiano asociado a la fermentación alcohólica para utilizar

compuestos como fuentes de carbono, nitrógeno y azufre mediante la utilización del equipo Biolog determinando así el género y la especie de cada cepa.

1. INTRODUCCIÓN

La producción de mezcal en Michoacán se realiza de manera artesanal con solo levaduras presentes en el ambiente (fermentaciones espontaneas), estas condiciones limitadas provocan que el tiempo de fermentación sea prolongado y no produzca rendimientos altos. El proceso no se realiza en condiciones controladas y como consecuencia se cuenta con cultivo mixto de microorganismos presentes en la fermentación lo cual da por resultado la producción de sustancias no deseables en el producto final. La no estandarización del proceso para la elaboración de mezcal en esta región genera un producto con distintas características físicas y químicas en cada destilación.

A través de los años, los microorganismos se han utilizado en muchos procesos de fermentación para elaborar una amplia variedad de productos incluyendo enzimas, alimentos, bebidas, fármacos, combustibles, fertilizantes, entre otros [1].

Numerosos estudios ecológicos se han realizado a lo largo de los años para conocer la dinámica, cuantificación y composición de la microflora responsable de las fermentaciones espontáneas del mosto. La fermentación del mosto es un proceso bioquímico muy complejo, en el que intervienen e interaccionan levaduras, bacterias y otros microorganismos [2].

Aunque históricamente los procesos de fermentación se han desarrollado utilizando inóculos iniciadores formado por uno o múltiples microorganismos conocidos, en la elaboración artesanal de alimentos y bebidas fermentadas el fenómeno de transformación biológica depende del consorcio microbiano asociado al microsistema donde el numero especies son desconocidos. En estos procesos, las diferentes especies que constituyen el consorcio se desarrollan con dinámicas diferentes que dependen de su potencial genético y su capacidad para adaptar su metabolismo a las condiciones micro ambientales cambiantes, incluyendo al sustrato. Como resultado el desarrollo secuencial de especies conduce a un cambio continuo en la población microbiana coexistiendo en relaciones sinérgicas o antagónicas que tiene un efecto dentro del equilibrio biológico entre todas las especies que interactúan [1].

Las levaduras son los microorganismos clave para la producción de mezcal, ya que son los responsables de la fermentación alcohólica, la principal reacción en la conversión del mosto en alcohol. Las levaduras responsables de la fermentación pueden tener su origen ya sea en el agave (principal materia prima para la elaboración del mezcal) o bien en el ambiente de las vinatas o destiladoras. Las fermentaciones alcohólicas espontáneas deben ser estudiadas porque es la única forma de conocer la dinámica poblacional propia de una bodega o región vitivinícola. Las fermentaciones espontáneas son aquéllas que se producen de forma natural, es decir, las realizan las levaduras provenientes del agave y del material de las vinatas, sin ningún tipo de inoculación externa. Esto hace que las fermentaciones espontáneas no sean producto de la acción de una única especie o cepa de levadura, sino una sucesión de especies y cepas de levaduras diferentes a lo largo de la fermentación, todas ellas contribuyendo a la transformación de los azúcares en etanol, glicerol, ácidos orgánicos y compuestos volátiles, los cuales tienen una influencia directa sobre el sabor y el aroma de los destilados[3].

Se han realizado pocos estudios acerca de la ecología microbiana de las bebidas fermentadas y destiladas de Agave. La fermentación natural de tequila y del mezcal de Agave incluye especies *no Saccharomyces* y *Saccharomyces cerevisiae* que es la principal productora de etanol. En la industria del tequila, una práctica común es el empleo de cultivos puros de *S. cerevisiae* como inóculo. Sin embargo, un número creciente de levaduras *no Saccharomyces* han sido sistemáticamente investigadas debido a su habilidad para mejorar las características sensoriales y optimizar los atributos típicos de productos fermentados locales, lo que hace necesario caracterizar las levaduras nativas para emplearlas con *S. cerevisiae* como inóculos mixtos [3].

A pesar de que la fermentación espontánea es una sucesión de géneros y especies de levaduras, sólo unas pocas cepas de *S. cerevisiae* controlan la mayor parte de la fermentación. Esto es el resultado de una selección natural durante la fermentación espontánea [4-7].

A pesar de que ya hacía algunos años que se inoculaba mediante cultivos frescos mantenidos en las estaciones enológicas, no fue hasta mediados de los 60 que se produjeron las primeras levaduras secas. Inicialmente, sólo se produjeron comercialmente 2 cepas de *S. cerevisiae* (Montrachet y Pasteur Champagne) y éstas se utilizaron universalmente como iniciadores en todo tipo de fermentaciones, con un éxito limitado. Pronto se demostró que estas cepas no eran una solución universal para las fermentaciones del mosto y apareció la necesidad de seleccionar cepas mejor adaptadas a las diferentes regiones del mundo. Para la selección de cepas es esencial establecer

cuáles son sus propiedades enológicas. Hay diferentes criterios de selección que se pueden dividir en: favorables (tolerancia al etanol, buen rendimiento en la transformación de los azúcares en etanol, capacidad de crecer en altas concentraciones de azúcar, etc.) y desfavorables (como la producción de H₂S, producción de espuma o acidez volátil). No obstante, hay algunos aspectos que habitualmente se han considerado propiedades favorables y que se pueden englobar en un tercer grupo denominado neutros [8-10].

Tradicionalmente, los métodos utilizados para la identificación y caracterización de especies y cepas de levadura se han basado en sus características morfológicas y sexuales, pero estas características están muy influenciadas por las condiciones del cultivo y pueden dar resultados poco precisos [11].

Las técnicas moleculares que existen actualmente para identificar levaduras fueron desarrolladas como una alternativa a las pruebas morfofisiológicas tradicionales y para obtener una rápida identificación. Las 4 técnicas más utilizadas actualmente son: secuenciación de las regiones ribosomales, siendo la región D1/D2 del gen 26S la más utilizada, el estudio del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) de las regiones ribosomales, principalmente las regiones ITS-5.8S, electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (PCR-DGGE) empleando iniciadores universales y PCR en tiempo real. La técnica de RFLP de las regiones ITS-5.8S se desarrolló como una alternativa de identificación de levaduras de manera rápida para su utilización en la industria. Esta técnica ha sido utilizada por diferentes autores para identificar levaduras aisladas de diferentes fuentes como mostos de vinos, sidra, jugo de naranja, miel, cerveza de sorgo, masa, productos lácteos y recientemente en muestras clínicas para la identificación de levaduras y hongos patógenos [12].

La técnica RFLP permite diferenciar distintos microorganismos mediante el análisis de patrones de bandas, derivados de la ruptura de sus respectivos ADN. Estos patrones, conocidos como perfiles de restricción del ADN, se originan gracias a la actividad de las enzimas endonucleasas de restricción. Cuanto menor sea el tamaño de la secuencia nucleotídica, mayor será el número de fragmentos que se generen. Las endonucleasas de restricción se denominan con tres o cuatro letras que proceden del nombre de la bacteria en la que se han aislado (por ejemplo, la enzima. Eco procede de *Escherichia coli*) y además se le añade un número romano (Eco RI, Eco RII, Eco 47III), debido a que se pueden encontrar varias enzimas de restricción diferentes, que reconocen distintas secuencias nucleotídicas, en la misma bacteria. Los fragmentos se pueden separar mediante

electroforesis en gel de agarosa, obteniéndose perfiles de restricción característicos. Los perfiles dependerán de la enzima de restricción empleada así como del ADN utilizado (ADNn o ADNmt), aunque el más empleado es el ADN mt. La comparación entre los perfiles permitirá diferenciar varias especies entre sí o incluso poblaciones dentro de una misma especie [13].

Las enzimas de restricción se utilizan en la biotecnología para analizar el polimorfismo de longitud de fragmento de restricción por una variedad de razones. Las enzimas se utilizan para cortar longitudes de ADN en ciertas secuencias para que las diferencias entre los individuos puedan ser examinadas. Las soluciones de ADN fragmentado, cortar en ciertas secuencias de nucleótidos conocida, se cruza con sondas diseñados para detectar secuencias de ADN predefinidas. Esta técnica produce un gel con múltiples bandas de manchas oscuras, cada uno de los cuales representa un fragmento de ADN diferente. Se examina el patrón de tinción, de esta manera se puede determinar el patrón de RFLPs presentes en una muestra. Para la caracterización, cuantificación y detección de levaduras presentes en fermentaciones naturales en la producción de vino y sidra, diversos autores han utilizado el análisis de patrones de restricción de la región de los espaciadores transcritos internos (ITS 1 – ITS 2) que comprende en gen 5.8S ribosomal debido a la relativa facilidad de manipulación de muestras y alta reproducibilidad de sus resultados [14-21].

Desafortunadamente la gran mayoría de los estudios de los consorcios en fermentaciones espontaneas generalmente solo describen el aislamiento e identificación de especies más predominantes en un espacio de tiempo del proceso y otros solo han proporcionado datos semi-cuantitativos de la frecuencia en el aislamiento de organismos específicos [1]. Sin embargo, el control de los sustratos que consume cada cepa no se ha estudiado a profundidad esto daría como resultado un proceso de fermentación más completo incrementando el rendimiento, la producción y así disminuir la variabilidad de los productos. Con base a lo anterior y a la necesidad de establecer las correlaciones microbianas en consorcios en este estudio se analizan por medio de técnicas bioquímicas como el BIOLOG y pruebas estandarizadas API el consumo de diferentes sustratos

1.1. GENERALIDADES

El género *Agave*, con más de 200 especies, se encuentra nativamente en regiones áridas y tropicales desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Sudamérica incluyendo el Caribe. De estas el 75% se encuentran en México por lo que se considera como centro de origen de dispersión. En la cultura mexicana el agave se ha utilizado a lo largo de su historia para la elaboración de bebidas

alcohólicas como el tequila, el mezcal, sotol, bacanora entre otros, obtención de fibras textiles, elaboración de alimentos y recientemente para la obtención de fructooligosacáridos y jarabes con alto contenido en fructosa. De estos, el tequila y el mezcal son los productos de mayor importancia económica por su reconocimiento mundial basado en aroma y sabor propios de la bebida y su denominación de origen. Actualmente, el mezcal y el tequila están protegidos bajo las acuerdo NAFTA (North American Free Trade Agreement) con los Estado Unidos y la Unión Europea con los Estados Unidos Mexicanos [22].

1.2. AGAVE

El *agave* es una planta de la familia de las Amarilidaceas, de hojas largas y fibrosas de forma lanceolada, de color verde azulado cuya parte aprovechable para la elaboración de mezcal es la piña o cabeza (tallo y base de sus hojas)[23].

Los agaveso magueyes pertenecen a la familia botánica de las Agaváceas, cuyo centro de origen se encuentra en México y cuyo uso como recurso se remonta a la época prehispánica (10 000 a 8 000 años a.C.).La palabra "maguey" fue traída a México por los españoles y parece ser de origen antillano, derivada de las palabras meguey o magheih. Los mexicas lo conocieron con el nombre genérico de metl; los otomies como uada; los zapotecos como doba; los mixtecos como yabi y los purépechas como tacamba. En 1753, Linneo lo designa con el nombre genérico de agave (palabra derivada del griego, que significa admirable).

La exportación de *agaves* a Europa durante el siglo XIX, como novedades ornamentales, fue particularmente numerosa, por lo cual, muchos de los nombres específicos fueron publicados en listas o breves descripciones de plantas de jardín, hecho poco usual en la sistemática botánica [24].

1.2.1.CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO AGAVE

En la siguiente tabla se muestra de manera general la clasificación científica del *agave*:

Tabla 1. Clasificación científica del agave

Reino	<i>Plantas (Plantae)</i>
Phylum	Espermatofitas (<i>Spermatophyta</i>)
Clase	Monocotiledóneas (<i>Monocotiledoneae</i>)
Orden	Liliales (<i>Liliales</i>)
Familia	Agaváceas (<i>Agavaceae</i>)
Género	Agave
Especie	spp.(diversas especies)
Nombre	<i>Agave spp.</i>

1.2.2.DESCRIPCIÓN

Plantas perennes. Cuentan con rizoma (tallo subterráneo); por lo general carecen de tallos aéreos (acaules).



Figura 1. Agave cupreata de la región de Etúcuaro, Mich.

Hojas. Almacenan agua y presentan diversos grados de succulencia; son grandes, fibrosas, terminadas en espina y dispuestas en roseta; en ocasiones los márgenes de las hojas pueden presentar pequeñas espinas ganchudas o rectas.



Figura 2. Hojas de Agave cupreata.

Inflorescencia (quiote). Se presenta en forma de espiga o panoja con escapo (pedúnculo), largo y semileñoso; las flores son de color amarillo verdoso, con perianto en forma de embudo; seis estambres con anteras amarillas; ovario ínfero, tricarpetal, trilocular, con placentación axilar multiovulada.



Figura 3. Quiote del Agave.

Fruto. Es una cápsula leñosa, dehiscente, que deja salir numerosas semillas. Los agaves o magueyes son monocárpicos: es decir, sólo tienen una floración en su vida, después de la cual la planta muere. Aunque la producción de semillas es alta, están sujetas a fuerte depredación, por lo que su capacidad germinativa se reduce. En cambio, es muy importante la reproducción vegetativa por medio de brotes o hijuelos [25].



Figura 4. Semilla de Agave cupreata.

1.2.3.USOS Y APLICACIONES

El agave es una de las plantas que aún en la actualidad tiene un aprovechamiento integral, ya que además de los diversos usos que se hace de ella, la totalidad de las partes que lo conforman, se aprovecha para elaborar diferentes productos, situación constatada y confirmada por los españoles desde su llegada a los nuevos territorios, cuando los conquistadores observaron que las diversas culturas aprovechaban diferentes especies de agaves, para satisfacer la mayoría de sus necesidades básicas.

El uso y aprovechamiento de los agaves se ha dado de manera sistemática desde tiempos prehispánicos hasta nuestros días, variando estos en función de la aparición y uso de nuevos materiales, lo que poco a poco ha venido desplazando y reduciendo cada vez mas su aprovechamiento [26]. Actualmente, algunos de los principales productos y usos del agave son:

PRODUCTOS

- Bebidas fermentadas: aguamiel y pulque.
- Bebidas alcohólicas: Mezcal, Tequila, Sotol, Bacanora y Raicilla.
- Dulces regionales.
- Jarabe.
- Fructanos.

USOS

- Delimitación de terrenos y parcelas.
- Ornato.
- Medicinal.
- Preparación de platillos.

1.3. MEZCAL

La palabra Mezcal proviene del vocablo Náhuatl "Mexcalmetl", que significa "Agave". El mezcal es, por definición, una bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de los mostos preparados directa y originalmente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de los *Agaves* (excepto *tequilana* Weber var. Azul), previamente hidrolizadas o cocidas, y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, donde se obtiene líquido incoloro de color y sabor sui géneris de acuerdo a su tipo (mezcal), clasificado en tres tipos con base en el proceso (añejamiento) posterior a la destilación: Mezcal blanco sin reposarlo, mezcal reposado colocado de 2 a 6 meses en barricas de roble blanco y Mezcal añejado el cual se deja reposar más de 12 meses [27]. En general, los mezcales comerciales poseen una gran cantidad de compuestos de aroma y sabor, similar a aquellos presentes en tequila y otras bebidas alcohólicas donde se han reportado más de 200 [28, 29]. Composición que le confiere al mezcal un buqué y propiedades organolépticas que son determinadas por la composición en la mezcla de alcoholes, esterés, ácidos orgánicos y otros componentes. De estos, los alcoholes (por ejemplo: el 2-butanol, propanol, 2-metil-propanol y el 2/3-metil-1-butanol) son los componentes del sabor y los alcoholes con tres o más carbonos y los esterés de etilo son los mayores agentes responsables del aroma, donde predominan los esterés de etilo por conversión del alcohol etílico, seguidos por los esterés amílicos y propílicos, asociados frecuentemente con los olores frutales y florales. [29, 30]. Además la producción de acetato de etilo, la oxidación del etanol también genera acetaldehído que proporciona aroma a hoja verde o afrutado y que es un intermediario en la producción de ácido acético. Algunos ácidos orgánicos son producidos durante la fermentación y son importantes precursores de esterés. Independientemente del tipo de compuestos y características que proporcionan al mezcal, no se sabe a ciencia cierta su origen, se cree que la mayoría son sintetizados por los microorganismos fermentativos durante el proceso, otros provienen de la materia prima (agave) como terpenos y ácidos grasos de cadena larga y otros del proceso de cocción [28, 29]. Con base a lo anterior, esta mezcla compleja de compuestos presentes en el mezcal no puede ser, hipotéticamente, un producto de la actividad metabólica de un

solo microorganismo, sino el resultado de la participación colectiva de una mezcla de microorganismos dentro del consorcio nativo endógeno a la planta de agave, hipótesis que en este estudio será parcialmente esclarecida.

1.3.1.PROCESO DE ELABORACIÓN

En la producción de mezcal, después del cultivo y cosecha del agave, se emplean cuatro operaciones unitarias básicas: Cocción de la piña de agave; Molienda y prensado de la piña cocida; Fermentación del jarabe y Destilación del fermentado. De estas la cocción y la fermentación son consideradas las etapas críticas del proceso que inciden en el rendimiento y la calidad del producto.

1.3.1.1. RECOLECCIÓN

El proceso inicia con la recolección de aquellos agaves que se encuentran con la madurez requerida, estado que asocia principalmente a la edad de la planta; desde el punto de vista, los productores opinan que la edad óptima para la cosecha del agave es entre 6 y 10 años [26].

También son necesarias ciertas condiciones o características, tales como las siguientes: coloración verde-amarillenta en la base de las pencas y parda en la base del maguey, así como la presencia de pencas secas en esta zona. Desde el punto de vista bioquímico, el estado de madurez apropiado lo marca un alto contenido de azúcares que puedan ser aprovechados por los microorganismos para la generación de alcohol[25].

La cosecha de los agaves maduros se realiza de manera manual, proceso en el cual se corta el agave y se “jima” *in situ*, es decir se le cortan las hojas perimetrales a la planta en el sitio donde se produjo dejando rasurada la piña o cabeza, que posteriormente es transportada para su procesamiento [26].

1.3.1.2. COCCIÓN

Este proceso se realiza en una cavidad u horadación circular hecha manualmente en el piso a la cual los productores denomina “horno”, de dimensiones generalmente entre 5 y 12 metros de diámetro con una profundidad de 2 a 4 metros y la capacidad oscila entre 6 y 30 toneladas [26].

La cocción se lleva a cabo para hidrolizar o transformar los fructanos en fructosa, monosacárido apropiado para que se lleve a cabo la fermentación. Además del contenido de polifruktosa, el agave contiene también vitaminas, minerales y aminoácidos que sirven como factores de crecimiento para los microorganismos durante el proceso fermentativo [25].



Figura 5. Horno utilizado para la cocción de las piñas de Agave.

Para realizar la cocción se siguen los siguientes pasos:

1. Se coloca la leña en el fondo del horno, apilando leño sobre leño en forma rectangular. Se prende fuego a la leña.
2. Se colocan las piedras encima de la leña ya encendida, esperando aproximadamente seis horas a que alcancen el estado rojo-blanco, que es el apropiado para la cocción.
3. Se coloca el bagazo mojado.
4. Se colocan las piñas partidas a la mitad o en cuartos, dependiendo de su tamaño original.
5. Las piñas se tapan con pencas del agave y costales para después cubrirlas con tierra.
6. Se espera de tres a cuatro días para que el cocimiento de las piñas se lleve a cabo de manera adecuada.

Una buena cocción se ve influenciada por la cantidad, el acomodamiento de la leña y la cantidad de piedras con las que se cose. Además, debe vigilarse que el horno esté bien cubierto, ya que la entrada de oxígeno puede provocar que las piñas se quemen[25].

1.3.1.3. MOLIENDA

Después de la cocción, el siguiente proceso es la molienda, la cual tiene como objetivo desmenuzar los trozos de mayor tamaño del agave cocido, reduciéndolos a la menor fracción posible y para obtener los jugos de agave ricos en azúcares y así facilitar la etapa posterior de fermentación [26].

El triturado se lleva a cabo generalmente utilizando un molino conocido como “molino egipcio”. Este se conforma de una rueda de aproximadamente 500 kg. de peso unida a un eje y que es tirada por un caballo.

Los pasos que se siguen para que el triturado se lleve a cabo son los siguientes:

1. Cortado o rajado de las piñas cocidas, esto con la finalidad de no causar mucho esfuerzo para el caballo al encontrar trozos demasiado grandes.
2. Acomodo de los trozos de piña en el centro del molino, con el fin de dar continuidad al machacado.
3. Preparación del caballo e inicio de la trituración.
4. Traspaso de la pulpa desde el molino a la tina de fermentación[25].



Figura 6. Piña de Agave cocida y triturada.

1.3.1.4. FERMENTACIÓN

La fermentación constituye el proceso crucial en la elaboración del Mezcal, y requiere de una vigilancia permanente por parte de los maestros vinateros [26]. Definido en su aceptación estricta, como la obtención de energía en ausencia de oxígeno y cuyo producto final determina el tipo. Con base a ello, la fermentación alcohólica consiste en transformar los azúcares en alcohol, que es mediada por dos reacciones consecutivas posterior a la etapa de reacción convergente del metabolismo

- 1) Piruvato $\rightarrow$ Acetaldehído + CO₂
- 2) Acetaldehído + NADH $\rightarrow$ Etanol + NAD⁺

Durante el metabolismo, estos microorganismos sintetizan compuestos de aroma y sabor que otorgan características únicas al producto fermentado. En los procesos de fermentación alcohólica natural, los microorganismos endógenos cuyo origen puede ser la materia prima (piña de agave), el jarabe o el equipo de proceso, llevan a cabo en una compleja red de reacciones asociadas con la actividad metabólica individual [29, 31]. Esta diversidad microbiana en las fermentaciones naturales favorece los procesos impredecibles e incontrolables que da como resultados procesos ineficientes, que está basada, entre otros factores, a la dificultad de especificar parámetros de operación de proceso. Esto es, el análisis y cuantificación de las variables de proceso requiere del conocimiento de la fisiología, metabolismo, propiedades genéticas e interacciones en los integrantes del consorcio, a fin de diseñar una aplicación eficiente que incremente los rendimientos y una producción más estable en términos de variabilidad de productos. Sin embargo, el estudio de consorcios en las fermentaciones naturales es muy complejo asociado a la dinámica poblacional con heterogenicidad espacial y temporal con interacciones complejas no lineales entre los integrantes del consorcio y que a la fecha no han sido totalmente esclarecidas. Con base a lo anterior, muchos procesos fermentativos actuales utilizan cepas comerciales del género *Saccharomyces*. Como inoculo inicialdor para poder obtener un proceso controlado, estable y eficiente.

En la fermentación los azúcares contenidos en las piñas se transforman en etanol por medio de la fermentación alcohólica, ruta metabólica propia de las levaduras. Esta operación se lleva a cabo en tinajas de madera durante un tiempo aproximado de ocho a diez días, tomando en consideración la temperatura ambiente.

Los pasos a seguir durante la fermentación son los siguientes:

1. *Adición de agua caliente:* Cuando se termina de colocar la pulpa triturada se adiciona agua caliente con la finalidad de crear el ambiente apropiado para el crecimiento de los microorganismos. Finalizada esta operación, debe esperarse aproximadamente por veinticuatro horas a que alcance el estado apropiado o “punto” para la etapa siguiente. Este estado se caracteriza por la presencia de espuma al abrir la capa de pulpa que cubre la tina y por la existencia del sonido característico de un burbujeo intenso y uniforme en toda la tina.
2. *Adición de agua fría:* Alcanzado el estado anterior, es necesario regular el crecimiento de los microorganismos con la finalidad de que no exista una transformación acelerada a alcohol de forma que pueda originarse ácido acético de manera posterior. Para esto se

requiere adicionar agua fría. Tras esta operación debe esperarse aproximadamente dos horas y media.

3. *Revoltura*: Ya controlado el crecimiento microbiano, debe efectuarse una homogeneización de tal forma que no existan zonas donde la fermentación sea menor o no exista. Para esto se lleva a cabo el mezclado del contenido de la tina. Después de realizada la operación debe esperarse por espacio de 36 horas.
4. *Detención de la fermentación*: En esta paso la intención es alentar lo más posible el ritmo de trabajo de los microorganismos fermentadores. Para esto se permite la entrada de oxígeno a las tinas de fermentación efectuando el levantamiento de la capa superior de la pulpa que cubre la demás materia fermentada[25].

1.3.1.5. DESTILACIÓN

En esta operación se efectúa la separación del alcohol del agua aprovechando para ello sus diferentes puntos de ebullición. El etanol, debido a estructura molecular, tiene un punto de ebullición más bajo que el agua (78.5°C a nivel del mar), por lo tanto, se separa de ésta al alcanzar esta temperatura.

El dispositivo utilizado para la destilación es el alambique. Este equipo está conformado por cuatro elementos fabricados en cobre debido a su alta conductividad térmica, de tal forma que facilita la transferencia de calor calentándose y enfriándose fácilmente alcanzando así la temperatura apropiada de separación[25].

El alambique está compuesto de tres grandes partes, un caso de cobre en donde se pone a hervir el mosto fermentado, sobre el cual se coloca un como de madera que funciona como una cámara donde se condensan los compuestos volátiles, un segundo caso de cobre colocado en la parte superior del cono, el cual se mantiene permanentemente lleno de agua fría cuya función principal es realizar el enfriamiento de los vapores a interior del cono, generando de esta manera la condensación [26].

Los pasos para llevar a cabo la destilación son los siguientes:

1. *Llenado de la olla*: La olla del alambique debe ser llenada con el mosto fermentado y bagazo en proporción de 2 a 1, esto es, dos partes de mosto por una parte de bagazo. Es

importante mencionar que, además de su aporte alcohólico, el bagazo impide que el vapor salga de manera violenta, arrastrando consigo parte del mosto sin destilar.

2. Armado del alambique: Se colocan la montera y el turbante conectados entre sí y con las partes restantes, se sellan perfectamente todos los sitios de conexión con una especie de pasta llamada masilla, la cual proviene de los residuos del maguey después de la destilación. La finalidad del sellado es la de evitar el escape de vapor el cual, además de causar pérdidas de alcohol, generan un descenso en la presión, provocando que el mezcal que se obtiene salga con menos fuerza, retrasando la operación.
3. Calentamiento y regulación del calor: Se encienden los leños para generar el calor y se espera por espacio de media hora a que salga un delgado flujo de alcohol el cual se recolecta en garrafones.

Al alcohol o mezcal del primer garrafón se le conoce con el nombre de punta y tiene una graduación alcohólica de 60° G. L. (60% v/v)(Gay Lusacc). Al mezcal contenido en los dos garrafones siguientes se les conoce con el nombre de xixe (sishe) y tienen una graduación alcohólica de 30° G. L. (Gay Lusacc) aproximadamente. Estos últimos garrafones se destinan a otra operación llamada refinación[25].

1.3.1.6. REFINACIÓN

El mezcal de primera destilación es el obtenido en la operación anterior. Como ya se mencionó, los últimos garrafones de la primera destilación tienen una graduación de alcohol baja para los requerimientos del envasado de ahí que necesiten refinarse para elevar su contenido de alcohol[25].

1.3.1.7. COMPOSICIÓN

Es necesario aplicar una operación más por la variación de la graduación alcohólica del mezcal obtenida en la destilación, y consiste en mezclar los productos de la primera destilación con los obtenidos en la refinación (incluyendo el agua destilada) hasta obtener los grados de alcohol requerido para la venta: 43° G. L.

Para saber el contenido de alcohol del mezcal con el que se está trabajando se utilizan desde instrumentos como el alcoholímetro hasta el sentido del gusto[25].

1.3.1.8. MADURACIÓN

Esta operación consiste en el almacenamiento del mezcal en barricas hechas de roble blanco con la finalidad de dar un aporte especial a las características organolépticas del mezcal, como suavizar el sabor y conferirle una coloración oscura agradable a la vista.

El período de maduración varía según el tipo de mezcal que se desee obtener:

Mezcal reposado: Se almacena por un período de catorce meses.

Mezcal añejo: Se almacena por un período de tres años[25].



Figura 7. Reposado de mezcal en barricas de roble.

1.3.1.9. ENVASADO

Finalmente se realiza la operación de envasado. Esta se realiza en diferentes envases dependiendo de lo que se vaya a envasar: mezcal blanco o joven, añejo, reposado, etc.

Las presentaciones existentes son: 50 ml., 250ml., 500 ml. y 750 ml., en envases de vidrio o en ollas de barro [25].

1.4. CLASIFICACIÓN DEL MEZCAL

De acuerdo a las características adquiridas en procesos posteriores a la destilación y rectificación, el mezcal se clasifica en 3 categorías:

1. Mezcal añejo o añejado.

2. Mezcal joven.

3. Mezcal reposado [27].

Mezcal añejo o añejado

Producto susceptible de ser abocado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos un año, en recipientes de madera de roble blanco o encino, cada una con capacidad máxima de 200 litros. En mezclas de diferentes mezcales añejos, la edad para el mezcal resultante es el promedio ponderado de las edades y volúmenes de sus componentes [27].

Mezcal joven

Producto obtenido directa y originalmente con los azúcares extraídos de los agaves, susceptible de ser de ser abocado *, para el caso del mezcal tipo II hasta con 20% de otros azúcares [27].

Mezcal reposado

Producto susceptible de ser abocado* que se deja por lo menos 2 meses en recipientes de madera de roble blanco o encino, para su estabilización [27].

*Abocado: Procedimiento para suavizar el sabor del mezcal, mediante la adición de uno o más productos naturales, saborizantes o colorantes permitidos en las disposiciones legales correspondientes.

1.5. TIPOS DE MEZCAL

Los tipos de mezcal de acuerdo al porcentaje de carbohidratos provenientes del agave utilizados en la elaboración del mezcal son:

Tipo 1. Mezcal 100% Agave: Producto obtenido de la destilación y rectificación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares de las cabezas maduras de los agaves, previamente hidrolizadas o cocidas y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras cultivadas o no. Este tipo de mezcal puede ser joven, reposado o añejo y susceptible de ser abocado[32].

Tipo 2. Mezcal: Producto que se obtiene de la destilación y rectificación de los mostos en cuya formulación se han adicionado hasta un 20% de otros carbohidratos permitidos por las

disposiciones legales correspondientes. Este tipo de mezcal puede ser joven, reposado o añejo y susceptible de ser abocado [32].

1.6. DENOMINACIÓN DE ORIGEN

La denominación de origen se ha constituido como una figura jurídica de nivel internacional, dirigida a evitar que los nombres de algunos productos que tienen prestigio o reconocimiento, sean utilizados en forma genérica por cualquier persona, empresa, gobierno, etc. Esto les permite a los consumidores tener la seguridad de que el producto adquirido cumple con las expectativas de calidad. El mezcal posee la denominación de origen, la cual solo se concede a aquellos lugares exclusivos de siembra y cultivo del agave, excluyendo la especie *tequilana* Weber, de acuerdo al registro internacional del Arreglo de Lisboa a partir del 9 de marzo de 1995 con número de registro 731. Las zonas que tiene la denominación de origen para la producción de mezcal actualmente se dedican al cultivo de 290 Hectáreas de agave mezcalero para una producción de 103 toneladas promedio de piña de agave.

El 28 de noviembre de 1994 se declaró la denominación de origen del mezcal, esta protege a los productores de bebidas elaboradas mediante la destilación de magueyes de las especies mencionadas en la NOM – Mezcal, cinco especies de agave, indicando que también puede usarse otras especies, siempre y cuando no se encuentren incluidas en otra denominación de origen. En cuanto al área, originalmente abarcaba los estados de Oaxaca, Guerrero, San Luis Potosí, Zacatecas y Durango. En 2001 se incorporaron los estados de Guanajuato y en 2003 otros más de Tamaulipas [33].



Figura 8. Estados comprendidos por la Denominación de Origen.

1.6.1.LA DENOMINACIÓN DE ORIGEN EN MICHOACÁN

El gobierno del estado de Michoacán solicitó la modificación a la Declaratoria de Protección de la Denominación de Origen Mezcal, para que se incluya, en la zona protegida por dicha Declaratoria los siguientes municipios pertenecientes al Estado de Michoacán: Acuitzio, Aguililla, Ario, Buenavista, Charo, Chinicuila, Coalcomán de Vázquez Pallares, Cotija, Cojumatlán de Régules, Erongarícuaro, La Huacana, Tacámbaro, Turicato, Tzitzio, Hidalgo, Salvador Escalante, Morelia, Madero, Queréndaro, Indaparapeo, Tarímbaro, Tancítaro, Los Reyes, Tepalcatepec, Sahuayo, Marcos Castellanos, Jiquilpan, Venustiano Carranza y Vista Hermosa. Los municipios que se solicita incluir en la zona geográfica protegida cuentan con los factores naturales y humanos suficientes para la producción de los agaves determinados en la Norma Oficial Mexicana aplicable a la bebida alcohólica "Mezcal" NOM-070-SCFI-1994.

Se espera que de prosperar la inclusión de algunos municipios del estado de Michoacán en el territorio amparado por la denominación de Origen Mezcal, se apliquen varios mecanismos de protección legal tales como; estandarización de los procesos, aplicación de leyes, reglamentos y normas, uso exclusivo de especies mezcaleras, registro de marcas y certificaciones, entre otros, beneficiando a los productores en general[26].

1.6.2.MARCO NORMATIVO

La denominación de origen mezcal, la Norma Oficial Mexicana del Mezcal NOM-070-SCFI-94, el funcionamiento del Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM A. C.) y el Patronato Nacional de la Industria del Mezcal A. C., aunado a la creciente presencia del mezcal en los mercados nacional e internacional y al buen prestigio que ha alcanzado entre los consumidores finales, constituyen las bases para un vigoroso desarrollo futuro de esta actividad [32].

1.6.2.1. INDUSTRIA DEL MEZCAL Y SU NORMATIVIDAD

Existen en el territorio mexicano aproximadamente siete mil productores de mezcal en su mayoría en el estado de Oaxaca. En este se registró un aumento en la tasa de producción anual de un 15.33%, al pasa de 2 millones 875 mil litros en 1994 a 9 millones de litros en 2002. De esta producción solo una parte se exporta a distintos países como Italia, Grecia, España, Alemania,

Estados Unidos, Canadá, Chile, Honduras, entre otros, con base a estándares de calidad de producto (Bancomext, 2002). El mezcal, al igual que otras bebidas alcohólicas, está sujeto a normas de producción cuyo objetivo es establecer las características y especificaciones que deben cumplir personas físicas o morales autorizados para producir y/o comercializar mezcal [27].

1.6.2.2. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-070-SCFI-94

Su publicación en el diario Oficial de la Federación fue con fecha 12 de junio de 1997 y entro en vigor el 27 de junio de 1997 a partir de la acreditación del Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal A. C. (COMERCAM).

La NOM se apega a las formas tradicionales del proceso de producción del mezcal, incidiendo en el control de la calidad, higiene y legitimidad del producto; en ella se señalan los requisitos a la producción de mezcal, conteniendo entre otros, los siguientes aspectos:

- ✓ *Campo de aplicación.* Esta norma se aplica a la bebida alcohólica elaborada con los agaves de las siguientes especies:
 - *Agave angustifolia* Haw (Maguey espadín).
 - *Agave asperrima* Jacobi (Maguey de cerro, bruto o cenizo).
 - *Agave weberi* Cela (Maguey de mezcal).
 - *Agave potatorum* Zucc (Maguey tobalá).
 - *Agave rodacantha* Zucc (barril)
 - *Agave salmiana* Otto ex *Salm ssp crassispina* (Trell), Gentry (Maguey verde)
- [27].

1.6.2.3. ESPECIFICACIONES

El producto objeto de esta NOM en sus tipos I y II deberá cumplir con las siguientes especificaciones físicas y químicas:

Tabla 2. Especificaciones físicas y químicas para mezcal tipo I y II establecidas por la Norma Oficial del Mezcal.

Especificaciones	Mínimo	Máximo
% de alcohol en volumen a 20°	36.0	55.0
Extracto seco g/L	0.2	10.0
Acidez total (como ácido acético)	N.R.	170.0
Alcoholes superiores mg/100ml	100.0	400.0
Metanol mg/100	100.0	300.0

N.R. – No reportado

Fuente: Sistema producto maguey–mezcal.

Además de las especificaciones que hace referencia la Norma Oficial, el producto debe contener una concentración máxima furfural de 1 mg/00 mL debida a su elevada toxicidad. Características que solo pueden ser alcanzadas si el proceso de producción es estandarizado, sin embargo el proceso de elaboración del mezcal es prácticamente artesanal y se caracteriza por ser incontrolable e impredecible y como resultado los productos obtenidos presentan una calidad variable.

La NOM-070-SCFI-94, permite la utilización de levaduras cultivadas o no, sin embargo, éstas prácticamente no son utilizadas por los productores, quienes suelen usar el Sulfato de Amonio (20.5 -00- 00), y la Urea (46-00-00), ambos de uso agrícola, como fuentes de Nitrógeno que adicionalmente contienen diversos iones metálicos (Cu, Fe, Zn, Mg, Al, S) no indicados para el consumo humano. Cabe señalar que es frecuente que los productores se excedan en su uso, con la intención de acortar el tiempo de la fermentación a 24 hrs. aplicando hasta 2 Kg. de Sulfato de Amonio a una tina de 1500 litros, cuando lo normal sería aplicar de ½ a 1 Kg. por tina, con lo que la fermentación requeriría de 4 a 5 días; en tanto que la fermentación natural puede requerir, según la temperatura ambiental, de hasta de 15 días[32].

2. MARCO TEÓRICO

2.1 CULTIVOS PUROS Y MIXTOS

Los cultivos puros han tenido un inmenso valor en los procesos de fermentación debido a la producción de olores y sabores especiales. Sin embargo, esto puede ser la principal limitación,

debido a que generalmente las cepas que producen altas concentraciones de etanol, producen menos compuestos organolépticos. El empleo de cultivos puros va acompañado del cumplimiento de determinados requisitos, siendo el principal, prevalecer solo durante la etapa de fermentación. Actualmente se conoce que en las fermentaciones participan una sucesión secuencial de microorganismos que se presentan de manera espontánea desarrollándose inicialmente los microorganismos que se multiplican con mayor rapidez y que no toleran altas concentraciones de etanol y después son remplazados por otros microorganismos con mayor tolerancia a etanol. Debido a esto los usos de monocultivos pueden no ser necesariamente deseables y los cultivos mixtos pueden tener mucho que ofrecer. En muchas fermentaciones tradicionales, se emplean cultivos mixtos de composición variable, aunque de manera estandarizada ya que brindan estabilidad de cultivo, resistencia a la contaminación, rendimientos elevados e incrementan la concentración de ciertos compuestos en la fracción volátil. Sin embargo, a pesar de la ventajas del uso de cultivos mixtos, la selección y composición basado en técnicas analíticas aún no ha sido totalmente esclarecido y hace el estudio de consorcios un desafío interesante.

2.2. CONSORCIOS MICROBIANOS

En los procesos naturales de fermentación, el fenómeno de transformación biológica depende del consorcio microbiano asociado con el microsistema en el cual el número, género y especie de microorganismos es desconocido. En estos procesos, los diferentes microorganismos que constituyen el consorcio se propagan con diferentes dinámicas que dependen, entre otros factores, de su potencial genético y su capacidad para adaptarse a condiciones fisicoquímicas cambiantes, incluyendo el micro-ambiente y el sustrato. Como resultado el desarrollo secuencial de microorganismos lleva a continuos cambios en el contenido microbiano [1, 2, 34]. Este fenómeno denominado heterogenicidad espacial y temporal, implica que los microorganismos que integran las comunidades no son estáticas en el espacio ni en el tiempo, sino que viven en sistemas complejos con altos niveles de interacción, donde la reacción de cada miembro del consorcio puede ser ventajosa, desventajosa o neutra para uno a más de los otros miembros [2, 35-37]. Desafortunadamente, la gran mayoría de los estudios de consorcios en las fermentaciones naturales carecen del conocimiento cuantitativo en el conocimiento de las interacciones microbianas, limitándose solo a describir el aislamiento e identificación de la especie más predominante en un punto del proceso de fermentación o proporcionar datos semicuantitativos de la frecuencia de aislamiento de microorganismos específicos. Los alcances más recientes del estudio de consorcios está basado en comprender el comportamiento de los cultivos de microorganismos basado en

combinaciones y estudios de sucesión [2, 36, 38, 39]. Sin embargo, el control de los procesos industriales de fermentación requiere del conocimiento de la fisiología, metabolismo, propiedades genéticas e interacciones de los microorganismos que constituyen el consorcio microbiano, así como del conocimiento del proceso que realizan a fin de diseñar una aplicación más eficiente que incremente los rendimientos de proceso, hacer la producción más estable y disminuir la variabilidad de los productos fermentados [1, 2, 34]. Actualmente, es limitada la información reportada en la literatura que describa interacciones microbianas y generalmente la selección de microorganismos a usar como inóculo iniciador en procesos fermentativos está basada en el aislamiento e identificación de las especies más predominantes en algún punto del proceso o proporcionan datos semi-cuantitativos se secuencia de aparición de organismos específicos, que dirige el uso de cultivos puros o mixtos. Independientemente de las ventajas y desventajas de los métodos de selección, el análisis de consorcios inicia con el aislamiento de los microorganismos que conforman el consorcio a estudiar.

2.3. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

Durante el último siglo se ha dependido del aislamiento y cultivo de los microorganismos para estudio de sus características físicas y metabólicas. Para esto se utiliza un procedimiento que se llama enriquecimiento. Este método requiere que el medio de cultivo y las condiciones de incubación sean selectivos para el organismo que se desea aislar, además de requerir diversos procedimientos microbiológicos convencionales. Existen manuales con una gran variedad de medios de cultivo que pueden emplearse para dicho propósito (BIOXON, MERCK, etc.). Sin embargo, existen microorganismos que resultan imposibles de aislar como cepa pura porque no se conocen las condiciones para su cultivo porque están en función de la actividad de otro. En otros casos los microorganismos pierden la capacidad de reproducirse, pero tiene su actividad metabólica. Aun no se conocen los mecanismos moleculares relacionados con este fenómeno, una teoría sugiere que las células se programan genéticamente para adaptarse a las condiciones adversas (como agotamiento de nutrientes, temperatura baja u otros tipos de estrés) y generar formas de latencia [40].

2.4. LEVADURAS

Las levaduras al igual que los mohos, son hongos, pero se distinguen de los mohos porque su forma dominante es unicelular. Generalmente se reproducen por gemación. Como células solas, crecen y

se reproducen más aprisa que los mohos filamentosos y en proporción a su peso, son más aptas para efectuar cambios químicos porque tienen mayor área superficial en relación a su volumen. Son diferentes de las algas porque no realizan fotosíntesis; tampoco son protozoos, puesto que tienen una pared celular rígida. Con facilidad se diferencian de la mayor parte de las bacterias por su tamaño relativamente grande y su morfología. Hay aproximadamente 350 especies de levaduras, separadas en unos 39 géneros[41].

Las levaduras pertenecen al Reino Fungi y división *Eumicota* que agrupa a los denominados hongos verdaderos. Dentro de esta división las levaduras se incluyen en 2 de las 5 subdivisiones de los Eumicetos.

2.4.1. CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS LEVADURAS

Las levaduras pertenecen al reino fungi y división *Eumicota* que agrupa a los hongos verdaderos. Dentro de esta división las levaduras se incluyen en 2 de las 5 subdivisiones de los *Eumicetos*, la *Ascomycotina* es representada por levaduras capaces de producir ascosporas (esporogeneas) y la *Deuteromycotina* representada por levaduras incapaces de formar esporas (asporogeneas). Los generos esporógeneos, agrupados en la familia Saccharomycetaceae, se distribuyen en 3 subfamilias. Los generos no espogeneos constituyen la familia Cryptococcaceae.

Los principales criterios utilizados para la clasificación e identificación de las levaduras son los siguientes:

1. Si producen, o no, ascosporas.
2. Si son esporógenas:
 - a) La forma de producción de las ascosporas:
 1. Producidas sin conjugación de las células de la levadura (mediante partenogénesis). Una vez producidas las esporas puede tener lugar: (a) la conjugación de las ascosporas, o (b) la conjugación de las células hijas de escaso tamaño.
 2. Producidas por conjugación isogámica (las células que se conjugan parecen semejantes).
 3. Producidas por conjugación heterogámica (las células que se conjugan tiene distinto aspecto).

-
- b) Aspecto de las ascosporas: Forma, tamaño y color. La mayoría de las esporas son esferoidales u ovoides.
 - c) Número habitual de ascosporas por asca: una, dos, cuatro, u ocho.
3. Aspecto de las células vegetativas: forma, tamaño, color, inclusiones.
4. Forma de reproducción sexual:
- a) Gemación.
 - b) Fisión.
 - c) Gemación y fisión combinadas.
 - d) Artrosporas (oidios).
5. Producción de micelio, de un pseudomicelio, o no producción de micelio.
6. Crecimiento en forma de película en la superficie de los líquidos (levaduras formadoras de película), o crecimiento en toda la masa de los medios líquidos.
7. Color del crecimiento macroscópico.
8. Propiedades fisiológicas (utilizadas principalmente para identificar las especies, o las cepas de una determinada especie):
- a) Fuentes de nitrógeno y de carbon.
 - b) Necesidades de vitaminas.
 - c) Oxidativas o fermentativas: las levaduras formadoras de películas son oxidativas; las demás levaduras pueden ser fermentativas, o fermentativas y oxidativas al mismo tiempo.
 - d) Lipólisis, actividad ureásica, producción de ácido, y producción de compuestos amiláceos [41].

2.4.2.LEVADURAS DE IMPORTANCIA INDUSTRIAL

La mayoría de las levaduras que se utilizan en la industria pertenecen al género *Sacharomyces*. El término «levadura silvestre» se aplica a cualquier levadura que no sea la que se está utilizando o aquella cuyo crecimiento se está estimulando. Por consiguiente, una levadura que se emplea para llevar a cabo un determinado tratamiento podría ser una levadura silvestre para otro tipo de

tratamiento. La mayoría de las levaduras silvestres indeseables son asporógenas o falsas levaduras[41].

2.4.3. GÉNERO *Saccharomyces*

Las células de estas levaduras pueden ser redondeadas, ovalas o alargadas y pueden producir un pseudomicelio. Se reproducen por gemación multipolar o mediante la producción de ascosporas, las cuales se pueden formar tras la conjugación de dos células, o pueden derivar de células diploides cuando estas representan la fase vegetativa. Las ascosporas, en número de una a cuatro por asca, suelen ser redondeadas u ovaladas. La especie tipo *S. cerevisiae*, se emplea en muchas industrias alimentarias, utilizándose cepas específicas en la fermentación de pan, como levaduras de superficie en la fermentación de la cerveza inglesa, en la fermentación de los vinos, y en la producción de alcohol, glicerol e invertasa. La formación de agregados celulares y la rápida producción de CO₂ ocasionan el desplazamiento de las células de levadura a la superficie de la masa líquida, y de aquí que a las levaduras responsables de la fermentación se les conozca con la denominación de levaduras de superficie. Las levaduras del fondo del tanque de fermentación no forman agregados de células, crecen más lentamente, y tienen mayor actividad fermentativa a temperaturas más bajas (10 a 15 °C). El hecho de que no se formen agregados de células junto con la mayor lentitud, tanto de su crecimiento como de la producción de CO₂, permite que las levaduras sedimenten en el fondo y de aquí el término levadura de fondo. Las citadas propiedades de las levaduras corresponden a observaciones que no explican porque algunas forman agregados, mientras que otras flocculan.

La variedad ellipsoideus de *S. cerevisiae* es una levadura que produce elevadas concentraciones de alcohol que se utiliza en la fabricación industrial de alcohol, en la elaboración de vinos y de licores de destilación[41].

2.5. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Por décadas, los métodos usados para identificar microorganismos han estado basados en el conjunto de propiedades celulares observables, como su morfología, propiedades fisiológicas y sus características bioquímicas, siendo posible la identificación en términos de género. Sin embargo los métodos son laboriosos, requieren de mucho tiempo para su identificación y la interpretación de los resultados puede ser influenciada por el medio y las condiciones de cultivo, por lo que han introducido errores en la ubicación taxonómica y originado el fenómeno de dualidad en la nomenclatura [19]. Estas dificultades se han solucionado con la aplicación de técnicas moleculares

que requieren o no del cultivo axénico basadas en el análisis de fragmentos de moléculas de ácidos nucleídos, con las que es posible tener una distinción en términos de especie y cepa. Las técnicas más utilizadas son: la electroforesis de cariotipo, el análisis de microsátelites, el polimorfismo de longitud del DNA mitocondrial, el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción del DNA ribosomal, el polimorfismo del DNA amplificado aleatoriamente, el análisis de los RNA de bajo peso molecular, electroforesis en gel con gradiente desnaturizante, entre otras [42]. Con todas estas metodologías se obtienen patrones de bandas o “huellas digitales” que se comparan utilizando diferentes tipos de software permitiendo la identificación del microorganismo [43]. El polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción del RNA ribosomal consiste en la diferenciación de microorganismos por el análisis de los patrones que se generan en un sitio específico del genoma, cuando es cortado por enzimas de restricción. De esta forma en un gel de electroforesis aparece un patrón de bandas polimórficas correspondiendo a los fragmentos de diferentes tamaños que se generan con el corte de cada endonucleasa. Estos fragmentos polimórficos aparecen debido a los organismos de diferentes especies, e incluso cepas difieren en la distancia de los sitios de unión para cada enzima de restricción. La similitud de los patrones generados permite establecer correlaciones entre especies y cepas, la existencia de patrones únicos permite la identificación. Para la caracterización, cuantificación y detección de levaduras presentes en fermentaciones naturales en la producción de vino y sidra, diversos autores han utilizado el análisis de patrones de restricción de la región de los espaciadores transcritos internos (ITS1-ITS2) que comprende el gen 5.8 s debido a la relativa facilidad de manipulación de muestras y alta reproducibilidad de sus resultados [10,14,15,16,17,19,20].

2.5.1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LEVADURAS

La identificación y clasificación de levaduras ha sido tradicionalmente basada en la morfología, fisiología y características bioquímicas. Se han desarrollado diversos paquetes o “kits” con rápidos sistemas de identificación de levaduras, pero principalmente para diagnósticos clínicos. En años recientes se han desarrollado diferentes técnicas en biología molecular para identificación de levaduras pero la base de datos no permite identificar a un elevado número de especies [10].

En el presente siglo la industria de fermentación ha desarrollado levaduras que pueden ser usadas en la producción de valiosos productos, incluyendo antibióticos, vitaminas y enzimas. Sin embargo ellas también causan inmensas pérdidas económicas y sus actividades perjudiciales incluyen daño a

los alimentos y a las buenas manufacturas. Consecuentemente es conveniente la detección e identificación confiable y rápida de estas especies involucradas en los alimentos [44].

El mayor reto al identificar cepas de levadura recae en la necesidad de diferenciar grupos y especies que taxonómicamente están muy próximas, pero que tienen propiedades muy diferentes en lo que respecta a sus aptitudes fermentativas y organolépticas.

La presencia de estas especies puede dar lugar a metabolitos secundarios que modifiquen las propiedades organolépticas del producto final, y, por tanto, es importante disponer de buenos métodos de detección para su control. Finalmente, también es posible utilizar las técnicas de identificación molecular para el análisis y comprobación de la estabilidad genética de las cepas de levadura, un aspecto importante cuando se manejan grandes volúmenes de cultivo, como es el caso de la multiplicación de levaduras seleccionadas en forma de LSA (levadura seca activa).

Gracias a estas técnicas, el enólogo o elaborador de vino puede controlar mejor que tipo de cepas de levadura que está utilizando en la bodega en forma de inóculo iniciador, saber si ésta se implanta bien y si en definitiva, amortizar bien su inversión [45].

2.5.2.MÉTODOS CLÁSICOS DE IDENTIFICACIÓN

Tradicionalmente, los criterios en los que se basan los métodos utilizados para la identificación y clasificación de levaduras según sus características morfológicas y sus propiedades fisiológicas y bioquímicas son: entre los criterios morfológicos, se contaba con su reproducción vegetativa, sexual, esporulación, morfología celular, aspecto de colonia, etc., y entre los criterios fisiológicos y bioquímicos, la fermentación y asimilación de azúcares, poder fermentativo, asimilación de nitratos, escisión de la arbutina, etc.

Estas técnicas son complejas y en algunos casos pueden llevarnos a clasificaciones e identificaciones incorrectas, ya que se basan principalmente en el estudio del fenotipo y éste depende de las condiciones ambientales del desarrollo y del estado vegetativo o amorfo, lo que puede llevar a duplicar especies, como es el caso de *Brettanomyces bruxellensis* y *Dekkera bruxellensis*[45].

2.5.2.1. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN A NIVEL ESPECIE

Estas técnicas se basan en la caracterización e identificación de especies utilizando marcadores moleculares, normalmente de ADN, de cada especie o cepa [45].

1. *Secuenciación de genes ribosomales*: Los genes ribosomales presentan una secuencia bastante conservada a nivel de género y especie en los organismos Eucariotas, por lo que se trata de análisis genéticos muy útiles para establecer relaciones filogenéticas. La técnica consiste en amplificar estas regiones conservadas por PCR (Polymerase Chain Reaction) y posteriormente secuenciar los fragmentos amplificados.
2. *Análisis de perfiles de restricción de ADNr (RFLP)*: Esta técnica (Restriction Fragment Length Polymorphisms) consiste en el análisis de perfiles de restricción mediante la comparación de los patrones de restricción de diferentes regiones de la zona ribosomal. Ésta técnica es muy utilizada para la identificación de especies de interés enológico y en estudios ecológicos y de dinámica poblacional.
3. *FISH*: Se basa en la utilización de unas sondas de ADN o ARN marcados y un fluorocromo (Fluorescent In Situ Hybridization), que son capaces de hibridarse por tener ácidos nucleicos complementarios. Posteriormente a la hibridación, se observan las células marcadas al microscopio de fluorescencia. Es una técnica muy interesante, ya que permite diferenciar especies dentro de una misma muestra, utilizando sondas específicas y diferentes fluorocromos. Permite una buena exactitud en la diferenciación de especies, siendo útil para estudios de diversidad poblacional y detección de levaduras y bacterias alterantes del vino.

2.5.2.2. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN A NIVEL CEPA

A veces no es suficiente con la identificación de especies y es necesario entonces ir más allá. Para poder diferenciar a nivel de cepas, existen otras técnicas de biología molecular [45]:

1. *Cariotipo o separación de cromosomas en PFGE*: La separación de cromosomas se presenta como una técnica muy útil para diferenciar especies y también a nivel de cepas. Las diferentes cepas de una misma especie presentan una gran variabilidad en número y tamaño de cromosomas, presentando cariotipos diferentes. Este polimorfismo cromosómico se origina durante la reproducción. La técnica se basa en la separación de cromosomas en electroforesis de campos pulsados (Pulsed Field Gel Electrophoresis) que provoca una

reorientación molecular del ADN, que es diferente dependiendo del tamaño molecular. Con esta técnica se pueden realizar análisis de implantación de levaduras inoculadas en bodega, que normalmente se hacen mediante PCR por ser rápida y mas económica, pero en caso de incertidumbre, esta técnica es complementaria. También se emplea en los programas de selección de levaduras enológicas de cepas *Saccharomyces cerevisiae*.

2. *Análisis de restricción del ADN mitocondrial*: El ADNmt de la levadura es una pequeña molécula con variabilidad dentro de la especie, aunque existen técnicas más avanzadas que han simplificado el método mediante digestión total del ADN y utilización de enzimas de restricción (Querol et al. 1992). Esta técnica permite diferenciar cepas no solo en el género, sino que también lo consigue con otras levaduras de interés enológico, como por ejemplo *Brettanomyces* o *Zygosaccharomyces*.
3. *RAPD-PCR*: La técnica RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic ADN-PCR) consiste en amplificar al azar secuencias mediante la utilización de oligonucleótidos cortos de secuencia arbitraria. Estos oligonucleótidos hibridan de manera inespecífica y aleatoria a diferentes lugares del genoma, lo que permite la amplificación de fragmentos polimórficos de ADN. Para cada cepa se obtiene un número determinado de amplificaciones de diferente tamaño, lo que permite diferenciación entre cepas. La gran ventaja de esta técnica, es que no es necesario información previa de ninguna secuencia determinada y el principal inconveniente, es la reproducibilidad de resultados. Se utiliza esta técnica en estudios de implantación de cepas *Saccharomyces cerevisiae*, para estudios taxonómicos del grupo *Saccharomyces* y también para la caracterización de estirpes no-*Saccharomyces*.
4. *Microsatélites*: Los microsatélites son repeticiones en serie de secuencias cortas. Estas repeticiones están distribuidas a lo largo del genoma y son altamente variables entre especies. Este elevado polimorfismo hace que los microsatélites sean unos buenos marcadores moleculares para la identificación intra e íter específico. La variabilidad de estas secuencias es detectada mediante la amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos específicos. Se obtienen entonces perfiles de amplificación que permiten distinguir cepas de una misma especie.
5. *Secuencias delta*: Estos elementos son secuencias de 330 pares de base que están distribuidos de manera frecuente en el genoma de las levaduras. La técnica se basa en la utilización de cebadores específicos a estos elementos delta para amplificar las secuencias comprendidas entre estos elementos. Los elementos delta no están presentes en levaduras no-*Saccharomyces*, por lo tanto esta técnica es limitada para *Saccharomyces cerevisiae*.

-
6. *AFLP*: La técnica AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism) se basa en la amplificación selectiva mediante PCR de los fragmentos de restricción de la digestión total de ADN. La detección de polimorfismo se observa en un gel de poliacrilamida a través de electroforesis capilar. Es una técnica muy sensible y reproducible, pero requiere alta inversión y personal especializado, por lo que no es muy utilizada en enología.
 7. *PCR a tiempo real*: Detecta en tiempo real la amplificación de nuestro genoma de interés. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos pero casi todos basados en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que queremos amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia ("quencher"), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando.
 8. *Microarreglos*: La técnica de análisis del ADN mediante la utilización de microarrays, ha revolucionado la investigación y el desarrollo de estudios genómicos. La premisa básica de los microarrays de ADN es que las muestras de ARN o otros fragmentos de ADN estén hibridados a regiones conocidas de oligonucleótidos de ADN en los arrays. Gracias a la alta densidad de los modernos microarrays, se puede medir el nivel de expresión de genes funcionales. Se utilizan mucho en estudios de expresión de estrés en *Saccharomyces cerevisiae* y permite determinar la función celular de los genes. En general para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Por décadas, la producción de mezcal en el estado de Michoacán ha sido considerada como una actividad informal, la elaboración de esta bebida se ha circunscrito a algunas áreas específicas del territorio estatal, donde la materia prima se obtiene de poblaciones silvestres existentes en tierras de uso común de ejidos y comunidades agrarias, zona en donde proliferan más de una decena de especies; su explotación se realiza de manera sistemática, sin considerar criterios que permitan el repoblamiento natural, mermando cada vez más la disponibilidad del recurso [26].

Diversos acontecimientos históricos le han conferido el legado de una actividad ilícita (además de que se ha mantenido como una actividad rezagada, informal y considerada como una bebida para pobres) y sería de gran importancia para los productores que sea revalorada para convertirse en una agroindustria rentable de corto a mediano plazo que sirva como un impulso para el desarrollo de actividades como la explotación racional del recurso, fomentar la producción, industrialización y comercialización de este producto y contribuir a los ingresos y superación de la población en las comunidades rurales.

El aumento de la demanda del mezcal obliga a los productores a mantener una calidad aceptable y uniforme del producto, sin embargo el proceso que se utiliza para su elaboración es de manera artesanal sin control de ningún parámetro puesto que solo depende de las condiciones ambientales y en consecuencia este proceso tiene una baja eficiencia dando como resultado un producto que no cumple con las normas establecidas por el consejo regulador del mezcal.

Se han realizado estudios anteriores donde se demuestra el interés por el desarrollo de esta bebida sin embargo en Michoacán ha sido poco el desarrollo de la investigación y producción de mezcal ya que no es reconocido por la denominación de origen, pero actualmente está en proceso y se esperan buenos resultados con su aprobación.

4. JUSTIFICACIÓN

Michoacán busca el surgimiento de la industria mezcalera aprovechando que México cuenta con la denominación de origen y por el incremento de la exportación nacional de esta bebida al registrar un crecimiento del orden del 6.2% que permite obtener divisas por 14.8 millones de dólares. Sin embargo, los mercados nacionales e internacionales para el mezcal requieren de productos y procesos de elaboración estandarizados de calidad. En este sentido, el proceso vigente de manufactura en la industria del mezcal es totalmente artesanal basándose más en el conocimiento empírico que en el técnico-científico, que si bien le confiere características típicas al producto, también limita su comercialización al no contar con bases de ingeniería que permitan desarrollar e implementar procesos estables y eficientes.

El presente proyecto pretende proporcionar a los productores de mezcal de la región de Michoacán herramientas científicas y técnicas que les permitan hacer eficientes sus procesos. De las operaciones unitarias implicadas en el proceso de producción, la cocción y la fermentación son

consideradas las etapas críticas, de igual importancia y totalmente dependientes entre sí, actualmente no se ha seleccionado un cultivo iniciador debido a que no se tiene el conocimiento de la integración de este cultivo. Con base en lo anterior, y específicamente en la etapa de fermentación, es casi un hecho que el aislamiento del consorcio microbianos y caracterización de las levaduras presentes permitirá revelar las levaduras presentes en la etapa de fermentación y así posteriormente construir un cultivo iniciador para contribuir a el diseño de un proceso eficiente sin delimitar significativamente su origen artesanal que le distinguen dentro de las bebidas alcohólicas de origen entre el consumidor.

5. HIPÓTESIS

Mediante el aislamiento del consorcio microbiano se podrá dar a conocer los diferentes tipos de microorganismos presentes en la fermentación alcohólica natural del mezcal de tres mezcaleras de la región de Villa Madero, y la caracterización bioquímica y molecular de las levaduras se permitirá determinar el género y especie de las cepas de levaduras aisladas.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar molecularmente mediante la técnica RFLP así como a nivel bioquímico por medio de las técnicas BIOLOG y las pruebas estandarizadas API levaduras silvestres involucradas en la producción de mezcal de la región de Villa Madero, Michoacán.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- o Seleccionar muestras representativas del mosto de tres mezcaleras durante la etapa de la fermentación espontanea del mezcal.
- o Aislamiento e identificación parcial de los microorganismos que forman el consorcio de una fermentación espontanea de extracto de *Agave cupreata*, mediante técnicas convencionales de microbiología.
- o Extracción de DNA total de las levaduras.

-
- o Caracterización de las levaduras usando herramientas moleculares (RFLP).
 - o Generación de nuevos perfiles de restricción para identificación con las endonucleasas *Alu* I, *Dde* I, *ScrF* I y *Taq* I.
 - o Determinar la asimilación de compuestos carbonados de los aislados por medio de la técnica BIOLOG y pruebas estandarizadas API.
 - o Conservación del consorcio microbiano.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 MATERIALES

7.1.1 MATERIA PRIMA

Piñas de *Agave (cupreata)* de la región de Villa Madero Michoacán, para poder utilizar esta materia prima el agave o maguey debe cumplir con algunas características como: coloración verde-amarillenta en la base de las pencas y parda en la base del maguey, así como la presencia de pencas secas en esta zona, esta se usará en todos los ensayos para el desarrollo del proyecto.

7.1.2 EXTRACTO

Las piñas de agave se cocieron de manera tradicional en hornos contruidos a partir de un agujero cavado en la tierra donde en el fondo se coloca leña, se le prende fuego y arriba se ponen piedras para que alcancen la temperatura de cocción. Después se coloca el bagazo mojado, encina las piñas partidas en trozos, se tapan con pencas del agave y costales y por último se cubren con una capa de tierra, la cocción dura de tres a cuatro días. Las piñas cocidas serán prensadas para extraer su jugo o licor. La piña se obtuvo cocida y solo se realizó la operación de extracción del jugo.

7.1.3 MEDIOS DE AISLAMIENTO Y SELECCIÓN

A. Agar YPD enriquecido

Extracto de levadura	10g
Bactopeptona	10g
Glucosa-Dextrosa	10g
Jugo de agave	42ml
Agar bacteriológico	20g

Suspender los componentes en un litro de agua destilada, ajustar el pH con HCl concentrado a 5.5 y hervir un minuto. Autoclave 121°C, 15 min.

B. Agar Biggy

Citrato de amonio y bismuto	5g
Sulfito de sodio	3g
Dextrosa	10g
Glicina	10g
Extracto de levadura	1g

Suspender 45g de la mezcla en polvo en un litro de agua destilada y hervir un minuto. pH final 6.8. Autoclave 121°C, 15 min.

C. Agar Mueller Hinton

Infusión de carne	300g
Peptona ácida de caseína	17.5g
Almidón	1.5g
Agar	15g

Suspender 37g del medio en polvo en un litro de agua destilada y hervir un minuto. pH final 7.3. Autoclave 121°C, 15 min.

D. Agar Papa Dextrosa (PDA)

Infusión papa	4g
Dextrosa	20gr
Agar	15gr

Suspender 39g de la mezcla en polvo en un litro de agua destilada y hervir un minuto. pH final 5.6. Autoclave 121°C, 15 min.

E. Agar soya tripticaseína

Peptona de caseína	15g
Peptona de soya	5g
Cloruro de sodio	5g
Agar bacteriológico	15g

Suspender 40g de la mezcla en polvo en un litro de agua destilada y hervir un minuto. pH final 7.3. Autoclave 121°C, 15 min.

F. Agar infusión cerebro-corazón (BHI)

Infusión de cerebro de ternera y corazón de res	8g
Peptona de carne	5g
Peptona de caseína	16g
Cloruro de sodio	5g
Dextrosa	2g
Fosfato disódico	2.5g
Agar bacteriológico	13.5g

Suspender 37g de la mezcla en polvo en un litro de agua destilada y hervir un minuto. pH final 7.4. Autoclave 121°C, 15 min.

Es adecuado para el cultivo de microorganismos exigentes entre los cuales se encuentran hongos, bacterias y levaduras.

7.1.4 ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas (ó endonucleasas) de restricción son unas proteínas con acción catalítica que tienen la propiedad de reconocer secuencias cortas, de unos cuatro o seis pares de bases en el ADN de doble hebra, y cortar en todos los puntos donde se encuentre dicha secuencia. Este lugar de corte o sitio de reconocimiento se denomina sitio de restricción. Cada enzima de restricción tiene una diana particular en el ADN, y la enzima rompe un enlace fosfodiéster en la hebra de arriba y otro enlace fosfodiéster en la hebra complementaria.

Las endonucleasas que se utilizaron son: *Alu* I (Invitrogen ®), *Dde* I (BioLabs_{INC}), *Hae* III (Invitrogen ®), *Hha* I (Invitrogen ®), *HinF* I (Invitrogen ®), *ScrF* I (BioLabs_{INC}) y *Taq* I (Invitrogen ®). A continuación se muestran los sitios de corte de cada enzima (Tabla 3).

Tabla 3. Enzimas de Restricción y sitios de corte.

ENZIMAS	SITIO DE CORTE
<i>Alu</i> I	5'-----AG CT-----3' 3'-----TC GA-----5'
<i>Dde</i> I	5'-----C TNAG-----3' 3'-----GNAT C-----5'
<i>Hae</i> III	5'-----GG CC-----3' 3'-----CC GG-----5'
<i>Hha</i> I	5'-----GCG C-----3' 3'-----C GCG-----5'
<i>Hinf</i> I	5'-----G ANTC-----3'

3'-----CTNA G-----5'

ScrF I

5'-----CC NGG-----3'

3'-----GGN CC-----5'

Taq I

5'-----T CGA-----3'

3'-----AGC T-----5'

7.2 MÉTODOS EXPERIMENTALES

7.2.1 AISLAMIENTO. OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y CULTIVOS

Con un asa de siembra, previamente esterilizada, se toma una muestra de fermento y se extiende sobre un área pequeña de la superficie de la caja de Petri con medio enriquecido YPD (Yeast, Peptone, Dextrose) y jugo de agave para las levaduras, medio Mueller Hinton para el aislamiento de bacterias y medio PDA en el caso de hongos filamentosos, en forma de estrías muy juntas pero sin hacer presión para no dañar el agar. Se flamea el asa, se enfría y después de rozar la siembra realizada previamente, se extiende de nuevo por otra zona de la caja de petri haciendo nuevas estrías. Este proceso se repite sucesivamente, flameando y enfriando el asa al comienzo de las sucesivas siembras en estría. Se lleva la caja petri a incubar, a 30°C durante 48 horas, siempre en posición invertida. Mediante esta técnica se obtienen colonias aisladas a partir de una muestra que contenga un elevado número de microorganismos.

Posteriormente se obtuvieron cultivos mixtos de las diferentes levaduras presentes en la muestra de fermento, de ahí se sembraron en placas de medios de cultivo cada uno de los diferentes tipos de

microorganismos que se desarrollaron y se realizaron las resiembras suficientes hasta obtener los cultivos puros.

7.2.2 ANALISIS MACROSCOPICO Y MICROSCÓPICO BAJO CRITERIOS MORFOLOGICOS.

Para evitar duplicidad de los microorganismos aislados, a cada cultivo se le realizaron análisis macroscópicos, microscópicos y crecimiento en medios selectivos.

Cada cultivo fue analizado macroscópicamente basado en criterios morfológicos de tamaño, forma, margen, color, elevación, superficie, densidad y consistencia de las colonias desarrolladas. En el caso de los análisis microscópicos se procedió a la observación macro y microscópica de cada cepa de levadura mediante tinciones con azul de metileno las muestras se extendieron de forma fina sobre un portaobjetos y se fija pasándolo unas veces por la llama del mechero, posteriormente se agregó una gota de azul de metileno y se coloca el cubreobjetos para su observación al microscopio en el caso de las bacterias, tinción de Gram y azul de lactofenol para los hongos. Cada muestra fue analizada con base a las características morfológicas celulares.

La técnica de tinción Gram consiste en: Preparar un extendido fino del material en estudio y dejarlo secar al aire. Posteriormente se fija el material al portaobjeto de modo que no sea arrastrado durante el proceso de tinción, pasando el portaobjeto 3 o 4 veces por la llama de un mechero Bunsen. Se coloca el preparado sobre un soporte de tinción y cubrir la superficie con solución de cristal violeta. Luego de un minuto de exposición al cristal violeta, lavar bien con agua destilada. Se cubre el preparado con lugol durante un minuto y lavar nuevamente con agua destilada. Bañar la superficie del porta objetos con unas gotas de decolorante alcohol-acetona (70% alcohol etílico – 30% acetona) hasta no arrastrar más colorante violeta. Se cubre la superficie con contracolor safranina durante un minuto y lavar con agua. Por último se colocar el preparado sobre un soporte de tinción en posición vertical, dejando que escurra el exceso de agua y se seque.

Examinar el preparado al microscopio con objetivo 100 X de inmersión (aceite). Las bacterias Gram positivas se tiñen de color oscuro; las bacterias Gram negativas aparecen rosadas.

7.2.3 ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE LAS LEVADURAS AISLADAS.

De un cultivo de medio YPD líquido de 24 horas a 30°C, la biomasa fue recuperada por centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos, se tiró el sobrenadante y se volvió a centrifugar obteniendo en el tubo la pastilla, se agregó 20 ml de agua y se agitó en el vortex, se centrifugó nuevamente y se lavó dos veces la pastilla.

Previamente, las perlas de vidrio utilizadas se lavaron agregando etanol al 90% en un tubo Falcom de 100 ml que ya contenía las perlas y se dejó por 1 hora, se retiró el alcohol y se enjuagó con agua estéril, después se les retiró el agua, se extendieron en una charola y se colocó en el horno a 90°C durante 1 hora. Por último se vaciaron las perlas hasta 5 ml en tubos Eppendorf de 30 ml y se esterilizaron.

7.2.3.1 AISLAMIENTO DE DNA GENÓMICO

Materiales:

- o YPD
- o Perlas de vidrio
- o Buffer de ruptura *
- o Fenol/Cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v)
- o Buffer TE 1X *
- o PBS 1X *
- o 1 mg/ml de RNasa A
- o Acetato de amonio 4 M *
- o Etanol al 100%
- o Tubos estériles de 1.5 ml y tubos de vidrio para cultivo 18 x 150 mm.

*Preparación de soluciones marcadas

Buffer de ruptura TSNTE:

- o 2% (v/v) Triton 100X
- o 1%(p/v) SDS
- o 100 mM NaCl
- o 10 mM Tris-Cl pH 8.0
- o 1 mM EDTA

Buffer TE 1X :

- o 10 mM Tris-Cl, pH 7.4-8.0
- o 1 mM EDTA, pH 8.0

Acetato de amonio 4 M :

Solución Stock de amonio 10M. Disolver 38.54 g de amonio en 30 ml de agua destilada y completar a 50 ml. Para solución 4M, diluir 16 ml de la solución stock y completar con agua destilada a 40 ml.

Las células recuperadas se resuspendieron con TE (0.121% basa Trizma, 0.0372% ácido acético tetra-etilendiamina (EDTA) a pH 8 ajustado con ácido clorhídrico). Se adicionaron perlas de vidrio, previamente limpiadas y estériles, y solución TSNTE (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 1 mM), se agitó y se incubó en hielo 5 minutos. Se adicionó fenol y se colocó la mezcla en el vortex. Se recuperó el sobrenadante y se le agregó acetato de sodio 3 M mezclando suavemente. Se agregó etanol 100% frío y se incubó a 20°C durante 20 minutos. Después se centrifugó y la pastilla se resuspendió en agua y RNAasa. Se incubó a 37°C en agitación por 30 minutos. Posteriormente se le agregó acetato de amonio 4 M y etanol 100% frío, se incubó a 20°C hasta que precipitara. Se centrifugó y la pastilla se lavó con etanol al 70%. La pastilla se resuspendió en agua destilada libre de nucleasas estéril.

7.2.3.2 CUANTIFICACIÓN

Se realizó la cuantificación de ADN en un biofotómetro, Eppendorf® Biophotometer a una longitud de onda de 260 Ampers. Se agregó a la celda agua libre de nucleasas para calibrar. Después se agregó a la celda 49 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl de muestra de ADN, se colocó la celda en el biofotómetro y se realizó la lectura.

Para calcular la cuantificación se utilizó un factor establecido, el cual corresponde a 50 para ADN y 40 Para RNA y se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Cuantificación} = \frac{\text{densidad óptica } 260 \text{ nm} \times \text{Factor} \times \text{Dilución}}{1000} = \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$$

7.2.3.3 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Las muestras de ADN se sometieron a un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.40 M y EDTA 0.001 M) a 100 Volts, como fuente de poder se utilizo el Power Pac® Basic de Bio-Rad®. Las muestras de DNA se mezclaron antes de ser corridas en el gel con un amortiguador de carga (azul de bromofenol al 0.05%, EDTA 0.1 M pH 8, SDS 0.5%, sacarosa 40%), el gel se visualizó a través de una tinción en una solución de bromuro de etidio al 0.01%. el gel teñido se observó en un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta, UV Transilluminator UVP®.

7.2.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

7.2.4.1 PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)

Las colonias de levaduras aisladas de interés fueron identificadas mediante la amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de la región de los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) que comprende el gen ribosomal 5.8S (Figura 10), dicha técnica fue adaptada de la descrita por Esteve-Zarzoso y col., en 1999. Las regiones ITS-5.8S rADN fueron amplificadas con los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-

TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). La amplificación fue realizada en un termociclador programado bajo las siguientes condiciones:

Tabla 4. Condiciones de tiempo y temperatura de PCR.

Condiciones del amplificado (30 ciclos)				
Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
95°C/5 min	94°C/1 min	52°C/2 min	72°C/2 min	72°C/10 min

El producto de PCR se conserva a 4°C.

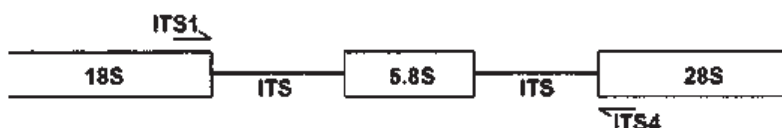


Figura 9. Región del gen rRNA amplificado por PCR con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4.

Preparación de la muestra:

- 5 µl de buffer 10X mas Cloruro de magnesio (50 mM)
- 1 µl de cada uno de los primers (ITS1 y ITS4, 10pmol/ µl cada uno)
- 2 µl de dNTPs (Boehringer Mannheim) a 10 mM.
- 1 µl de Taq- polimerasa (5 U/ µl)
- 3 µl de ADN genómico (templado)
- 37 µl de H₂O (estéril inyectable)
- 100 µl de volumen de reacción.

GEL PARA VISUALIZACIÓN DEL AMPLIFICADO

Las muestras de PCR se sometieron a un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.40 M y EDTA 0.001 M) a 100 volts. Las muestras de DNA se mezclaron antes de ser corridas en el gel con un amortiguador de carga (azul de bromofenol al

0.05%, EDTA 0.1 M pH 8, SDS 0.5%, sacarosa 40%), el gel se visualizó a través de una tinción en una solución de bromuro de etidio al 0.01%. el gel teñido se observó en un transluminador de luz ultravioleta de onda corta, UV Transilluminator UVP®. Como marcador de peso molecular se utilizó una de 100 pb. Los productos de PCR se conservaron a 4 °C.

7.2.4.2 DIGESTIONES CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Los productos de PCR fueron digeridos con las endonucleasas de restricción: *Alu* I (Invitrogen ®), *Dde* I (BioLabs_{INC}), *Hae* III (Invitrogen ®), *Hha* I (Invitrogen ®), *HinF* I (Invitrogen ®), *ScrF* I (BioLabs_{INC}) y *Taq* I (Invitrogen ®).

Preparación de la muestra:

8 µL del ADN amplificado

2 µL de buffer correspondiente según la enzima

0.5 µL de enzima

9.5 µL de H₂O libre de nucleasas

Incubar a 37 °C durante 45 min excepto con la enzima *Taq* I a una temperatura de 65 °C durante 45 minutos.

Las digestiones se sometieron a un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.40 M y EDTA 0.001 M) a 100 voltios. Las muestras de DNA se mezclaron antes de ser corridas en el gel con un amortiguador de carga (azul de bromofenol al 0.05%, EDTA 0.1 M pH 8, SDS 0.5%, sacarosa 40%), el gel se visualizó a través de una tinción en una solución de bromuro de etidio al 0.01%. el gel teñido se observó en un transluminador de luz ultravioleta de onda corta, UV Transilluminator UVP®. Como marcador de peso molecular se utilizó una de 100 pb.

7.2.5 CARACTERIZACIÓN BIQUÍMICA

7.2.5.1 PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE LABORATORIO.

Se realizaron pruebas bioquímicas a las levaduras en tubos de ensaye las cuales fueron: Manitol, Sacarosa, Malta-Sal- Glucosa, Dextrosa, Malta-Dextrosa, Xilosa, D-(+) Trealosa, D-Fructosa,

Rafinosa, Malta- Ac. Acético. Con una base para caldo rojo de fenol esto para una determinación exacta de la fermentación de dichos carbohidratos.

7.2.5.2 PRUEBAS BIOQUÍMICAS ESTANDARIZADAS (SISTEMA API)

Ensayos enzimáticos específicos y pruebas de asimilación de sustratos fueron realizados a cada cultivo puro utilizando diferentes galerías del sistema API (API 20C AUX para la identificación de levaduras. API 20 E para la identificación de especies y sub-especies de *Enterobacteriaceae* y grupos y especies de bacterias Gram negativas no fermentadoras y la galería API 20 NE para la identificación de bacterias gram negativas no- *Enterobacteriaceae*). Cada galería está constituida por 20 capsulas que contienen sustratos deshidratados, permitiendo efectuar 19 ensayos de asimilación (tabla 5, 6 y 7). Las capsulas se inoculan según las indicaciones de cada galería, los microorganismos que crecen son los capaces de utilizar cada sustrato correspondiente. Cada galería fue analizada e interpretada con base al software APILAB Plus. En el caso de las levaduras se tomaron lecturas a las 24 hrs. 48 hrs y 72 hrs para las bacterias a las 24 hrs y 48 hrs.

Tabla 5. Sustratos de la galería API 20C AUX.

	0	G	G	2	A	X	A	X	G	I	S	M	N	C	L	M	S	T	M	R	H
Galería		L	L	K	R	Y	D	L	A	N	O	D	A	E	A	A	A	R	L	A	Y
API 20C		U	Y	G	A	L	O	T	L	O	R	G	G	L	C	L	C	E	Z	F	P
AUX																					

Tabla 6. Sustratos de la galería API 20 NE.

Galería		T	G	A	U	E	G	P	G	A	M	M	N	M	G	C	A	M	C	P	O
API	NO ₂ / N ₂	R	L	D	R	S	E	N	L	R	N	A	A	A	N	A	D	L	I	A	X
20NE	NO ₃	P	U	H	E	C	L	G	U	A	E	N	G	L	T	P	I	T	T	C	

Tabla 7. Sustratos de la galería API 20 E.

Galería		O	A	O	C	H	U	T	I	V	G	G	M	I	S	R	S	M	A	A	O
API	NO ₂ / N ₂	N	D	D	I	2	R	D	N	P	E	L	A	N	O	H	A	E	M	R	X
20E	NO ₃	P	H	C	T	S	E	A	D		L	U	N	O	R	A	C	L	Y	A	
		G																			

7.2.5.3 BIOLOG.

A cada cultivo puro se le realizaran ensayos enzimáticos específicos y de asimilación de sustratos utilizando el equipo Biolog Systems el cual puede identificar rápidamente más de 2,500 especies de bacterias aerobias y anaerobias, levaduras y hongos basado en la capacidad que tienen los diferentes microorganismos para utilizar compuestos como fuente de carbono, nitrógeno y azufre induciendo un cambio de color. Se basa en pruebas por la oxidación de 95 sustratos en una placa de 96 micropozos. Cada pozo contiene un colorante redox, tetrazolium de violeta que permite la determinación colorimétrica del incremento de la respiración la cual ocurre cuando las células se oxidan en una fuente de carbono [49]. Obtenidos los aislados se procede a una resiembra de los aislados en medio BUG se incuba a 32°C durante 72 horas. Posteriormente ocurre la preparación del fluido a 47%T. Se inoculan las microplacas con 100µl de fluido. Se incuban la placa BIOLOG a 32°C durante 48 h. Tomando las lecturas en el sistema BIOLOG a las 24 h, 48 h y 72 h de la incubación (fig. 10)

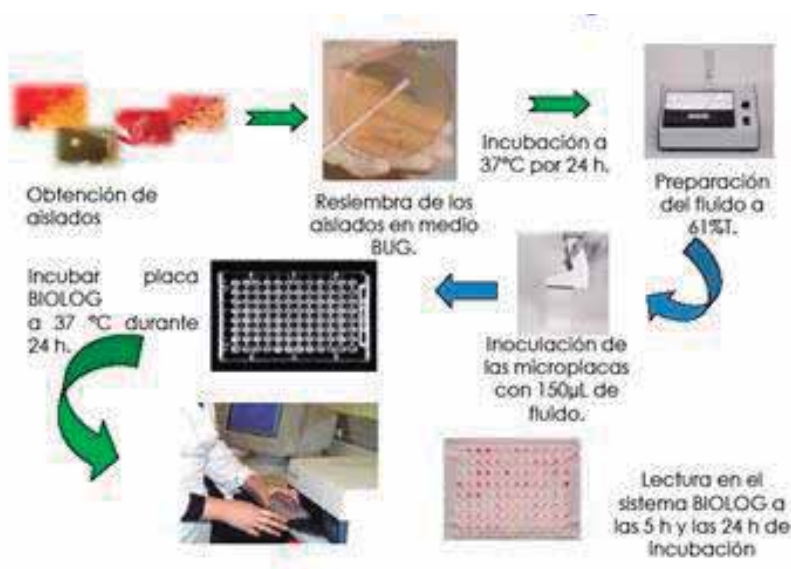


Figura 10. Metodología empleada en el uso del BIOLOG

En el caso de las levaduras se emplean placas YT que contienen 95 sustratos diferentes (fig. 11)

A1 water	A2 acetic acid	A3 formic acid	A4 propionic acid	A5 succinic acid	A6 methyl succinate	A7 L- aspartic acid	A8 L- glutamic acid	A9 L- proline	A10 D- glutamic acid	A11 dextrin	A12 inulin
B1 cellulose	B2 gentiobiose	B3 maltose	B4 maltotriose	B5 D- melzitose	B6 D- melibiose	B7 palatinose	B8 D- raffinose	B9 stachyose	B10 sucrose	B11 D- trehalose	B12 lutanose
C1 N-acetyl-D- glucosamine	C2 α-D- glucose	C3 D- galactose	C4 D- pectose	C5 L- sorbose	C6 salicin	C7 D- mannitol	C8 D- sorbitol	C9 D- arabitol	C10 xytol	C11 glycerol	C12 tween 80
D1 water	D2 lactic acid	D3 L- malic acid	D4 methyl succinate	D5 bromo succinic acid	D6 L- glutamic acid	D7 γ- amino butyric acid	D8 α- keto- glutaric acid	D9 2- keto- D- glutaric acid	D10 D- glutamic acid	D11 dextrin	D12 inulin
E1 cellulose	E2 gentiobiose	E3 maltose	E4 maltotriose	E5 D- melzitose	E6 D- melibiose	E7 palatinose	E8 D- raffinose	E9 stachyose	E10 sucrose	E11 D- trehalose	E12 lutanose
F1 N-acetyl-D- glucosamine	F2 α-D- glucosamine	F3 α-D- glucose	F4 D- galactose	F5 D- pectose	F6 L- mannose	F7 L- sorbose	F8 α- methyl- D- glucoside	F9 β- methyl- D- glucoside	F10 amygdalin	F11 arbutin	F12 salicin
G1 maltitol	G2 D- mannitol	G3 D- sorbitol	G4 adonitol	G5 D- arabitol	G6 xytol	G7 erythritol	G8 glycerol	G9 tween 80	G10 L- arabinose	G11 D- arabinose	G12 D- ribose
H1 D- xylitol	H2 methyl succinate + D- xylitol	H3 N- acetyl- L- glutamic acid + D- xylitol	H4 quinic acid + D- xylitol	H5 D- glutaric acid + D- xylitol	H6 dextrin + D- xylitol	H7 α- D- lactose + D- xylitol	H8 D- melibiose + D- xylitol	H9 D- galactose + D- xylitol	H10 m- inositol + D- xylitol	H11 1,2- propanediol + D- xylitol	H12 sorbitin + D- xylitol

Figura 11. Sustratos de la placa YT para el BIOLOG

8. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

8.1.SITIO DE ORIGEN, MUESTREO Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

A partir de muestras de medio fermentado tomadas a tres diferentes mezcaleras ME1, ME2 y ME3 se realizó una resiembra en placa de cada muestra con una asa de cultivo en medio sólido enriquecido YPD , posteriormente se incubó las placa sembrada a una temperatura de 32 ° C durante 48 horas. Se prosiguió realizando las resiembras por estría suficientes en placa con medio enriquecido YPD hasta obtener cultivos puros de las levaduras. También se obtuvo una muestra del agave *cupreata* inoculando con hisopos estériles. Se analizó el crecimiento bacteriano en medio solido Mueller Hinton compuesto de Extracto de carne, Peptona de caseína ácida, almidón y agar de las muestras tomadas a las mezcaleras y del agave *cupreata*. El muestreo se realizó en frascos de vidrio con tapa de rosca previamente esterilizados, tomando aproximadamente 150 ml de muestra del tanque de fermentación.



a)



b)

Figura 12. Inoculación a) en placa de la muestra del agave. b) En placa de los fermentos de las ME1, ME2 y ME3.

8.2. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

Se realizó una resiembra en placa de cada muestra con una asa de cultivo en medio sólido enriquecido YPD compuesto de peptona (10 g/L), extracto de levadura (10 g/L), glucosa (20 g/L) y agar (20 g/L), posteriormente se incubó la placa sembrada a una temperatura de 32 °C durante 48 horas. Se prosiguió realizando las resiembras suficientes en placa con medio enriquecido YPD hasta obtener cultivos puros de las levaduras (figura 10) . Se analizó la existencia de crecimiento bacteriano en medio solido Mueller Hinton compuesto de Extracto de carne, Peptona de caseína ácida, almidón y agar de las muestras tomadas a las mezcaleras y del agave *cupreata*. Los hongos filamentosos se resembraron en una infusión de papa (4.0 g), Dextrosa (20.0 g) y Agar (15.0 g) (PDA).Se aislaron 12 cepas de levaduras en medio sólido YPD, 9 cepas de bacterias en medio sólido Mueller Hinton y 8 tipos de hongos filamentosos en medio sólido PDA.

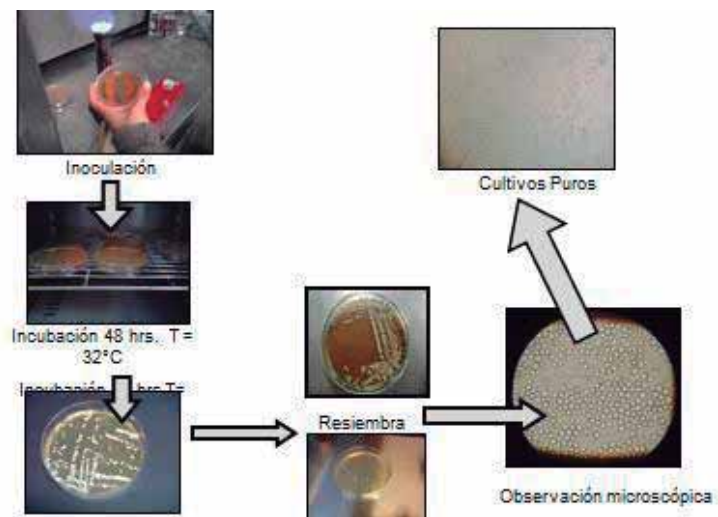


Figura 13. Aislamiento del consorcio microbiano asoc. a la fermentación alcohólica.

En la siguiente (tabla 8) se muestra las procedencias de cada microorganismo.

Tabla 8. Consorcios encontrados en las tres mezcaleras estudiadas y el agave cupreata.

M.O	Proc.	M.O	Proc.	M.O	Proc.	M.O	Proc.
Lev. 1	ME1	Lev. 3	ME2	Lev. 4	ME3	Hongo 1	Agave
Lev. 2	ME1	Lev. 6	ME2	Lev. 7	ME3	Hongo 2	Agave
Lev. 5	ME1	Lev. 9	ME2	Lev. 10	ME3	Hongo 5	Agave
Lev. 8	ME1	Lev. 11	ME2	Lev. 12	ME3		
Bact. 1	ME1	Bact. 2	ME2	Bact. 3	ME3		
Bact. 4	ME1	Bact. 5	ME2	Bact. 6	ME3		
Bact. 8	ME1	Bact. 7	ME2				
Hongo 3	ME1	Hongo 4	ME2				
		Hongo 6	ME2				

8.3. ANÁLISIS MACROSCÓPICO Y MICROSCÓPICO DEL CONSORCIO MICROBIANO.

Los aislados obtenidos fueron analizados macroscópicamente y microscópicamente de acuerdo a su morfología y sus características físicas, estructurales y tinción celular. El análisis de características físicas fue realizado a nivel macroscópico (que se basa en la morfología colonial) y microscópico (que se basa en las características celulares como forma, disposición celular, presencia de estructuras específicas y tinción celular). Los resultados de morfología colonial muestran que los cultivos de levaduras (Fig. 14-16) presentan características físicas muy similares: formas ovoides, alargadas, elipsoides o redondas de tamaño grande (comparado con las bacterias) y no presentan formación de agregados (típico de las bacterias), características que en general le corresponden a levaduras (Fig. 17-24). No obstante, de considerarse el análisis macro y microscópico como insuficiente para la diferenciación entre los cultivos aislados que permitan considerarlos como cultivos puros, si puede servir como referencia para complementar los análisis basados en sus capacidades metabólicas o necesidades nutricionales. (Tabla 5 y6).

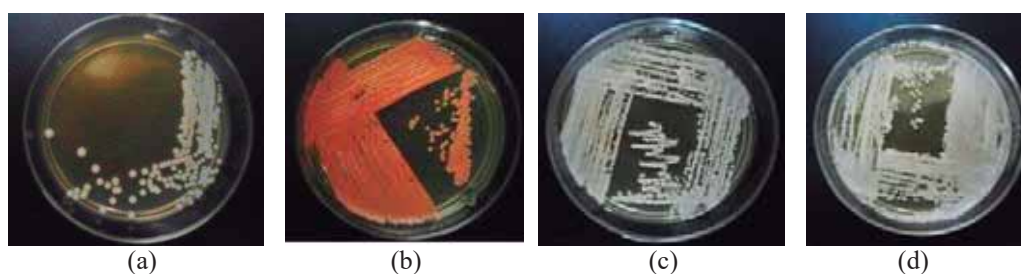


Figura 14. Cultivos puros de levaduras en medio enriquecido YPD.(a) *Lev1* ME1, (b) *Lev 2* ME1, (c)*Lev 5* ME1(d) *Lev 8* ME1.

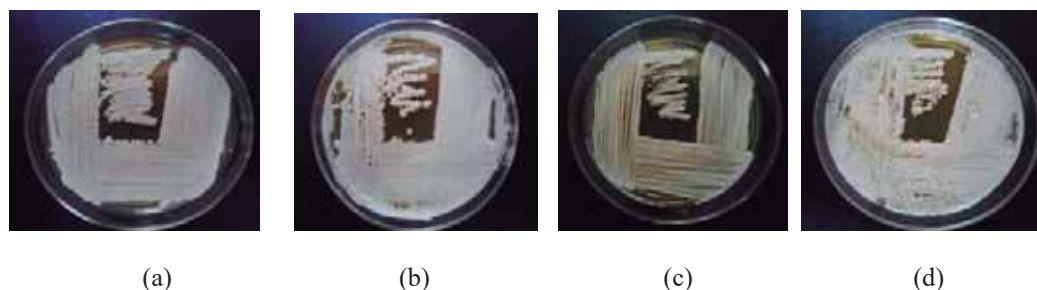


Figura 15. Cultivos puros de levaduras en medio enriquecido YPD, 48 h, 30°C.(a) *Lev 3* ME2, (b) *Lev 6* ME2, (c)*Lev 9* ME2(d) *Lev 11* ME2.

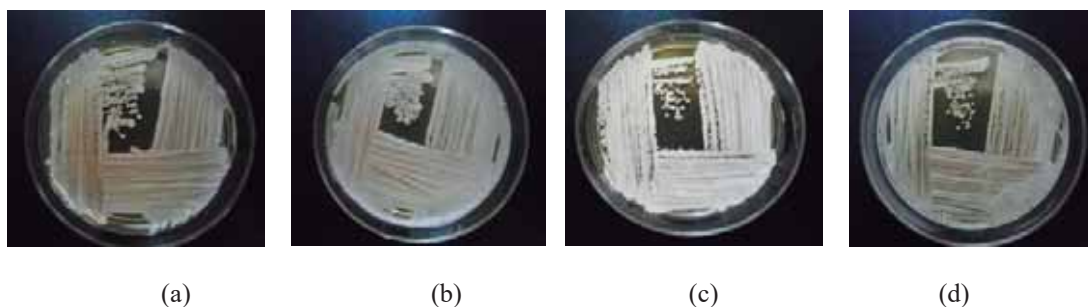


Figura 16. Cultivos puros de levaduras en medio enriquecido YPD, 48 h, 30°C..(a) *Lev 4* ME3, (b) *Lev 7* ME3, (c) *Lev 10* ME3(d) *Lev 12* ME3.

Tabla 9. Características morfológicas de las levaduras.

NOMBRE	TAMAÑO	FORMA	ELEVACIÓN	MARGEN	COLOR	SUPERFICIE	DENSIDAD	CONSISTENCIA
Lev. 1	2 mm	Circular	Pulvinada	Entero	Beige	Mate	Opaca	Cremosa
Lev. 2	2 mm	Circular	Convexa	Entero	Rosa	Brillante	Opaca	Cremosa
Lev. 3	1.8 mm	Circular	Pulvinada	Entero	Beige	Mate	Opaca	Cremosa
Lev. 4	2 mm	Circular	Convexa	Entero	Beige	Mate	Opaca	Cremosa
Lev. 5	1.6 mm	Irregular	Plana	Ondulado	Beige Obscuro	Mate- Brillante	Opaca	Cremosa
Lev. 6	1.7 mm	Irregular	Plana	Ondulado	Beige	Brillante	Opaca	Cremosa
Lev. 7	1.2 mm	Irregular	Plana	Ondulado	Beige	Mate	Opaca	Cremosa
Lev. 8	1.4 mm	Irregular	Elevada	Entero	Blanco	Mate	Opaca	Cremosa
Lev. 9	1.8 mm	Circular	Pulvinada	Entero	Blanco	Brillante	Opaca	Cremosa
Lev. 10	1.5 mm	Irregular	Aplastada	Ondulado	Blanco	Mate	Opaca	Cremosa
Lev. 11	1.5 mm	Irregular	Aplastada	Rizado	Blanco	Brillante	Opaca	Cremosa
Lev. 12	1.7 mm	Circular	Convexa	Ondulado	Beige	Brillante	Opaca	Cremosa

-
- o Observación microscópica de las levaduras encontradas en la Mezcalera Etucuario 1.

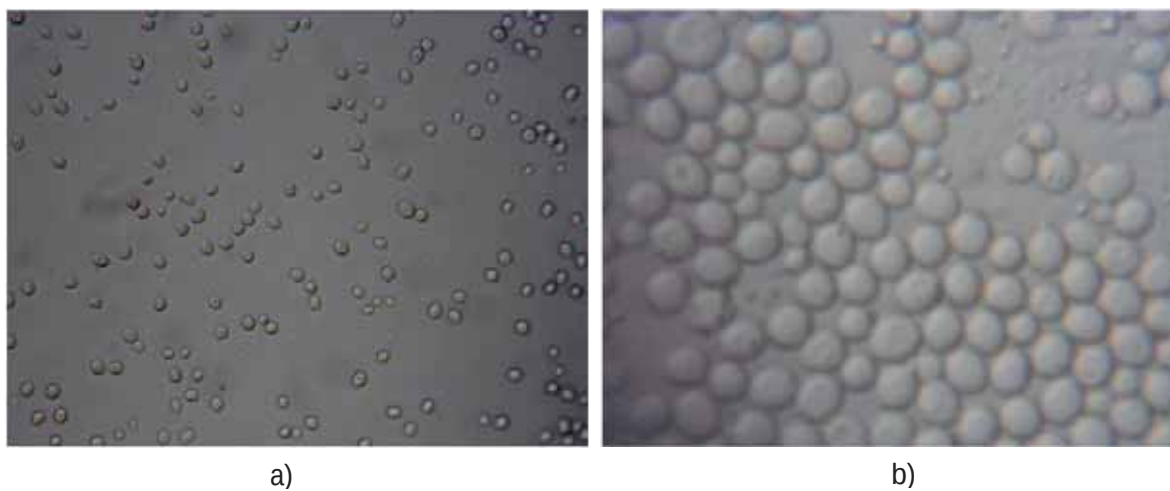


Figura 17. Observación microscópica la levadura 1 ME1. a) 40 X, b) 100 X.

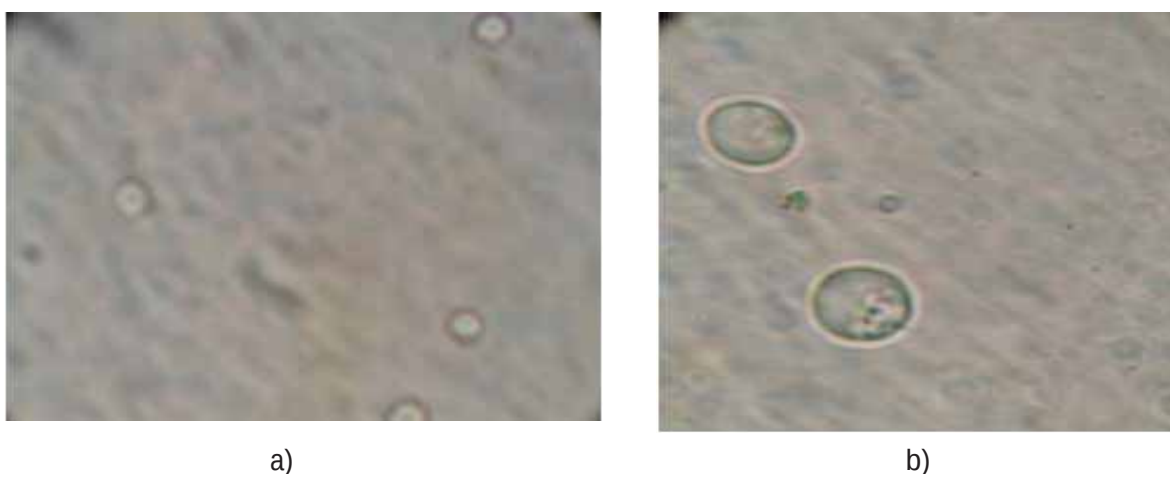
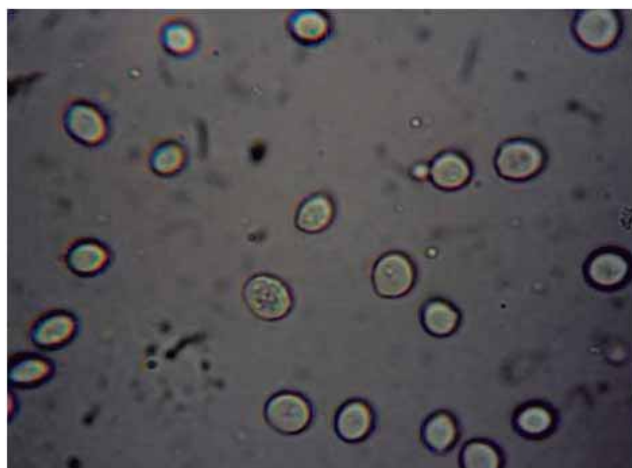


Figura 18. Observación microscópica la levadura 2 ME1. a) 40 X, b) 100 X.

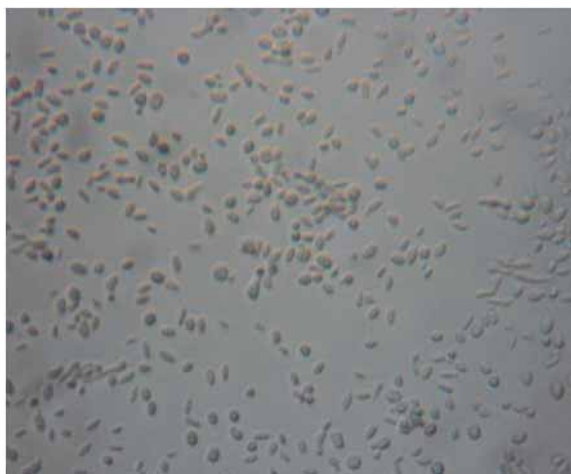


a)

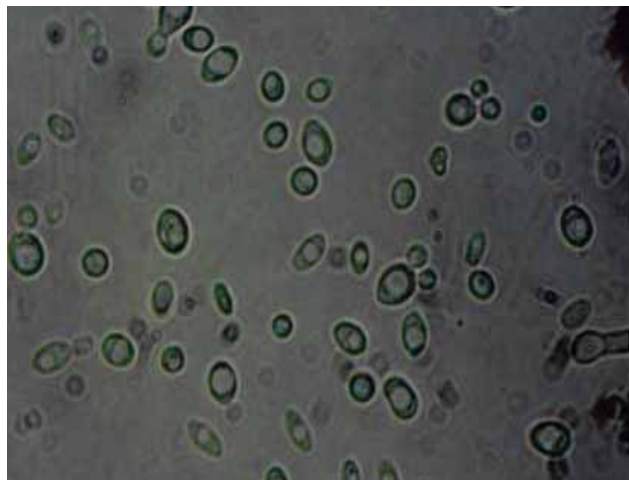


b)

Figura 19. Observación microscópica la levadura 5 ME1. a) 40 X, b) 100 X.



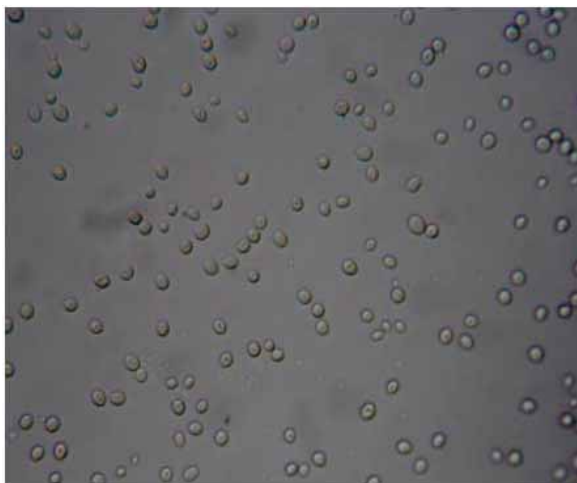
a)



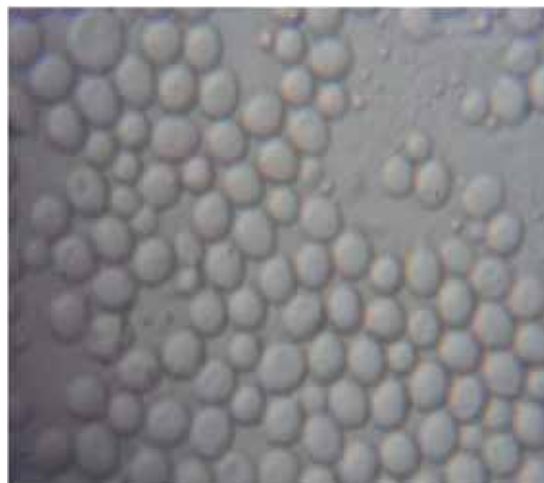
b)

Figura 20. Observación microscópica la levadura 8 ME1. a) 40 X, b) 100 X.

o Observación microscópica de las levaduras encontradas en la Mezcalera Etucuario 2.

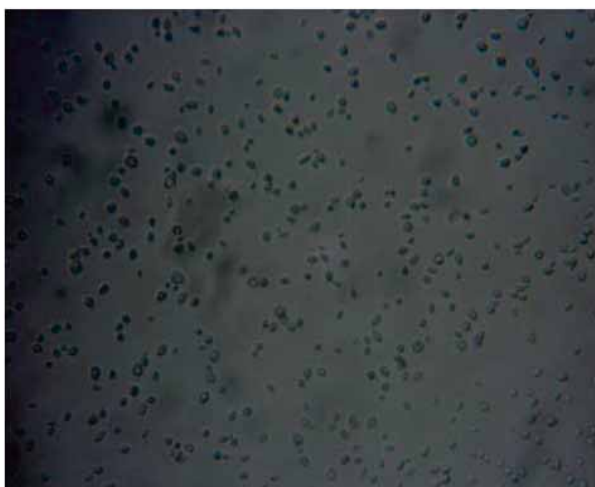


a)

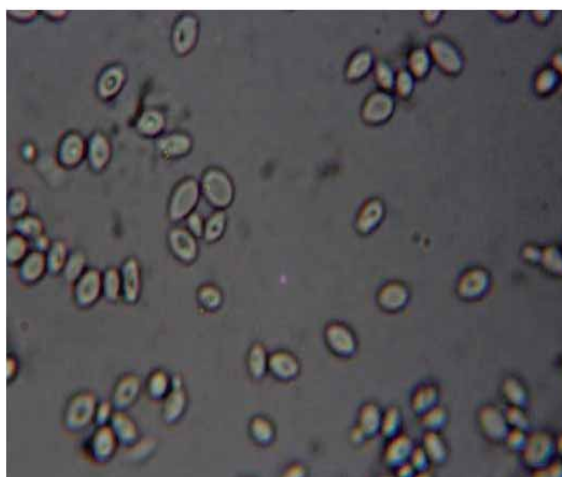


b)

Figura 21. Observación microscópica la levadura 3 ME2. a) 40 X, b) 100 X.

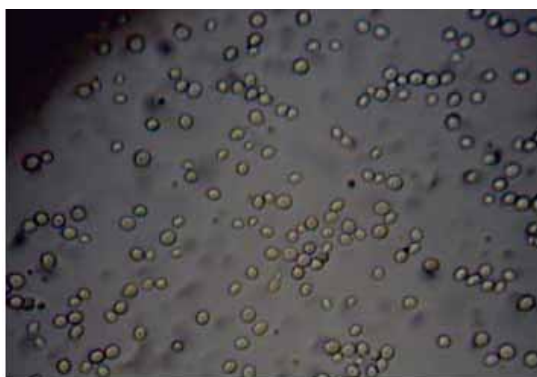


a)

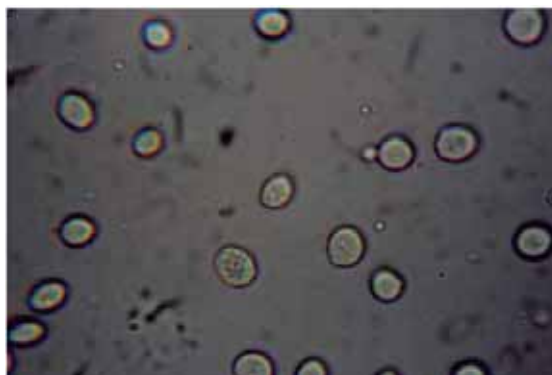


b)

Figura 22. Observación microscópica la levadura 6 ME2 . a) 40 X. b) 100 X.

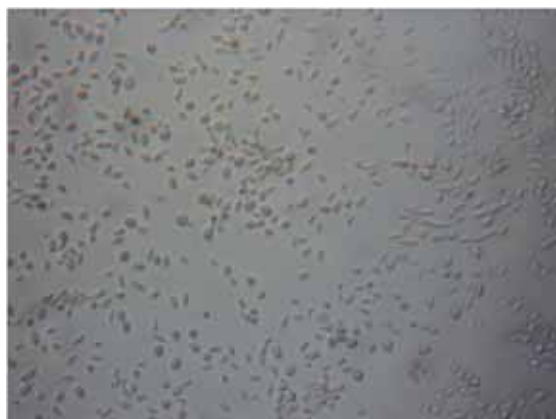


a)

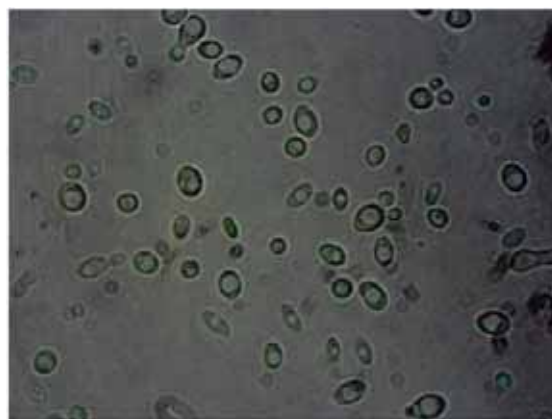


b)

Figura 23. Observación microscópica la levadura 9 ME2. a) 100 X, b) 40 X.



a)



b)

Figura 24. Observación microscópica la levadura 11 ME2. a) 100 X, b) 40 X.

o Observación microscópica de las levaduras encontradas en la Mezcalera Etucuario 3.

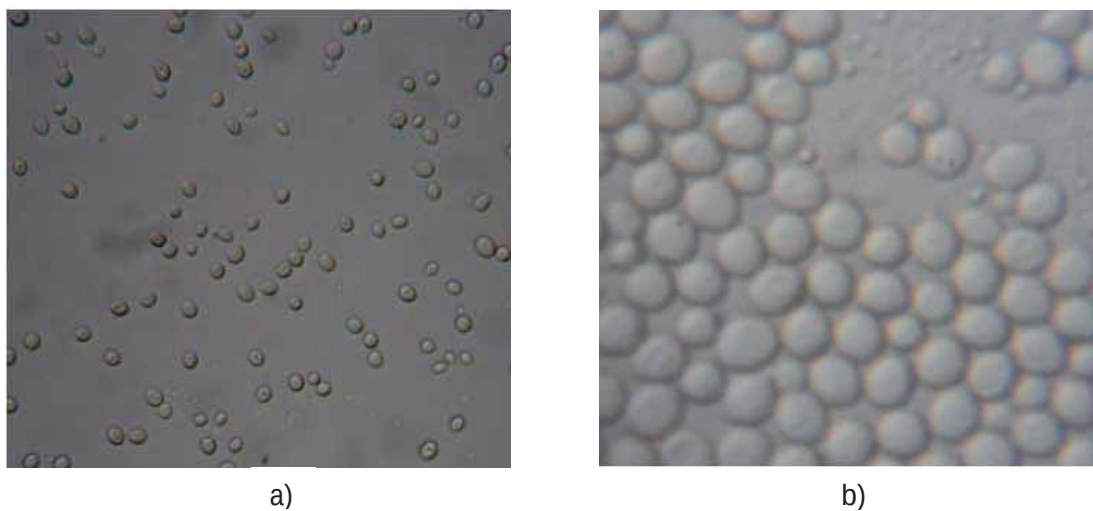


Figura 25. Observación microscópica de la levadura 4 ME3. a) 100 X, b) 40X .

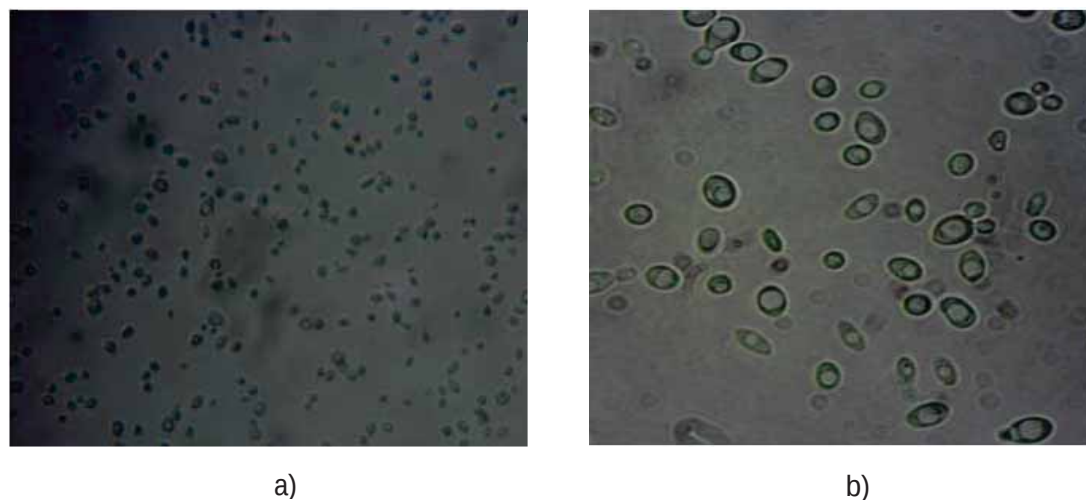


Figura 26. Observación microscópica de la levadura 7 ME3. a) 100 X, b) 40 X

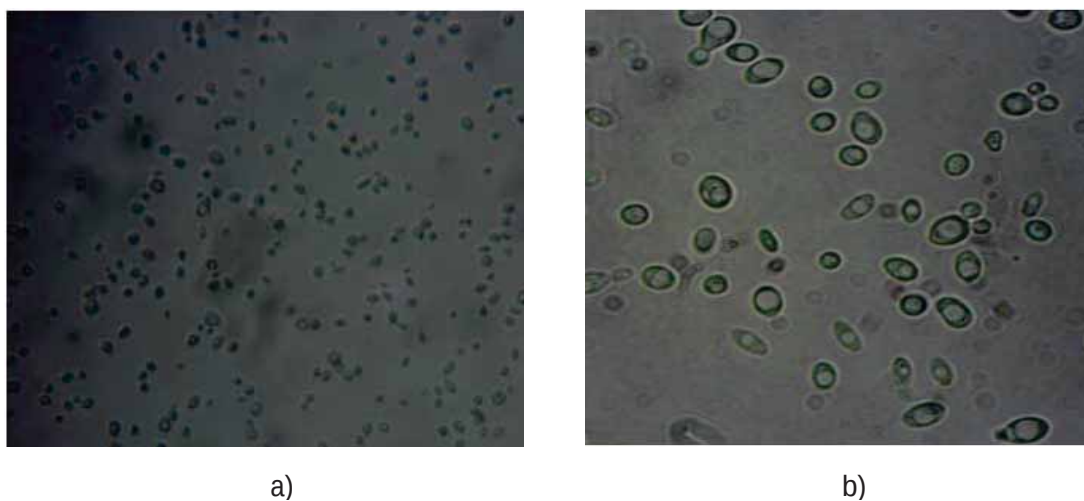


Figura 27. Observación microscópica de la levadura 10 ME3. a) 100 X, b) 40 X

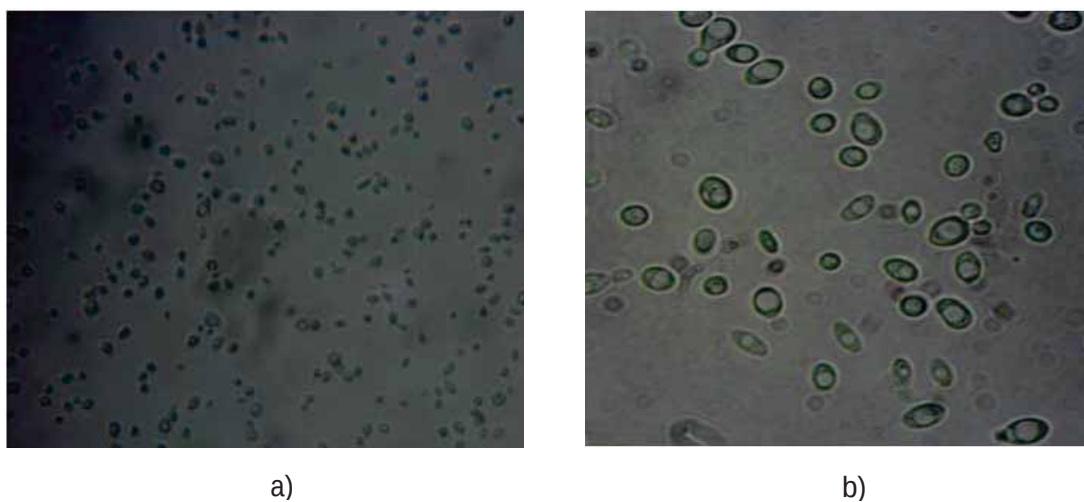


Figura 28. Observación microscópica de la levadura 12 ME3. A) 100X, b) 40X

Tabla 10. Morfología celular de las levaduras.

NOMBRE	PROCEDENCIA	CARACTERÍSTICAS CELULARES (24 h)
Lev. 1	ME1	Forma circular. Tamaño regular
Lev. 2	ME1	Forma circular. Tamaño irregular
Lev. 3	ME2	Forma circular. Tamaño regular
Lev. 4	ME3	Forma circular. Tamaño regular
Lev. 5	ME1	Alargadas. Tamaño pequeño.
Lev. 6	ME2	Alargadas. Tamaño pequeño forma agrupaciones.
Lev. 7	ME3	Alargadas. Tamaño pequeño forma agrupaciones.
Lev. 8	ME1	Alargadas. Tamaño regular.
Lev. 9	ME2	Alargadas. Tamaño regular.
Lev. 10	ME3	Ovoides forman cadenas o bastones.
Lev. 11	ME2	Ovoides de tamaño irregular forma agrupaciones.
Lev. 12	ME3	Alargadas. Tamaño irregular

Se utilizó el agar Biggy (Bismuth Glucose Glycine Yeast Agar, también conocido como agar de Nickerson) el cual proporciona los nutrientes necesarios para el crecimiento de levaduras reduciendo la sal de bismuto a bismuto y el sulfito a sulfuro mediante un proceso de reducción de sustrato. El bismuto y el sulfuro se combinan en un precipitado de color amarronado a negro que tiñe las colonias e inhiben el crecimiento de bacterias. Se inocularon los microorganismos en el agar Biggy para confirmar el crecimiento de las levaduras (Fig. 29-31).

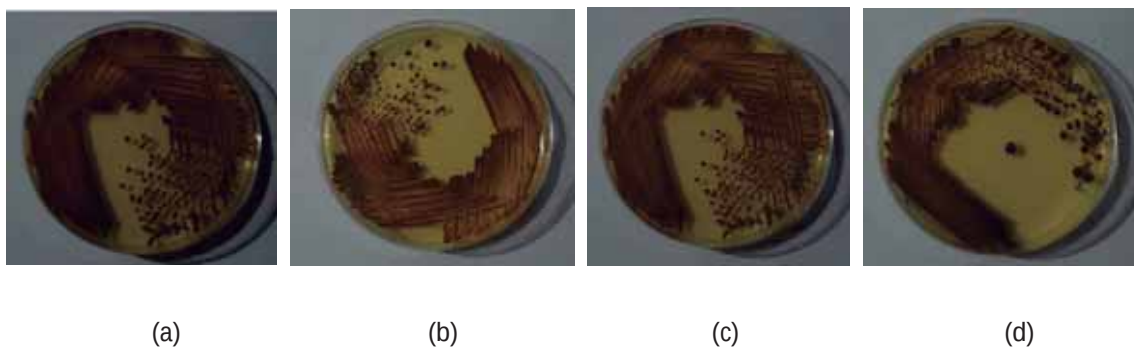


Figura 29. Cultivos puros de levaduras en medio Biggy. (a) *Lev1* ME1, (b) *Lev 2* ME1, (c) *Lev5* ME1 (d) *Lev 8* ME1.

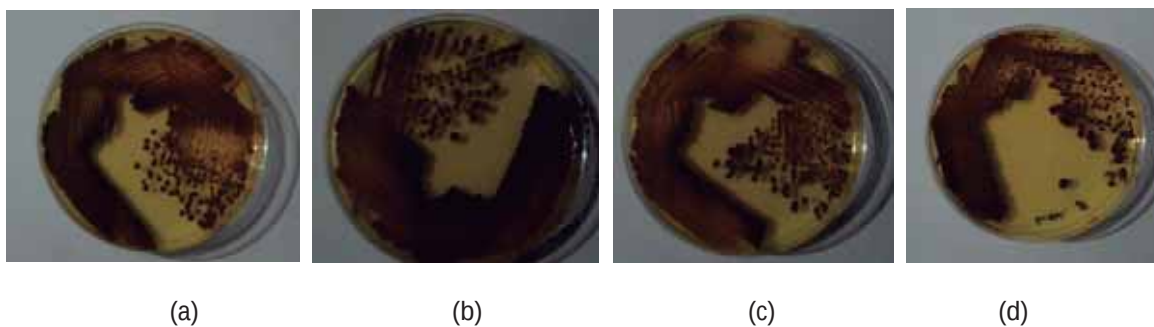


Figura 30. Cultivos puros de levaduras en medio Biggy.(a) *Lev 3ME2*, (b) *Lev 6ME2*, (c) *Lev9ME2* (d) *Lev 11 ME2*.

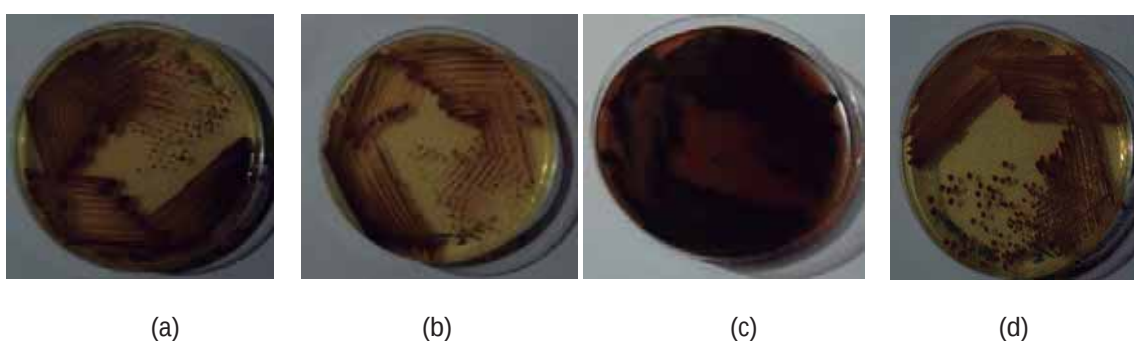


Figura 31. Cultivos puros de levaduras en medio Biggy.(a) Cultivos puros de levaduras en medio Biggy.(a) *Lev 4ME3*, (b) *Lev 7ME3*, (c) *Lev10 ME3* (d) *Lev 12 ME3*.

Todas las colonias presentes en las placas se tornaron de un color amarronado u oscuro, lo cual permite confirmar que tenemos levaduras presentes. Los aislados de bacterias fueron analizados macroscópicamente y microscópicamente de acuerdo a su morfología y sus características físicas, estructura y tinción celular mediante la tinción de Gram.

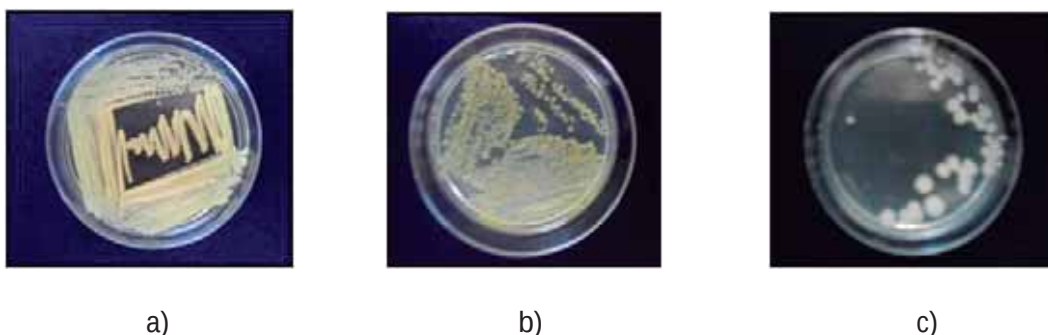


Figura 32. Cultivos puros de Bacterias en medio Mueller Hinton. a) *Bact 1 ME1*, (b) *Bact 4ME1*, (c) *Bact 8ME1*.

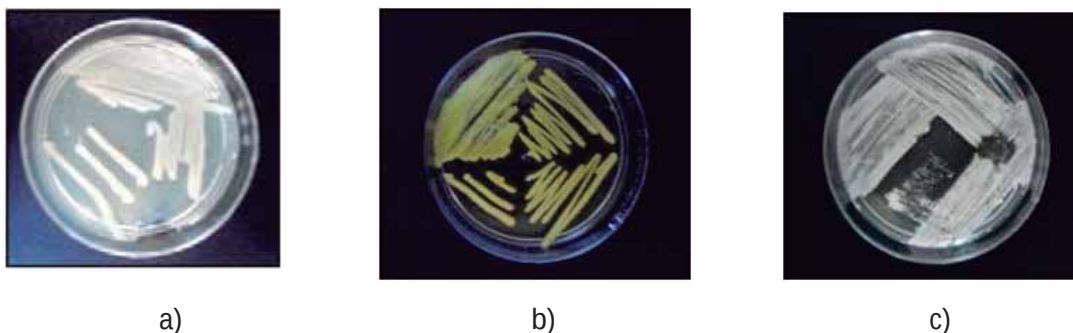


Figura 33. Cultivos puros de bacterias en medio Mueller Hinton. (a) *Bact 2 ME2*, (b) *Bact 5 ME2*, (c) *Bact 7 ME2*.



Figura 34. Cultivos puros de puros de Baterías en medio Mueller Hinton.(a) *Bact 3 ME3*, (b) *Bact 6 ME3*.

Tabla 11. Características morfológicas de las bacterias.

NOMBRE	TAMAÑO	FORMA	ELEVACIÓN	MARGEN	COLOR	SUPERFICIE	DENSIDAD	CONSISTENCIA
Bact. 1	1.2 mm	Ovalada	Plana	Ondulado	Blanca	Mate	Traslúcida	Butirosa
Bact. 2	1.0 mm	Circular	Aplastada	Entero	Blanca	Brillante	Opaca	Butirosa
Bact. 3	1.2 mm	Irregular	Convexa	Ondulado	Blanca	Mate	Traslúcida	Butirosa
Bact. 4	1.2 mm	Circular	Convexa	Entero	Amarillo	Mate	Opaca	Cremosa
Bact. 5	1.4 mm	Irregular	Plana	Ondulado	Amarillo	Mate	Opaca	Cremosa
Bact. 6	1.0 mm	Irregular	Plana	Ondulado	Naranja	Brillante	Traslúcida	Butirosa
Bact. 7	1.0 mm	Ovalada	Plana	Entero	Beige	Mate	Opaca	Cremosa
Bact. 8	1.0 mm	Circular	Elevada	Entero	Blanca	Mate	Opaca	Butirosa

Tabla 12. Morfología celular de las bacterias.

NOMBRE	CARACTERÍSTICAS CELULARES (24 h)	Tinción de Gram
Bact.1	Bacilos esporulados, esporas terminales y esféricas no hay formación de cadenas	-
Bact. 2	Forma bacilar irregular, forma cadenas.	-
Bact. 3	Forma circular. Tamaño regular	-
Bact. 4	Forma circular. Tamaño regular	-
Bact. 5	Alargadas. Tamaño pequeño forma agrupaciones.	-
Bact. 6	Alargadas. Tamaño pequeño forma agrupaciones.	+
Bact. 7	Forma bacilar irregular, no esporulados	-
Bact. 8	Bacilos esporulados con formación de cadenas	+

Los aislados de los hongos fueron analizados macroscópicamente y microscópicamente de acuerdo a su morfología y sus características físicas, estructura y tinción celular mediante la tinción de lactofenol.

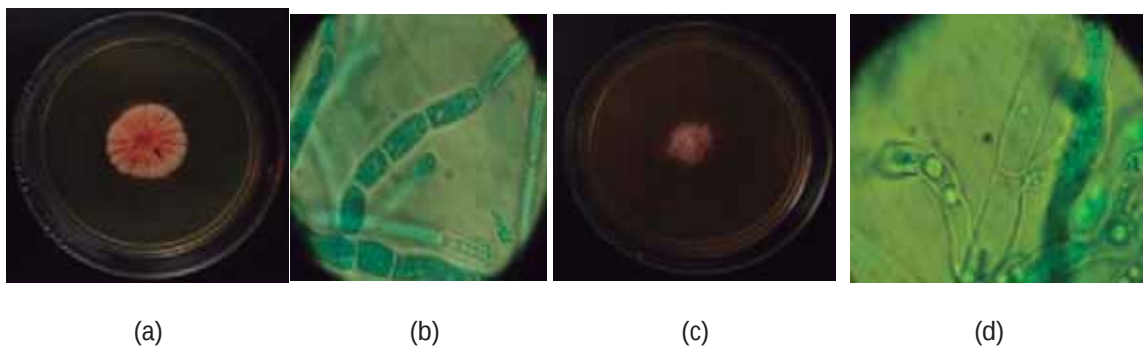


Figura 35. Cultivos puros de Hongos en medio PDA observación a 100x.(a)*Hongo 1 (Agave)*,(b)Observación microscópica a 100x del hongo 1. (c)*Hongo 2 (Agave)*, (d) Observación microscópica a 100x del *hongo 2*.

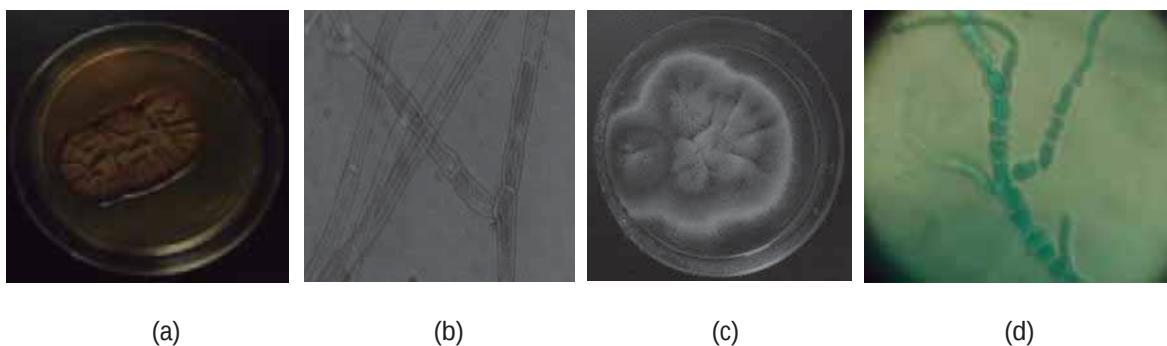


Figura 36. Cultivos puros de Hongos en medio PDA observación a 100x.(a)*Hongo 3*(ME1),(b)Observación microscópica a 100x del *hongo 3*. (c) *Hongo4*(ME2), (d) Observación microscópica a 100x del *hongo 4*.

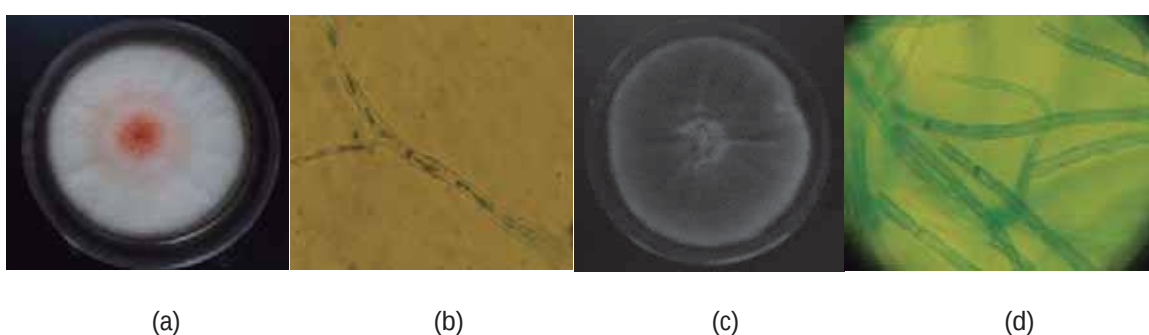


Figura 37. Cultivos puros de Hongos en medio PDA observación a 100x.(a)*Hongo 5 (Agave)*,(b)Observación microscópica a 100x del *hongo5*. (c) *Hongo 6*(ME2), (d) Observación microscópica a 100x del *hongo 6*.

8.4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS LEVADURAS AISLADAS

Para llevar a cabo la identificación molecular se utilizó la técnica RFLP la cual emplea un análisis de patrones de restricción a genes ribosomales que comprende los espaciadores transcritos internos y el gen 5.8S. Para ello se extrajo ADN genómico de células de las cepas aisladas con características de levadura por medio de la técnica de extracción fenol-cloroformo adicionando perlas de vidrio.

8.4.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Se obtuvieron las células a partir de cultivos puros crecidos en medio YPD durante 48 horas, posteriormente se centrifugaron las células hasta obtener una pastilla, las cuales se utilizaron para extraer el DNA genómico (Fig. 27 y 28).

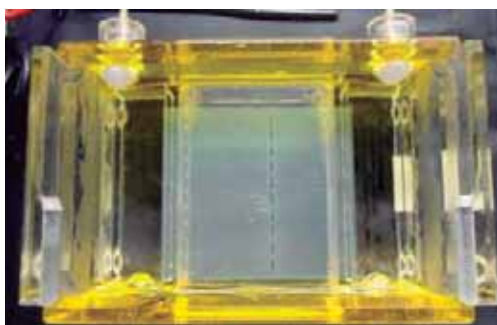


a)



b)

Figura 38. Células de los cultivos puros de cada cepa para la extracción de DNA.



a)



b)

Figura 39. Electroforesis en gel de agarosa y cuantificación de DNA.

Se comprobó la calidad e integridad de la extracción en un gel de agarosa al 1% (Fig. 29). Se muestran bandas representativas lo que indica una buena eficiencia, el ADN no degradado por tanto el método de extracción fenol cloroformo es efectivo para levaduras.



Figura 40. Gel de agarosa al 1% con ADN genómico de levaduras.

*Línea M: Marcador de Peso Molecular. Línea 1-12: ADN genómico de 12 levaduras (Lev. 1 a Lev. 12)

Además se realizó una cuantificación de DNA en el biofotómetro Eppendorf® Biophotometer. El resultado de la cuantificación se calculó utilizando la fórmula establecida en la metodología descrita con la finalidad de posteriormente estandarizar la técnica de PCR.

8.4.2.TAMAÑOS DE PRODUCTOS DE PCR

Para amplificar la región del gen RNA ribosomal (rRNA) de las cepas de levaduras se utilizaron los pares de oligonucleótidos ITS1 e ITS4, la cual incluye la región del espaciador transcrito interno ITS1 (oligonucleótido ITS1-ITS2), el gen 5.8S y el espaciador transcrito interno ITS4 (ITS3-ITS4). Como resultado de la amplificación, el tamaño esperado de las bandas comprende el rango de 300 pb a 950 pb. Con electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % se obtuvieron diferentes productos de PCR con tamaños de entre 900 y 400 pb (Fig.

25).

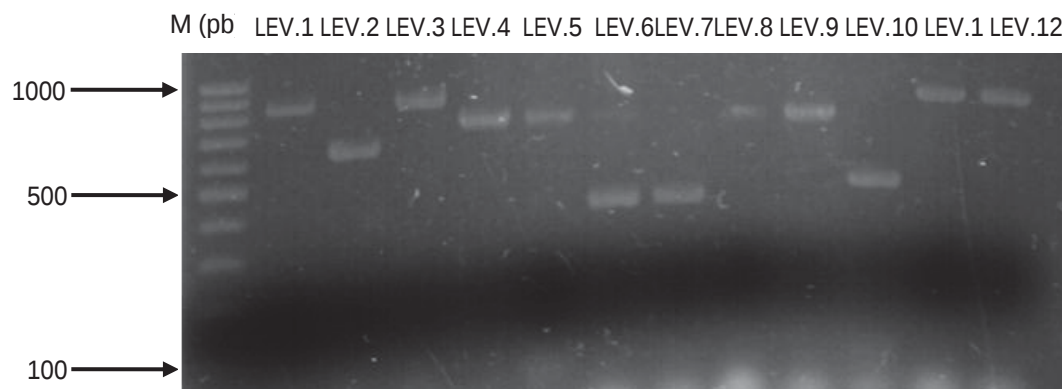


Figura 41. Gel de agarosa con los productos de PCR del rDNA de las 12 cepas aisladas.

*Línea M: Marcador de Peso Molecular. Línea 1-12: productos de PCR (Lev. 1 - Lev. 12).

Los productos de PCR obtenidos de las levaduras, fueron de entre los 400 pb y 880. Por estos resultados se podría afirmar que las cepas de levaduras son diferentes, esto se confirmará con el análisis de los patrones de restricción.

8.4.3.PERFILES GERERADOS CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Cada uno de los productos amplificados fueron digeridos por separado con siete endonucleasas de restricción: *Alu I*, *Dde I*, *Hae I*, *Hha III*, *HinF I*, *ScrF I* y *Taq I* (Fig. 26-29). Los tamaños aproximados de los productos amplificados y los fragmentos de restricción observados después de la digestión con las siete endonucleasas de restricción se muestran en la Tabla 7. La identificación de las levaduras fue deducida comparando los tamaños moleculares de los productos de PCR y los productos de restricción obtenidos con los publicados para las especies de levaduras por Guillamón y col. (1998); Esteve-Zarzoso y col. (1999); Granchi y col. (1999); Pramateftaki y col. (2000); Raspor y col. (2002); Espinosa y col. (2002); Las Heras-Vázquez y col. (2003) y Órbera (2004)[10, 14-18, 20, 42].

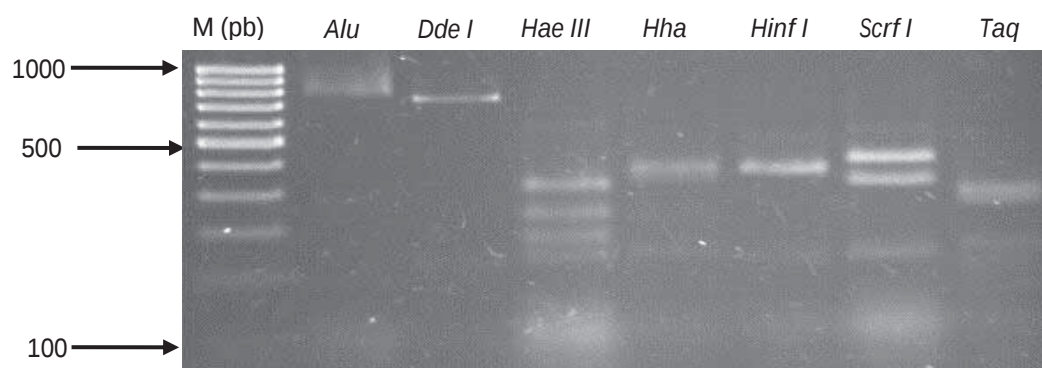


Figura 42. Análisis de perfiles de restricción de la Levadura 1 con las endonucleasas.

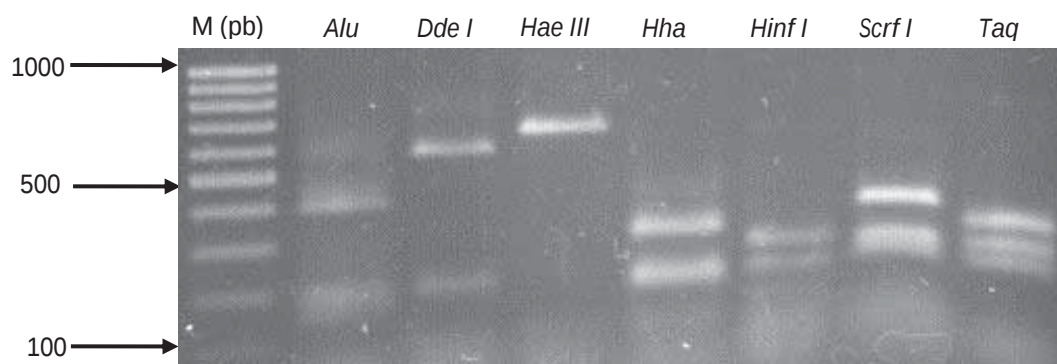


Figura 43. Análisis de perfiles de restricción de la Levadura 2 con las endonucleasas.

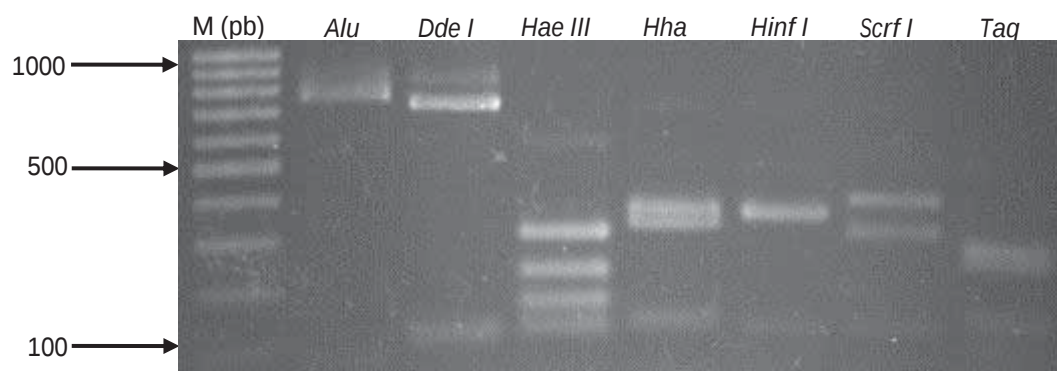


Figura 44. Análisis de perfiles de restricción de la Levadura 3 con las endonucleasas.

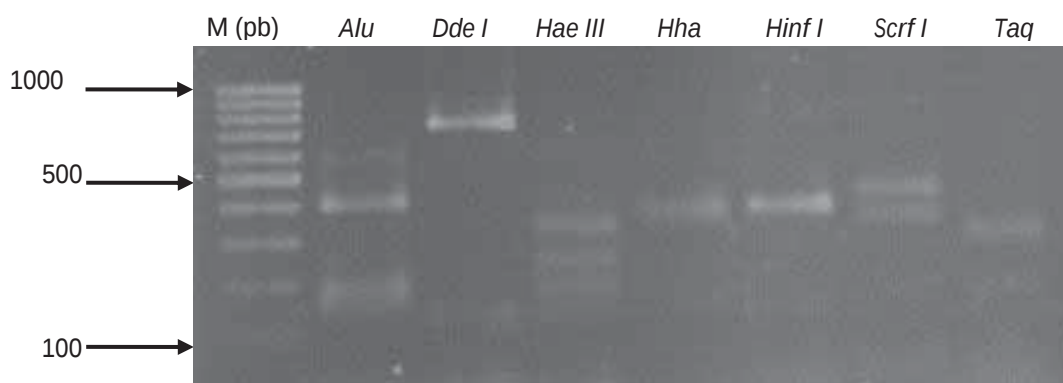


Figura 45. Análisis de perfiles de restricción de la Levadura 4 con las endonucleasas.

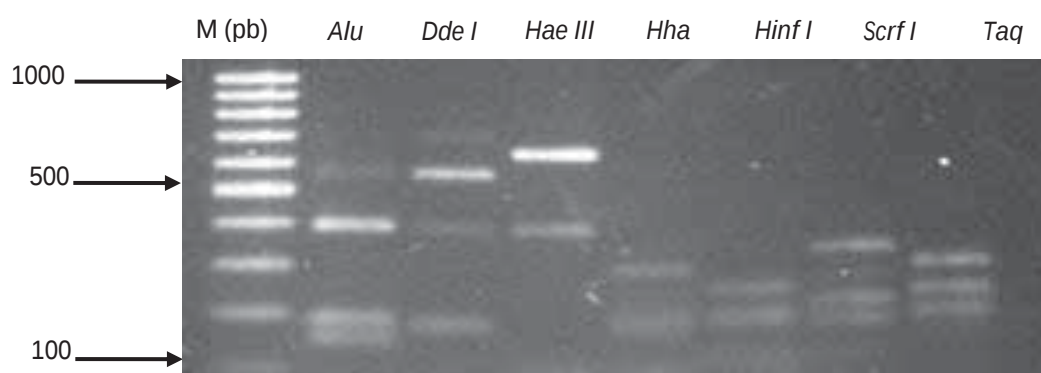


Figura 46. Análisis de perfiles de restricción de la Levadura 5 con las endonucleasas.

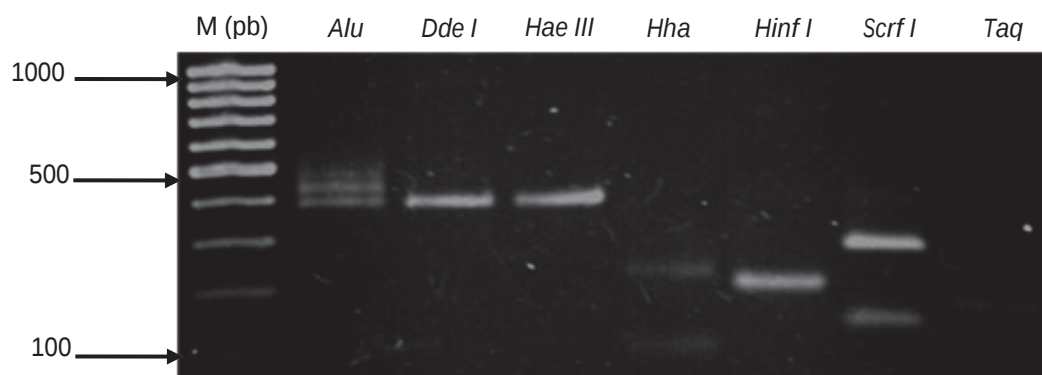


Figura 47. Análisis de perfiles de restricción de la Levadura 6 con las endonucleasas.



Figura 48. Análisis de perfiles de restricción de la Levadura 7 con las endonucleasas.

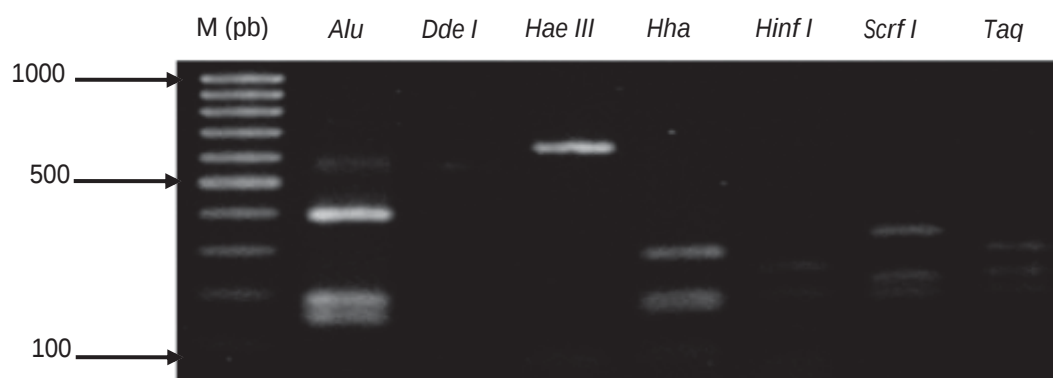


Figura 49. Análisis de perfiles de restricción de la Levadura 8 con las endonucleasas.

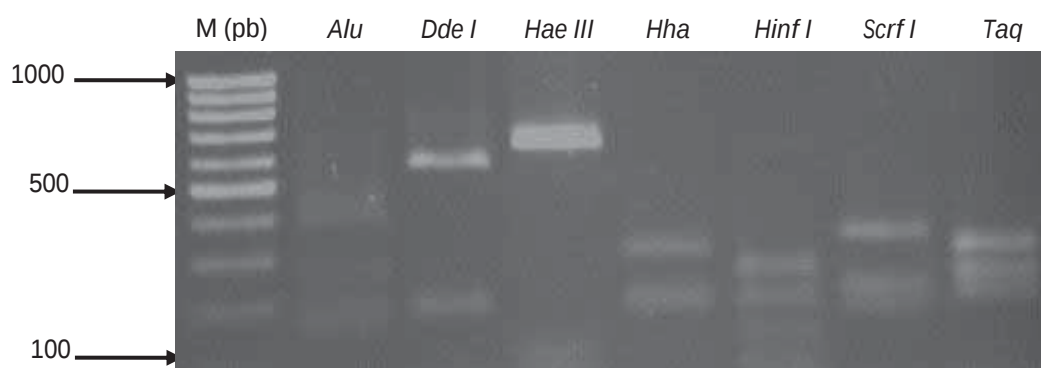


Figura 50. Análisis de perfiles de restricción de la Levadura 9 con las endonucleasas.

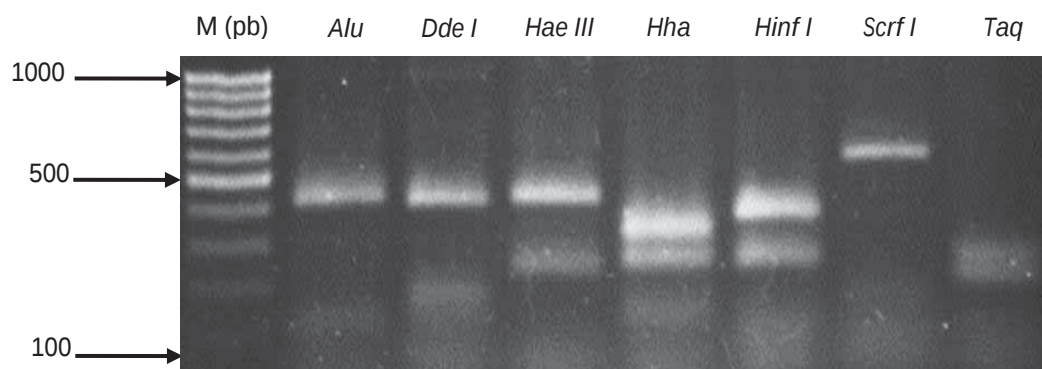


Figura 51. Análisis de perfiles de restricción de la Levadura 10 con las endonucleasas.

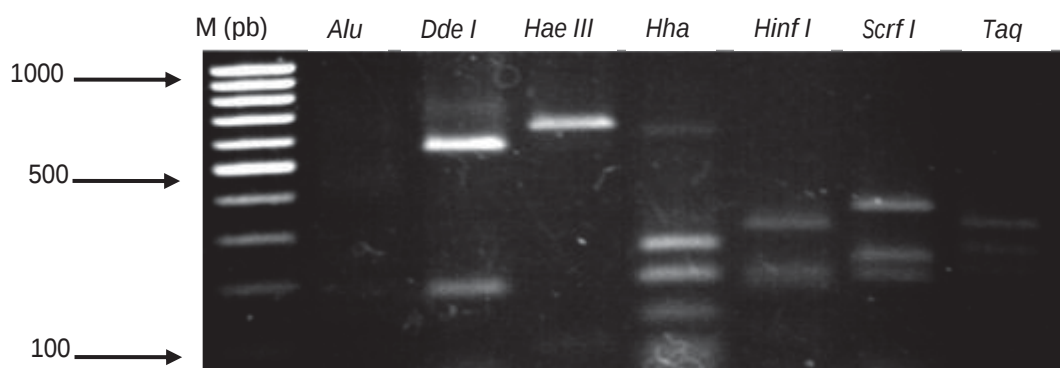


Figura 52. Análisis de perfiles de restricción de la Levadura 11 con las endonucleasas.

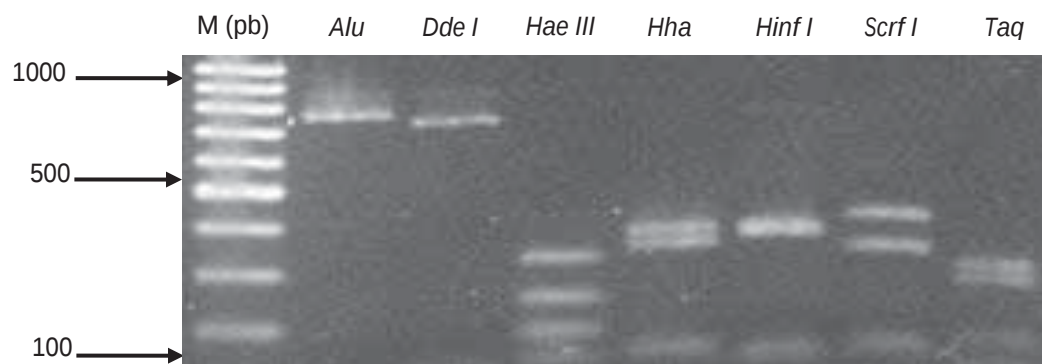


Figura 53. Análisis de perfiles de restricción de la Levadura 12 con las endonucleasas.

Con base en lo anterior los resultados muestran que la posible identificación de los microorganismos (Tabla 13). Estas deducciones se realizaron sumando cada una de las bandas que se generaron en las digestiones y estas deben coincidir con el tamaño del producto de PCR.

Tabla 13. Identificación, productos de PCR y fragmentos de restricción para levaduras aisladas de fermentaciones espontáneas de tres mezcaleras de Villa Madero Mich.

LEV	NOMBRE	PCR (pb)	<i>Hae</i> III	<i>Hha</i> I	<i>Hinf</i> I
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	330+240+180+130	380+350+150	360+350+170
2	<i>Rhodotorula glutinis</i>	640	410+210	210+310+80	320+220+75
3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	330+240+180+130	380+350+150	360+350+170
4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	330+240+180+130	380+350+150	360+350+170
5		890	610+350	100+220+220+280	120+200+250
6	<i>Clavispora lusitaniae</i>	400	400	250+150	210+200
7	<i>Clavispora lusitaniae</i>	400	400	250+150	210+200
8	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>Drosophilarum</i>	780	650+100	300+200+180+100	270+200+150+90+70
9	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>Drosophilarum</i>	780	650+100	300+200+180+100	270+200+150+90+70
10	<i>Dekkera bruxellensis</i>	480	300+95	190+130+90	280+220
11	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> .	880	690+130	300+250+180+100	340+240+200+50
12	<i>Zygosaccharomyces Rouxi</i>	770	160+200+260+300	140+320+360	140+380

También se generaron nuevos perfiles de restricción con la endonucleasas: *Alu* I, *Dde* I, *ScrF* I y *Taq* I; las cuales podrían utilizarse para la identificación molecular con estas enzimas (Tabla 14).

Tabla 14. Identificación, productos de PCR y fragmentos de restricción para levaduras con las endonucleasas Alu I, Dde I, ScrF I y Taq I.

LEV	NOMBRE	PCR (pb)	Alu I	Dde I	ScrF I	Taq I
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	800+80	750+130	400+330 +150	300+280 +180+120
2	<i>Rhodotorula glutinis</i>	640	420	400	510	290+300
3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	800+80	750+130	400+330 +150	300+280 +180+120
4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	800+80	750+130	400+330 +150	300+280 +180+120
5		890	180+190+4 00	200+400+ 550	180+220+3 00	200+220+29 0
6	<i>Clavispora lusitaniae</i>	400	400	400	280+140	200+130 +80
7	<i>Clavispora lusitaniae</i>	400	400	400	280+140	200+130 +80
8	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>Drosophilarum</i>	780	400+200 +180	580+200	350+240 +190	300+260 +220
9	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>Drosophilarum</i>	780	400+200 +180	580+200	350+240 +190	300+260 +220
10	<i>Dekkera bruxellensis</i>	485	300+90	280+120	380	240+200
11	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> .	880	500+200 +170	600+200+ 80	380+280 +230	350+300 +230
12	<i>Zygosaccharomyces Rouxi</i>	770	770	740	140+380+4 00	120+280

Los resultados de identificación muestra que las levaduras aisladas de la fermentación natural para producir mezcal pertenecen al grupo de las llamadas *Saccharomyces* y al No-*Saccharomyces*. Este grupo comprende generos como *Candida*, *Debaryomyces*, *Clavispora*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, entre otros. Las levaduras del género *Saccharomyces* son las responsables de la fermentación alcohólica y anteriormente se creía que solo ellas participaban en el proceso de producción de alcohol, sin embargo, el papel de las levaduras No-*Saccharomyces* ha tenido énfasis solo recientemente con estudios de los efectos potenciales en características organolépticas, las cuales dominan las primeras etapas

de la fermentación y además pueden proliferar con una población final considerable, afectando positivamente la composición analítica y calidad de la bebida.

La identidad de las levaduras se comparó en base a los perfiles de restricción con estudios realizados por Esteve-Zarzoso (1999)[10] sobre la identificación de levaduras por análisis RFLP del gen 5.8S rRNA y dos espaciadores ribosomales internos transcritos. También se comparó con un estudio realizado en 1995 por Lachance[38], sobre las comunidades de levaduras en fermentaciones naturales para producir tequila. El análisis muestra una comparación favorables en diversas especies como *Saccharomyces cerevisiae*, *Clavispora lusitaniae* que se encuentra en el agave fresco *tequilana* Weber y *Kluyveromyces marxianus*, *Zygosaccharomyces bailii* en el jugo fermentado identificadas en las primeras etapas de fermentación. Granchi y col., (1999)[14] reporta que estos microorganismos tiene impacto significativo en la fermentación produciendo compuestos de aroma en el mosto. Además *Pichia fermentans* y *Clavispora lusitaniae* se reportan en un estudio de formación de aroma en la fermentación de dos tipos de mostos naturales por 12 diferentes levaduras elaborado por Mingorance-Cazorla y col. (2004) [46] como las dos cepas que produjeron el mejor balance entre las concentraciones de etil acetato y alcoholes superiores. Las bebidas obtenidas presentaron una alta evaluación en análisis sensorial. El género *Kluyveromyces* ha sido reportado como una especie con una alta capacidad para producir enzimas como inulinasa y β -galactosidasa, y es productora de componentes de aroma como el 2-fenil-etanol de valor comercial[47]. Específicamente, *Kluyveromyces marxianus* y *Kluyveromyces lactis* han sido reportadas en procesos de fermentación para producir etanol de formulaciones que contienen principalmente lactosa [48]. *Zygosaccharomyces bailii* es una levadura que ha sido aislada de la uva y de fermentaciones espontaneas para producir vino. Granchi y col., 1999 reporta que este microorganismo tiene impacto significativo en la fermentación produciendo compuestos de aroma en el mosto. La levadura identificada como *Zygosaccharomyces bailii*, según Zarzoso y col. (1999) y otros autores tiene como tamaño de producto de PCR de 790, sin embargo se le menbró de esta manera debido a que los fragmentos de restricción que arrojó son aproximados a esta levadura. Otra opción podría ser que, la levadura 5 pertenezca al grupo de las levaduras del género

Saccharomyces, pero que pertenezca a otra especie que no esté publicada en la bibliografía, o que sea una nueva especie que no ha sido aislada y estudiada pero que presente en la fermentación del mezcal de esta región.

8.5. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

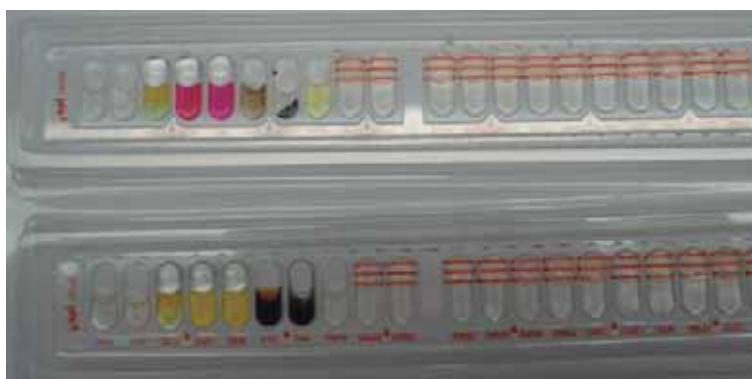
8.5.1 ANALISIS BASADOS EN EL EMPLEO DE SISTEMAS API (20CAUX,NE,E).

Diferentes galerías del sistema API fueron aplicados para la identificación parcial de los cultivos aislados. Los resultados muestran, con base a las reacciones enzimáticas y asimilación de sustratos de cada cultivo y análisis por software,

En el caso de algunas levaduras el porcentaje de confiabilidad es muy bajo o de perfil inaceptable en algunas especies, debido a que probablemente la base de datos del software contiene solo microorganismos de interés clínico, los resultados muestran que los cultivos analizados corresponden a cepas diferentes. Se inocularon las placas a partir de cultivos puros crecidos en medio YPD enriquecido en el caso de las levaduras y en agar soya en las bacterias, cultivos de 24 hrs, posteriormente se trataron según las indicaciones de cada galería (Fig. 24).



a)



b)

Figura 54. Pruebas API a) Placas 20CAUX b) Placas 20NE.

API 20 C AUX

Tabla 15. Resultados de la galería API 20C AUX a las levaduras

Cepa	0	G L U	G L Y	2 K G	A R A	X Y L	A D O	X L T	G A L	I N O	S O R	M D G	N A G	C E L	L A C	M A L	S A C	T R E	M L Z	R A F	H Y P	IDENTIFICACIÓN
Lev. 1	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1 98.7 %
Lev. 2	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 2 99.8 %
Lev. 3	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1 98.7 %
Lev. 4	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1 98.7 %
Lev. 5	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Cryptococcus laurentii</i> 89.7%
Lev. 6	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	<i>Candida lusitanae</i> 85.5%
Lev. 7	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Candida lusitanae</i> 46.9%
Lev. 8	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Cryptococcus humicola</i> 62.0%
Lev. 9	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Cryptococcus humicola</i> 62.0%
Lev. 10	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>Candida utilis</i> 45.3%
Lev. 11	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Cryptococcus laurentii</i> 89.7%
Lev. 12	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 45.2%

API 20 NE

Tabla 16. Resultados de la galería API 20 NE a las Bacterias.

Cepa	NO ₂ / N ₂ NO ₃	T R P	G L U	A D H	U R E	E S C	G E L	P N G	G L U	A R A	M N E	M A N	N A G	M A L	G A N	C A P	A D I	M L T	C I T	P A C	O X	IDENTIFICACIÓN
Bact. 1	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	<i>Chryseobacterium indologenes</i> 99.9 %
Bact. 2	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	<i>Aeromonas salmonicida ssp</i> 98.2%
Bact. 3	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Burkholderia cepacia</i> 99.9 %
Bact. 4	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	<i>Burkholderia cepacia</i>
Bact. 5	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	<i>Burkholderia cepacia</i>
Bact. 6	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i> 96.9%
Bact. 7	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> 99.7%
Bact. 8	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i> 96.9%

8.5.2 ANALISIS BASADOS EN EL EMPLEO DEL EQUIPO BIOLOG

A las levaduras aisladas se identificaron usando el sistema semiautomático Biolog (Biolog Inc., Hayward, CA, USA). El resultado del análisis muestran que los cultivos corresponden a las levaduras: Lev1: *Kluyveromyces lodderae*, Lev2: *Candida spandovensis*, Lev3: *Kluyveromyces lodderae*, Lev4: *Candida spandovensis*, Lev5: *Clavispora lusitaniae* a las 48h pero la lectura a las 72 da como resultado de baja similitud Lev5: *Hyphopichia burtonii* C, Lev6: *Clavispora lusitaniae*, Lev7: *Clavispora lusitaniae*, Lev8: *Kluyveromyces marxianus*, Lev9: *Candida spandovensis*, Lev10: *Saccharomyces dairensis*, Lev11: *Schizosaccharomyces pombe* var *malidevora*, Lev12: *Kluyveromyces lodderae*. Aparentemente estos resultados muestran discrepancias con los resultados obtenidos en la caracterización molecular, sin embargo los valores de similitud y distribución normal muestran ser diferentes. Evidencias que han sido descritas en otros estudios y que se asocian a que probablemente las características fenotípicas pueden ser influenciadas por la diversidad de las cepas y las condiciones de cultivo. Esto no implica que los sistemas Biolog no puedan usarse si no que deben considerarse como una herramienta confiable para la caracterización fenotípicas de cepas, incluyendo los patrones de asimilación.

Tabla 17 . Resultados empleando el equipo de Biolog.

Nombre	T.I	IDENTIFICACIÓN	SIM	TIPO
Lev. 1	72 h	<i>Kluyveromyces lodderae</i>	0.949	Lev.
Lev. 2	72 h	<i>Candida spandovensis</i>	0.938	Lev.
Lev. 3	72 h	<i>Kluyveromyces lodderae</i>	0.949	Lev.
Lev. 4	72 h	<i>Candida spandovensis</i>	0.874	Lev.
Lev. 5	48 h	<i>Clavispora lusitaniae</i>	0.915	Lev.
	72h	<i>Hyphopichia burtonii</i> C	0.433	
Lev. 6	72 h	<i>Clavispora lusitaniae</i>	0.956	Lev.
Lev. 7	72 h	<i>Clavispora lusitaniae</i>	0.956	Lev.
Lev. 8	72 h	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1	Lev.
Lev. 9	72 h	<i>Candida</i>	0.681	Lev.

		<i>spandovens</i>		
Lev. 10	72 h	<i>Saccharomyces dairensis</i>	0.416	Lev.
Lev. 11	72 h	<i>Schizosaccharomyces pombe var malidevora</i>		Lev.
Lev. 12	72 h	<i>Kluyveromyces lodderae</i>	0.949	Lev.

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

9.1. CONCLUSIONES

En general, las fermentaciones naturales son catalogadas como procesos impredecibles e incontrolables asociado al desconocimiento de la participación del consorcio microbiano endógeno a la fermentación. La carencia de información limita la especificación de parámetros de operación para desarrollar procesos estables y eficientes. A lo largo del trabajo se hace notar la importancia de los métodos de microbiología convencional para aislamiento de microorganismos y la identificación parcial a nivel fenotípico así como la identificación fenotípica. Las herramientas de biología molecular para caracterizar microorganismos por medio del análisis de patrones de restricción permiten obtener información confiable para dicha identificación. En este estudio se caracterizaron por medio de técnica molecular RFLP 12 levaduras que pertenecen al consorcio microbiano asociado a la fermentación espontánea en la producción de mezcal, las cuales fueron identificadas de acuerdo a sus polimorfismos siendo así 8 diferentes especies las encontradas se profundizo su caracterización por medio de herramientas de asimilación de diferentes sustratos. Dichas especies se han estudiado individualmente donde se les han otorgado cualidades fermentativas, también han sido reportadas como productoras de enzimas extracelulares como β -glucosidasas y pectinasas favorables en la liberación de sustancias, las cuales proporcionan características organolépticas de importancia y podrían ser responsables de proveer al mezcal propiedades únicas como aroma y sabor, afectando significativamente la composición analítica y la calidad de la bebida. Por lo anterior, las características que describe cada cepa podrían favorecer la etapa de fermentación considerándolo como un consorcio adecuado para el proceso de producción de mezcal, lo que confirma la participación en el proceso de fermentación del mezcal de levaduras diferentes en género y especie y que no solo las del genero *Saccharomyces* es la responsable del proceso y que, además las otras cepas identificadas participan en el proceso y aportan características importantes al producto final.

9.2. RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar fermentaciones a nivel matraz y posteriormente a nivel biorreactor de cada una de las cepas caracterizadas para evaluar la capacidad fermentativa.
- ✓ Realizar fermentaciones a nivel matraz utilizando consocios de levaduras para evaluar la producción de etanol.
- ✓ Mediante herramientas estadísticas trabajar en la construcción del cultivo iniciador del proceso fermentativo.
- ✓ Escalamiento a nivel biorreactor y posteriormente a nivel planta piloto para la producción de mezcal utilizando el inóculo iniciador.

10.BIBLIOGRAFÍA

1. Moo-Young, M. and Y. Chisti, *Biochemical engineering in biotechnology*. Pure and Appl. Chem., 1994. **66**(1): p. 117-136.
2. Giraffa, G., *Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation*★.FEMS Microbiology Reviews, 2004. **28**(2): p. 251-260.
3. Jacques, C., Soto, N., Rutiaga, O., *Ecología de levaduras del mezcal San Carlos: Identificación y caracterización de la flora nativa*. 2007, México. 3-8.
4. Frezier, V. and D. Dubourdieu, *Ecology of Yeast Strain Saccharomyces cerevisiae During Spontaneous Fermentation in a Bordeaux Winery*. American Journal of Enology and Viticulture, 1992. **43**(4): p. 375-380.
5. Vezinhet, F., et al., *Ecological Survey of Wine Yeast Strains by Molecular Methods of Identification*. American Journal of Enology and Viticulture, 1992. **43**(1): p. 83-86.
6. H., G.F. and G.H. M., *Yeast growth during fermentation*. Harwood Academic Publishers, Switzerland, 1993. Wine Microbiology and Biotechnology: p. 27-54.
7. Versavaud, A., et al., *Genetic diversity and geographical distribution of wild Saccharomyces cerevisiae strains from the wine-producing area of Charentes, France*. Applied and Environmental Microbiology, 1995. **61**(10): p. 3521-9.
8. Cuinier, C., *Le levurage spécifique*. Viticulture, 1985. Tourangelle **215**: p. 15-18.
9. Petorius, T.J.v.d.W.y.I.S., *The impact of yeast genetics and recombinant DNA technology on the wine industry: A review*. South African Journal for Enology and Viticulture 1991: p. 12:3-29.
10. Esteve-Zarzoso, B., et al., *Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999. **49**(1): p. 329-337.

-
11. Lodder, J. and N.J.W.K.V. Rij, *The yeast: a taxonomic study*. 1967: North-Holland Pub. Co.
 12. Luis E. Segura G., M.R.K., Ericka P. Flores B., Anne C. Gschaedler M, *PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas*. e-Gnosis 2010. **8**(2): p. 2-3.
 13. Enrique Salas Téllez, R.A., *Biología molecular en micología médica*. Derm. Venez, 2001. **39**: p. 07-10.
 14. Granchi, L., et al., *Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region*. Journal of Applied Microbiology, 1999. **87**(6): p. 949-956.
 15. Juan Carlos Espinosa, M.F.-G., Juan Ubeda and Ana Briones, *Identification of Wine Yeasts by PCR-RFLP without Previous Isolation on Plate*. Food Technology and Biotechnology, 2002. **40**: p. 157-160.
 16. Guillamón, J.M., et al., *Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region*. Archives of Microbiology, 1998. **169**(5): p. 387-392.
 17. Pramateftaki, P.V., P. Lanaridis, and M.A. Typas, *Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece*. Journal of Applied Microbiology, 2000. **89**(2): p. 236-248.
 18. Raspor, P., et al., *Yeast population dynamics in spontaneous and inoculated alcoholic fermentations of Zametovka must*. Food Technology and Biotechnology, 2002. **40**(2): p. 95-102.
 19. Ganga, M.A. and C. Martínez, *Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-Saccharomyces yeasts*. Journal of Applied Microbiology, 2004. **96**(1): p. 76-83.
 20. Las Heras-Vazquez, F.J., et al., *Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers*. FEMS Yeast Research, 2003. **3**(1): p. 3-9.
 21. Morrissey, W.F., et al., *The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations*. Journal of Applied Microbiology, 2004. **97**(3): p. 647-655.

-
22. Lachenmeier, D.W., et al., *Quantification of Selected Volatile Constituents and Anions in Mexican Agave Spirits (Tequila, Mezcal, Sotol, Bacanora)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(11): p. 3911-3915.
 23. Durán, H.M. and J.L. Pulido, *Análisis de la Molienda en el Proceso de Elaboración de Mezcal*. Información tecnológica, 2007. **18**: p. 47-52.
 24. Cervantes, R.M.C., ed. *Los Agaves*. 2000: México. 63-66, 73.
 25. Rosa María Damián Robles and E.P. Hernández, *Caracterización molecular y fermentativa de una levadura utilizada para la producción de mezcal en la región de Etúcuaro, Michoacán*, in *Departamento de Ingeniería Bioquímica*. 2010, Instituto Tecnológico de Morelia: Morelia, Michoacán, México.
 26. Gallardo, J., *La producción de Mezcal en el Estado de Michoacán*. 2008, Michoacán, México.
 27. Industrial, S.d.C.y.F., *Norma Oficial Mexicana NOM -070-SCFI-1994, Bebidas alcohólicas - Mezcal - Especificaciones*, D.O.d.l. Federación, Editor. 1994: México, D. F.
 28. Vallejo-Cordoba, B., A.F. González-Córdova, and M. del Carmen Estrada-Montoya, *Tequila Volatile Characterization and Ethyl Ester Determination by Solid Phase Microextraction Gas Chromatography/Mass Spectrometry Analysis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(18): p. 5567-5571.
 29. De León-Rodríguez, A., et al., *Characterization of Volatile Compounds of Mezcal, an Ethnic Alcoholic Beverage Obtained from Agave salmiana*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(4): p. 1337-1341.
 30. Mallouchos, A., et al., *Investigation of Volatiles Evolution during the Alcoholic Fermentation of Grape Must Using Free and Immobilized Cells with the Help of Solid Phase Microextraction (SPME) Headspace Sampling*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(13): p. 3840-3848.
 31. Arrizon, J., et al., *Fermentation behaviour and volatile compound production by agave and grape must yeasts in high sugar & Agave tequilana & grape must fermentations*. Antonie van Leeuwenhoek, 2006. **89**(1): p. 181-189.
 32. Maguey-Mezcal, S.P., *Fortalecimiento de cadenas productivas*. 2005: Guerrero, México. p. 97-99.

-
33. Illsley, G.C., *Mezcales e indicaciones geográficas en México*, Grupo de estudios ambientales AC. 2008.
 34. Achi, O.K., *The potential for upgrading traditional fermented foods through biotechnology*. African Journal of Biotechnology, 2005. **4**(5): p. 375-380.
 35. Fleet, G.H., *Microorganisms in food ecosystems*. International Journal of Food Microbiology, 1999. **50**(1-2): p. 101-117.
 36. Vandecasteele, F., T. Hess, and R. Crawford, *Constructing Microbial Consortia with Minimal Growth Using a Genetic Algorithm Applications of Evolutionary Computing*, G. Raidl, et al., Editors. 2004, Springer Berlin / Heidelberg. p. 123-129.
 37. Krishnan, K.P. and A.V. Saramma, *Mixed substrate degradation: Are consortia better than monocultures?* Indian Journal of Marine Sciences, 2005. **34**(2): p. 188-191.
 38. Lachance, M.-A., *Yeast communities in a natural tequila fermentation*. Antonie van Leeuwenhoek, 1995. **68**(2): p. 151-160.
 39. Olaniran, B.A., *Applying synchronous computer-mediated communication into course design: Some considerations and practical guides*. Campus-Wide Information Systems, 2006. **23**(3): p. 210-220.
 40. Nyström, T., *Nonculturable bacteria: programmed survival forms or cells at death's door?* BioEssays, 2003. **25**(3): p. 204-211.
 41. Pelczar Michael Joseph, Chin Sun Chan Eddie, and F. PelczarMerna, *Micribiología*. 4° ed. 1981, México: Mc Graw-Hill.
 42. Ratón, T.O., *Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico*. Rev. Iberoam. Micol., 2004. **21**: p. 15-19.
 43. Diaz Ruiz Gloria and W.R. Carmen, *Metódos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados*. Revista Latinoamericana de Microbiología, 2003. **45**(1-2): p. 30-40.
 44. Michael John Carlile and S.C. Watkinson, *The Fungi*. 1994, London: Academic Press.

-
45. Antonio Palacios, et al., *Las eficaces técnicas moleculares de identificación y cuantificación de las levaduras enológicas*. 2007: Rue del Golf, Merignac, Francia. p. 1-8.
 46. Mingorance-Cazorla, L., et al., *Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2003. **19**(3): p. 297-304.
 47. Bellaver, L.H., et al., *Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in Kluyveromyces marxianus CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess*. FEMS Yeast Research, 2004. **4**(7): p. 691-698.
 48. Zafar, S., et al., *Batch kinetics and modelling of ethanolic fermentation of whey*. International Journal of Food Science & Technology, 2005. **40**(6): p. 597-604.
 49. B Holmes, M Costas, M Ganner, S L On, and M Stevens (1994). *Evaluation of Biolog System for Identification of Some Gram-Negative Bacteria Clinical Importance*. Central Public Health Laboratory, London, England, 1970.