



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencias de los Alimentos

Composición, estructura y dinámica de la microbiota durante la fermentación de jugo de agave para la producción de tequila

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctorado en Ciencia de los Alimentos

Presenta:

M.C. Jesús Alejandro Aldrete Tapia


Dirigido por:

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Presidente


Firma

Dr. Mark L. Tamplin
Secretario


Firma

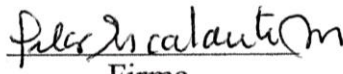
Dra. Sofía María Arvizu Medrano
Vocal

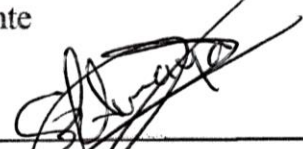

Firma


Dr. Ramón Álar Martínez Peniche
Suplente


Firma

Dra. Pilar Escalante-Minakata
Suplente


Firma


Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Director de la Facultad


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

RESUMEN

En la fermentación del tequila se presentan bajos rendimientos de conversión de azúcares a etanol. El uso de cepas nativas seleccionadas ha mejorado el rendimiento y calidad en otras bebidas fermentadas. El objetivo de este trabajo fue determinar la composición, estructura y dinámica de la microbiota durante el proceso de fermentación espontánea del jugo de agave y seleccionar levaduras de interés tecnológico. Se analizaron 17 fermentaciones espontáneas de mostos de agave obtenidos en dos años consecutivos (2015-2016). La cuantificación de metabolitos de la fermentación con HPLC-IR y de poblaciones de levaduras y bacterias ácido lácticas demostró la heterogeneidad entre fermentaciones, con consumos incompletos de fructosa (7.4-97.3 %) y bajas producciones de etanol (0.8-20.5 g/L). Se determinó la microbiota utilizando técnicas moleculares, encontrando a *Saccharomyces cerevisiae* y especies de *Lactobacillus* como residentes de la destilería al detectarse en todas las fermentaciones. Mediante el análisis de factores múltiples, se logró asociar a los productos de fermentación con la dominancia de las especies bacterianas. Se aislaron 605 levaduras correspondientes a *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kudriavzevii*, así como 229 bacterias de las especies *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Pediococcus acidilactici*, *Weissella confusa*, *W. paramesenteroides* y *Acetobacter okinawensis*. Se preseleccionaron 14.7 % de levaduras por su tolerancia a 20 % de fructosa y a 10 % de etanol, y de éstas, tres cepas de *S. cerevisiae* (Teq-199, Teq-230 y Teq-231) presentaron las velocidades de crecimiento más rápidas. Mediante un diseño central compuesto, se seleccionó la cepa Teq-199 al evaluarse las cepas pre-seleccionadas, además esta metodología permitió identificar las condiciones (temperatura, pH y fructosa inicial) para el mayor consumo de fructosa, producción de etanol y rendimiento fermentativo. La actividad fermentativa se vio limitada al combinarse individualmente con las principales bacterias aisladas durante las fermentaciones, se redujo la concentración del etanol ($\Delta -1.8 \pm 0.73$ g/L), incrementando la de los ácidos acético ($\Delta 0.8 \pm 0.1$ g/L) y láctico ($\Delta 3.4 \pm 1.3$ g/L). La cepa Teq-199 dominó el proceso en jugo de agave y en presencia de la comunidad de bacterias, pero con menor generación de etanol que en las fermentaciones con bacterias individuales ($\Delta -15.5 \pm 3.5$ g/L), a pesar de ello, con mejores resultados comparados con las fermentaciones espontáneas ($\Delta 12.7 \pm 3.4$ g/L), requiriendo menor tiempo para finalizar el proceso. Por ello, el uso de la cepa Teq-199 a nivel industrial podría mejorar el control y rendimiento de la fermentación de jugo de agave para la producción de tequila.

Palabras clave: Fermentación del tequila, microbiota nativa, levadura nativa seleccionada.

ABSTRACT

Low conversion yield from sugars to ethanol is achieved during fermentation of tequila. The use of autochthonous selected strains has improved yield and quality of other fermented beverages. The aim of this work was to determine the composition, structure and dynamic of the microbiota present during the spontaneous fermentative process of the agave juice and select yeasts of technological interest. For this, 17 spontaneous fermentations of agave juice obtained between 2015-2016 were analyzed. Quantification of fermentation metabolites by HPLC-IR and microbial populations demonstrated heterogeneous fermentations, characterized by incomplete fructose consumption (7.4-97.3 %) and low ethanol production (0.8-20.5 g/L). Microbiota was characterized by molecular techniques, *S. cerevisiae* and species of *Lactobacillus* were present in all samples which indicates their residency at the distillery. Fermentation products explained the changes in the dominance of bacterial species. A total of 605 yeasts were isolated corresponding *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *P. kudriavzevii*, and 229 bacteria to *Lactobacillus. fermentum*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Pediococcus acidolactici*, *Weisella confusa*, *W. paramesenteroides*, and *Acetobacter okinawensis*. From yeasts isolates, 14.7 % of strains were pre-selected for its tolerance to 20 % of fructose and 10 % of ethanol. From these, *S. cerevisiae* strains Teq-199, Teq-230 and Teq-231 showed fastest growth rate. The strain Teq-199 was selected by a central composite design in which factors evaluated were temperature of fermentation, initial fructose and pH. This strain showed the highest fructose consumption, ethanol production and fermentative yield under conditions similar to those from industrial process. Negative interactions of this strain against individual native bacteria species were observed, presenting reduced production of ethanol ($\Delta -1.8 \pm 0.73$ g/L), increased acetic ($\Delta 0.8 \pm 0.1$ g/L) and lactic acids ($\Delta 3.4 \pm 1.3$ g/L), however similar urea concentration as in the spontaneous fermentations. *S. cerevisiae* Teq-199 dominated the fermentations in presence of the community of native bacteria, nevertheless with lower ethanol generated compared to fermentations with individual bacteria ($\Delta -15.5 \pm 3.5$ g/L), but higher than spontaneous fermentations ($\Delta 12.7 \pm 3.4$ g/L), in addition to the reduction in time needed to finish the process. For this, the use of this strain could improve the control and yield of the fermentation at industrial level.

Keywords: Tequila fermentation, autochthonous microbiota, selected native yeast.

DEDICATORIA

*A UN SER EXCEPCIONAL QUE NOS BRIDÓ MUCHO AMOR
LE DEDICO ESTE TRABAJO
A MI ABUELA AGUSTINA ROJAS*

AGRADECIMIENTOS

A mí papá y mamá por todo su apoyo y amor en estos largos años de estudios y que todavía seguirán por mucho tiempo, espero sigan con su comprensión. Algún día trabajaré. Gracias por estar ahí en toda mi gama de emociones a pesar de la distancia y estar en sus oraciones diarias. Algún día cercano se los remuneraré con millones de besos y pesos.

A mis amigos por aguantarme tanto: a Dalia Miranda y Eunice Ortíz por ser mis hermanas postizas académicas y mis amigas incondicionales; a mis amigas Marcela Salazar y Andrea Loo por compartir tantos momentos en el lab y fuera de él, sin ustedes no hubiera sido lo mismo; a Victoria García y Oscar Jacobo por su compañerismo y amistad en los tan cortos pero enriquecedores viajes a Colima, gracias por permitirme ser su amigo; a Yamilé Barragán y Karina Teutli por su amistad tan rápida y fructífera. La amistad en los bellos y amargos momentos se guarda en un lugar especial en el corazón.

A mis profesores: A mi dra. Montserrat Hernández por aceptarme para seguir con esta aventura académica después de conocerme en maestría, todavía le quedaron ganas de aguantarme! Estoy eternamente agradecido por todo su apoyo el cual se lo agradezco infinitamente. A la dra. Sofia Arvizu y al dr. Peniche por todos los conocimientos que me aportaron durante estos largos, pero cortos años, y sobre todo por permitirme estar en contacto con personas tan maravillosas como ustedes. A la dra. Pilar Escalante, al permitirme crecer en todos los aspectos durante las múltiples estancias de investigación, gracias por abrirme las puertas, me dejaron muchas experiencias y conocimientos. Y al dr. Mark Tamplin, gracias por seguir siendo parte de mi vida académica, le debo un buen tequila para celebrar este éxito.

TABLA DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 El Tequila.....	3
II.1.1 Generalidades.....	3
II.1.2 Clasificación del tequila	3
II.1.3 Comercialización del tequila.....	4
II.2 Proceso de producción del tequila.....	4
II.2.1 Cultivo de agave	5
II.2.2 Proceso de obtención de tequila.....	5
II.3 La fermentación en el tequila.....	6
II.3.1 Composición del jugo de agave	6
II.3.2 Cambios que ocurren durante la fermentación.....	8
II.3.3 Etil carbamato	9
II.4 Métodos para inducir la fermentación en el tequila	10
II.4.1 Fermentación espontánea.....	10
II.4.2 Fermentación inoculando levaduras comerciales.....	12
II.4.3 Fermentación inoculando levaduras autóctonas seleccionadas	12
II.5 Técnicas de estudio de comunidades microbianas durante la fermentación	14
II.6 Selección de microorganismos nativos	16
II.6.1 Parámetros fermentativos.....	17
II.6.2 Demanda de nitrógeno	18
II.6.3 Formación de etil carbamato	18
II.6.4 Efecto <i>Killer</i>	19
II.7 Perspectivas en el estudio de fermentación del tequila	19
III. OBJETIVOS.....	21
III.1 Objetivo general	21
III.2 Objetivos particulares	21
IV. Hipótesis.....	22
iv. METODOLOGÍA.....	23
IV.1 Equipo	23
IV.2 Materiales	23
IV.3 Reactivos	23
IV.4 Obtención de muestras	24
IV.5 Fermentación espontánea	25
IV.5.1 Fermentación por microflora nativa	25
IV.5.2 Análisis físicos y químicos	25
IV.5.3 Análisis microbiológico.....	26
IV.5.4 Análisis molecular de fermentaciones de jugo de agave	27
IV.6 Técnicas dependientes de cultivo para el estudio de microorganismos nativos	30
IV.6.1 Aislamiento de levaduras y bacterias	30
IV.6.2 Extracción del ADN de los aislamientos	30
IV.6.3 PCR-RISA	30
IV.6.4 RFLP	31
IV.6.5 Secuenciación de genes ribosomales	31
IV.7 Caracterización fenotípica de microorganismos.....	32
IV.7.1 Pruebas fenotípicas cualitativas.....	32
IV.7.1.1 Tolerancia a altas concentraciones de fructosa.....	32
IV.7.1.2 Tolerancia al etanol	32
IV.7.1.3 Cambio de pH del medio	33
IV.7.1.4 Sensibilidad a toxina <i>killer</i>	33
IV.7.1.5 Fenotipo <i>killer</i>	33
IV.7.2 Prueba fenotípica cuantitativa	33
IV.7.2.1 Dinámicas de desarrollo de cepas de levaduras seleccionadas tolerantes a fructosa y etanol	33
IV.7.2.2 Análisis de curvas de crecimiento	34
IV.7.2.3 Determinación de las condiciones óptimas de las cepas pre-seleccionadas.....	34

IV.8 Microfermentaciones	35
IV.9 Diseño y análisis estadístico	35
V. RESULTADOS	36
V.1 Fermentación espontánea.....	36
V.1.1 Cambios físicos y químicos	36
V.1.2. Dinámicas de la microbiota	40
V.1.3 Análisis molecular por PCR-DGGE	43
V.1.4 Secuenciación masiva en paralelo por <i>Illumina Miseq</i>	49
V.2. Aislamiento e identificación de microorganismos autóctonos.....	57
V.3 Selección de levaduras.....	61
V.3.1 Preselección: pruebas fenotípicas cualitativas	61
V.3.2 Selección de levaduras con base en sus cinéticas de desarrollo.....	63
V.4 Fermentaciones de jugo de agave empleando levaduras seleccionadas.....	66
V.5 Evaluación del comportamiento de <i>S. cerevisiae</i> Teq-199 en combinación con bacterias.....	69
V.6 Desempeño del <i>S. cerevisiae</i> en fermentación de jugo de agave inoculado con un consorcio de bacterias.....	75
V. CONCLUSIONES	78
VI. REFERENCIAS	80
VII. ANEXOS	87

INDICE DE FIGURAS

2.1	Volúmenes de producción y exportación del tequila.	4
5.1	Análisis de componentes principales de los parámetros físicos y químicos de las fermentaciones espontáneas	39
5.2	Recuentos de levaduras y BAL en fermentaciones de jugos de agave.	41-43
5.3	Perfiles DGGE representativo de las dinámicas en general de levaduras.	43
5.4	Árbol filogenético de las secuencias de los productos de PCR-DGGE de levaduras utilizando el método de máxima verosimilitud.	44
5.5	Polimorfismos en las secuencias de las bandas identificadas como <i>S. cerevisiae</i>	44
5.6	Comparación de la producción de etanol respecto al tipo de tanque y año de muestreo, en relación a la presencia de <i>K. marxianus</i> .	45
5.7	Perfiles DGGE de muestras de jugo de agave representativas para identificar las bacterias presentes en las fermentaciones.	46
5.8	Perfiles de DGGE de bacterias en fermentaciones espontáneas de jugo de agave	47
5.9	Comparación de la producción de ácido láctico respecto al tipo de tanque y año de muestreo, en relación a la presencia de bacterias ácido lácticas.	48
5.10	Curvas de rarefacción de secuencias de bacterias en fermentaciones espontáneas de jugo de agave	49
5.11	Especies de levaduras encontrados en las fermentaciones espontáneas de jugo de agave.	52
5.12	Géneros de bacterias encontrados en las fermentaciones espontáneas de jugo de agave.	52
5.13	Análisis de factores múltiples de las fermentaciones de jugo de agave	54
5.14	Redes de interacciones bacterianas	55
5.15	Árbol filogenético de las cepas representativas de los perfiles RFLP para la identificación a nivel especie, creado con el método de máxima verosimilitud.	57
5.16	Porcentaje de especies de levaduras aisladas de muestras de jugo de agave fermentado en dos años.	58
5.17	Análisis de conglomerados de perfiles RISA de bacterias.	58
5.18	Árbol filogenético de las cepas representativas de los perfiles RISA	59
5.19	Porcentaje de especies de bacterias aisladas de muestras de jugo de agave fermentado en dos años.	60
5.20	Porcentaje de especies de levaduras pre-seleccionadas.	63
5.21	Parámetros cinéticos de las cepas de levaduras a diferentes concentraciones combinadas de fructosa y etanol.	64
5.22	Representación mediante un análisis de componentes principales del análisis de conglomerado de partición	66
5.23	Contorno de respuesta para consumo de fructosa, producción de etanol rendimiento de fermentación y gráficos superpuestos de condiciones óptimas	68
5.24	Crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> Teq-199 y especies de bacterias durante la fermentación de jugo de agave.	71
5.25	Evolución de la fermentación de jugo de agave inoculando la cepa Teq-199 y cepas de bacterias nativas.	72

5.26	Consumo de fructosa en fermentaciones de jugo de agave inoculando la levadura Teq-199 y cepas nativas de bacterias.	71
5.27	Producción de ácido acético en la fermentación de jugo de agave inoculando la levadura Teq-199 y especies nativas de bacterias.	73
5.28	Producción de ácido láctico en la fermentación de jugo de agave inoculando la levadura Teq-199 y especies nativas de bacterias.	73
5.29	Producción de etanol en la fermentación de jugo de agave inoculando la levadura Teq-199 y especies nativas de bacterias.	74
5.30	Concentración de urea producida por la levadura Teq-199 en conjunto con bacterias nativas en jugo de agave.	75
5.31	Curvas de desarrollo de levaduras y bacterias inoculadas simultáneamente en mosto de agave.	75
5.32	Consumo de azúcares y producción de metabolitos durante la fermentación de mosto de agave por <i>S. cerevisiae</i> Teq-199 y K1-V116 en presencia de bacterias nativas.	76

INDICE DE TABLAS

2.1	Composición de aminoácidos de jugo de agave y de uva	7
2.2	Características relevantes para la selección de levaduras	17
4.1	Descripción de muestras obtenidas de la destilería Corralejo	25
4.2	Combinación de concentraciones de fructosa y etanol en medio YPF	34
5.1	Parámetros físicos y químicos del mosto de agave inicial y al finalizar la fermentación.	37
5.2	Índices de diversidad α para bacterias en fermentaciones espontáneas de jugo de agave.	50
5.3	Número secuencias de las especies identificadas en tres fermentaciones espontáneas de jugo de agave.	51
5.4	Número de cepas de levaduras tolerantes a las pruebas fenotípicas.	62
5.5	Resumen de significancia estadística de variables que afectan el consumo de azúcar, producción de etanol y rendimiento fermentativo de las cepas K1-V116, 199, 230 y 231.	67
5.6	Temperatura óptima de desarrollo de las tres cepas de levadura seleccionadas y sus respectivas variables respuesta en fermentaciones llevadas a cabo en YPF a pH de 3.5 y concentración de fructosa de 10 %	69

INDICE DE ANEXOS

1	Dinámica de metabolitos durante las fermentaciones de jugo de agave.	88
2	Regiones de densidad de datos de los recuentos de BAL y concentración de ácido láctico respecto al pH	93
3	Número de aislamientos de las especies de levaduras durante la fermentación de jugo de agave.	94
4	Número de cepas tolerantes a pruebas fenotípicas por especie	95

I. INTRODUCCIÓN

El tequila es la bebida alcohólica más importante en México; reconocida a nivel mundial, y es exclusivamente obtenida de la destilación del jugo fermentado del *Agave tequilana* Weber var. Azul.

En los últimos años, la producción de tequila ha sufrido una marcada reducción mientras que los niveles de exportación y la demanda siguen en aumento. La causa de la disminución de la producción está asociada a problemas en el cultivo de agave por plagas y enfermedades, la planeación entre el cultivo de agave y la elaboración del tequila, además de deficiencias en la etapa de fermentación. La mejora del proceso tradicional de fermentación permitiría aumentar el rendimiento de conversión de azúcares a etanol y con ello, aumentar el volumen de tequila obtenido.

En las destilerías, la fermentación se puede llevar a cabo espontáneamente, adicionando cepas comerciales. En las fermentaciones espontáneas participan una variedad de géneros y especies de microorganismos. Éstos generalmente se desarrollan de manera secuencial en respuesta a los cambios en las condiciones del medio fermentativo. Entre lotes de producción, la microbiota puede ser distinta generando una calidad heterogénea. Para proveer homogeneidad en las producciones se recomienda iniciar la fermentación con un inóculo conocido, estandarizar el mosto de agave en cuanto azúcares iniciales, pH y nitrógeno asimilable y llevarla a cabo bajo condiciones controladas de temperatura. El uso de cultivos comerciales de *Saccharomyces cerevisiae* generalmente produce bajos rendimientos en alcohol, atribuido a la falta de adaptación de las cepas al sustrato. Se sabe que la selección de cepas nativas para ser usadas en la elaboración de vinos, de cerveza y de algunas bebidas destiladas, ha mejorado los rendimientos y la calidad de las bebidas.

El proceso de producción del tequila no ha sido investigado de manera profunda. Respecto a la fermentación espontánea, la información de la que se dispone se limita a describir la variación de microorganismos durante un solo proceso. Además, se desconoce el papel que desempeña cada uno de estos microorganismos durante el proceso de elaboración del tequila, las interacciones entre microorganismos y como influyen a la generación de metabolitos primarios.

Con relación a trabajos sobre selección de cepas nativas, éstos se han enfocado en estudiar las características metabólicas que presentan las levaduras aisladas del proceso y los compuestos volátiles que se generan durante la fermentación. Asimismo, no se ha estudiado la interacción de la cepa inoculada con la microbiota nativa específicamente con bacterias, ni los posibles efectos en las características del producto.

Por otra parte, durante la fermentación se pueden generar precursores de carbamato de etilo, un compuesto con potencial carcinogénico. El principal precursor es la urea, que es el producto de desecho de los microorganismos durante el metabolismo del nitrógeno. Es por ello que se busca evitar su acumulación en el proceso.

El estudio de la microbiota nativa puede llevarse a cabo desde un acercamiento polifásico empleando técnicas dependientes e independientes de cultivo, identificando las especies de microorganismos presentes y su dinámica, además de cómo varían los parámetros fermentativos en función de esa microbiota. Posteriormente, los microorganismos aislados pueden ser evaluados para su selección y evaluación de las interacciones con la microbiota nativa.

Es por ello que el objetivo de este trabajo es determinar la composición, estructura y dinámica de la microbiota presente durante el proceso de fermentación espontánea del jugo de agave y seleccionar cepas de bacterias y levaduras de interés tecnológico en el proceso de producción de tequila

II. ANTECEDENTES

II.1 El Tequila

II.1.1 Generalidades

En México, las especies del género *Agave* han sido ampliamente utilizadas desde la antigüedad. El uso económico más importante es la obtención de bebidas alcohólicas típicas principalmente tequila, mezcal, pulque y en menor medida raicilla, sotol y bacanora (Lachenmeier y col., 2006).

De éstas, el tequila es la bebida alcohólica mexicana más conocida a nivel mundial. Se define como aquella obtenida de la fermentación, destilación y rectificación de mostos preparados con los azúcares extraídos de cabezas de *Agave tequilana* Weber var. Azul, permitiéndose adicionar hasta 49 % de otros azúcares (azúcar de caña, melazas y/o jugo de otras especies de agave) en la preparación de dichos mostos (Macías, 2001).

Esta bebida tiene protección de territorio por su denominación de origen y solamente se puede producir en Jalisco y zonas de Tamaulipas, Nayarit, Michoacán y Guanajuato (SECOFI, 2012).

II.1.2 Clasificación del tequila

El tequila se clasifica con base en el tipo de añejamiento al que se somete después del destilado como se indica en la NOM-024-SCFI-2012, existiendo cuatro tipos (Ceballos-Magaña y col., 2013):

- a) Tequila blanco o plata, la bebida que es embotellada justo después del destilado.
- b) Tequila reposado al madurado por un periodo de 2 a 12 meses en barricas de roble o encino.
- c) Tequila añejo al madurado por un periodo de al menos 12 meses y el extra-añejo, el añejado por tres años.
- d) Tequila joven u oro es una mezcla del tequila blanco con añejo o extra-añejo, el cual se le adicionan color caramelo, jarabe de azúcar, glicerol y/o extracto de roble para simular características del tequila añejo.

II.1.3 Comercialización del tequila

En términos económicos el tequila es una bebida espirituosa de gran importancia a nivel mundial, y para México representa una fuente importante de ingresos. En 2013, se exportaron 149.1 millones de litros que se tradujeron en un ingreso de 996.9 millones de dólares, siendo exportado principalmente a EE. UU. y a la Unión Europea (CRT, 2018).

En los últimos años, el tequila ha sufrido una reducción de volumen de producción, pero un aumento en los niveles de exportación (Figura 2.1), debido a que, a pesar de la mayor presencia de las bebidas alcohólicas en el mercado, éste no ha logrado consolidar una red de productores que respondan de manera eficiente a la creciente demanda nacional e internacional. Esto se debe a que no se cuenta con una correcta planeación entre la producción de agave y la industrialización de tequila, presentándose periodos de sobreoferta seguidos por otros de escasez de materia prima. Además de este problema la plantación en amplias áreas de clones de plantas de agave, que reduce la diversidad genética de la especie, ocasiona que no haya resistencia a las plagas y enfermedades ocasionando pérdidas totales (Martínez-Gándara, 2008; Gerritsen y col., 2010).

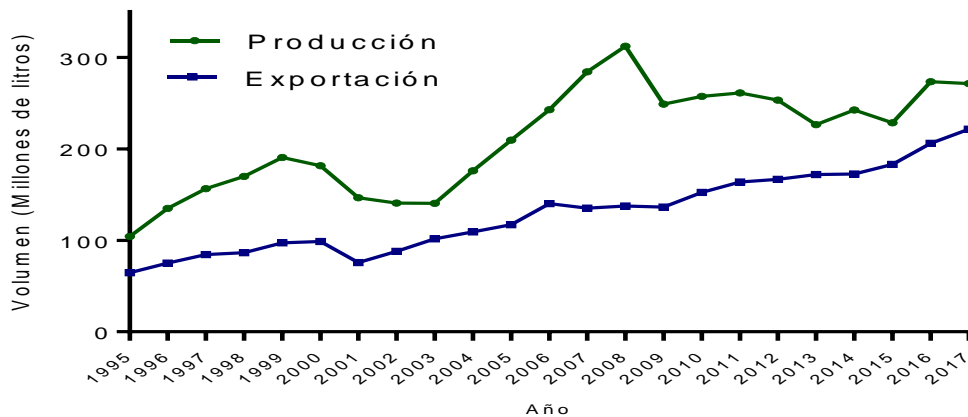


Figura 2.1 Volúmenes de producción y exportación del tequila (datos obtenidos del CRT, 2018).

II.2 Proceso de producción del tequila

La producción del tequila comprende dos fases distintas: (I) la agrícola de establecimiento y cultivo de la planta y (II) la industrial.

II.2.1 Cultivo de agave

El cultivo comprende actividades como son: la preparación de almácigos, del terreno y las labores culturales. Dentro de las labores culturales, encontramos: la fertilización, limpieza o desyerbe, control fitosanitario, y berbeo o corte de las hojas para su protección. Estas prácticas están enfocadas en la obtención de plantas maduras, que ocurre cuando éstas alcanzan entre ocho y diez años de edad, después de este tiempo ocurrirá la floración seguida de la senescencia y muerte (Macías, 2001).

Comercialmente, para mantener alta concentración de fructanos es necesario eliminar el meristemo floral, justo cuando comienza a aparecer, por lo que no ocurre la reproducción sexual (Gil-Vega y col., 2006). Por esta razón, el agave es propagado asexualmente mediante rizomas, lo que ha generado una menor variabilidad genética y por ello, una mayor sensibilidad a la proliferación de plagas y enfermedades. Entre las plagas y enfermedades más importantes que afectan el cultivo del agave, destacan: el picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus*); los hongos, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Thielaviopsis paradoxa* y *Cercospora agavicola*, y la bacteria *Pectobacterium carotovora* (Bowen y Valenzuela, 2009).

II.2.2 Proceso de obtención de tequila

Para la elaboración de tequila se siguen las siguientes etapas (Bautista-Justo y col., 2001):

a) Las llamadas “piñas” o “corazón” del agave con un peso que oscila entre 25 y 45 kg son cosechadas y transportadas a las plantas procesadoras.

b) Posteriormente, se realiza el cocimiento de las piñas, tradicionalmente colocándolas ya sea enteras o cortadas en fragmentos en hornos por un periodo de entre 36 a 48 horas. Este proceso permite que la inulina sea hidrolizada en unidades de fructosa y en menor proporción de glucosa. Actualmente se emplean autoclaves que permiten reducir el tiempo de cocción entre ocho a 12 horas.

c) El jugo de la piña cocida o mosto, se extrae mediante desgarramiento de la pulpa y posterior prensado con adición de agua que facilita la extracción de los azúcares. El mosto es ajustado a valores entre 10 y 12 grados Brix (°Bx) usualmente enriquecido con nitrógeno (urea o

sulfato de amonio) para la fermentación, dónde ocurre la conversión de los azúcares a etanol, dióxido de carbono y otros compuestos.

d) El mosto fermentado es destilado en alambiques de cobre o destiladores fraccionados. En esta fase, se obtiene un destilado de baja graduación alcohólica (22 % etanol) y las vinazas, que es el medio agotado de compuestos volátiles, conteniendo los sólidos, levaduras muertas, azúcares no fermentados y minerales.

e) El primer destilado, también llamado ordinario, se somete a otra destilación llamada rectificación, la cual concentra el etanol y otros alcoholes (Lachenmeier y col., 2006).

f) El tequila puede ser envasado inmediatamente o pasar a la etapa de añejamiento (Bautista-Justo y col., 2001).

En la actualidad, se ha desarrollado otra metodología para la obtención del jugo de agave, que consiste en la lixiviación de la inulina del agave crudo con agua caliente. La solución de inulina es tratada térmicamente para la hidrólisis.

El paso más importante en el proceso es la fermentación ya que es donde se generarán los compuestos que le darán las características al tequila. Sin embargo, no se obtiene regularmente el rendimiento adecuado de conversión de azúcar a etanol por lo que se generan volúmenes bajos de destilado. Optimizando este proceso, se podría aprovechar en mayor medida el agave disponible para obtener mayores volúmenes de destilado.

II.3 La fermentación en el tequila

II.3.1 Composición del jugo de agave

El jugo de agave contiene aproximadamente 4-10 % de azúcares, dependiendo de la cantidad de agua que se añadió durante la molienda en el proceso tradicional. En el nuevo procesamiento de obtención del mosto de agave, se obtienen concentraciones incluso por encima del 15 %. Arrizón y col. en 2010, determinaron que a mayor tiempo de maduración de la planta de *Agave tequilana*, el porcentaje de fructanos aumenta, llegando a ser 97.3 % del total de los azúcares presentes a los seis y medio años de maduración y solo 0.58, 0.79 y 0.74 % de glucosa libre, fructosa y sacarosa, respectivamente.

Después de la cocción, el jugo contiene 80 % de fructosa libre, 8 % de glucosa y 5 % de fructanos; también se encuentran presentes compuestos derivados de reacciones de Maillard, principalmente furanos, seguidos de piranos, compuestos azufrados y cetonas. Asimismo, son liberados de la estructura de la planta ácidos grasos y saponinas. Estos compuestos son descritos como inhibidores del desarrollo de microorganismos (Alcázar y col., 2017). La detección de compuestos heterocíclicos amínicos como pirazinas, piranonas y pirroles evidencia la presencia de otros aminoácidos en las piñas de agave (Mancilla-Margalli y col., 2002; Díaz-Montaña y col., 2008; Waleckx y col., 2008). En la Tabla 2.1, se muestran los aminoácidos presentes en el jugo de agave; en relación al jugo de uva; es evidente la menor concentración en el jugo de agave, por lo que es necesario complementar con alguna fuente de nitrógeno o utilizar una cepa con bajos requerimientos de nitrógeno para su desarrollo. Por estas características el mosto de agave presenta un medio hostil para levaduras comerciales, ya que no están adaptadas al sustrato influyendo en bajos rendimientos de etanol.

Tabla 2.1. Concentración de aminoácidos de jugo de agave y de uva (expresados como mg/L).

Aminoácidos	Jugo de agave	Jugo de uva
Alanina	0.72	58.5
Arginina	5.76	255.9
Aspartato	0.41	46.4
Glutamato	0.12	91.2
Glutamina	-	122.9
Glicina	0.44	4.1
Histidina	0.19	103.9
Isoleucina	0.06	13.4
Leucina	0.14	13.4
Lisina	0.06	76
Metionina	-	24.2
Fenilalanina	0.06	16.9
Serina	1.34	53.1
Treonina	0.32	51.6
Tirosina	0.22	13.3
Valina	0.14	17.7

Fuente: Díaz-Montaña y col., 2008.

II.3.2 Cambios que ocurren durante la fermentación

Durante la fermentación alcohólica, los microorganismos utilizan los azúcares y otros compuestos provenientes del mosto como sustratos para su crecimiento, así como para la conversión a etanol, dióxido de carbono y otros productos que contribuyen a la composición y calidad de la bebida fermentada (Fleet, 2003).

Durante la producción de mezcal y tequila pueden ocurrir eventos en cualquier parte de las fases de producción que tienen el potencial de afectar la calidad y rendimientos finales. Las características sensoriales y el *bouquet* de las bebidas espirituosas, son determinadas por una mezcla de compuestos tales como: alcoholes superiores volátiles, ésteres, acetales, terpenos, furanos, ácidos, aldehídos, cetonas, fenoles y sulfuros. La mayoría de estos compuestos son producidos durante la fermentación y otros provienen de la planta de agave, incluyendo algunos terpenos y ácidos grasos de cadena larga. La actividad de la flora microbiana presente durante la fermentación, producen la mayoría de estos compuestos o los liberan de la estructura de la planta. Por lo tanto, la fermentación es la etapa crítica para el desarrollo de la calidad de la bebida espirituosa de agave (Escalante-Minakata y col., 2008; De León-Rodríguez y col., 2008b; Pinal y col., 2009; Narváez-Zapata y col., 2010).

Durante la fermentación alcohólica pueden encontrarse varios géneros y especies de microorganismos que comúnmente siguen un desarrollo secuencial. Por ejemplo, en la vinificación, las levaduras no-*Saccharomyces* son el primer grupo que domina, seguido de *Saccharomyces* que normalmente completa la fermentación alcohólica. Después de que esta fermentación finaliza, la fermentación maloláctica puede ser llevada a cabo por *Oenococcus* u otras bacterias ácido lácticas (Fugelsang y Edwards, 2007). En la producción de cachaça, una bebida brasileña producida a partir de caña de azúcar, se ha observado la presencia de varias especies de levaduras como *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia heimii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia subpelliculosa*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia methanolica*, *Saccharomyces cerevisiae*, y también algunas bacterias ácido lácticas, acéticas y enterobacterias (Ferreira y col., 2013).

En vinos y whiskies, altas concentraciones de bacterias, pueden competir con las levaduras por los nutrientes y con ello afectar la producción de etanol. Sin embargo, se ha observado que un crecimiento de bacterias, principalmente bacterias ácido lácticas, al final de la

fermentación alcohólica, utilizando los nutrientes residuales del mosto y los liberados de células de levaduras autolisadas, produce un efecto benéfico en el sabor de la bebida final (Bauer y Pretorius, 2002; Van Beek y Priest, 2001; König y Frölich, 2009).

II.3.3 Etil carbamato

Durante la fermentación, además de etanol y compuestos que generan las características sensoriales del destilado, también se producen otros compuestos, entre ellos el etil carbamato, que ha causado una creciente preocupación. Debido a estudios realizados en animales se ha clasificado como posible carcinógeno a humanos (grupo 2B). Un estimado del límite inferior carcinogénico de dosis permitida de etil carbamato es de 0.3 mg/Kg/día (Beland y col., 2005).

El etil carbamato se produce en bajos niveles a partir de distintos precursores como ácido cianhídrico, urea, citrulina y compuestos N-carbámicos que reaccionan con etanol en alimentos fermentados, alimentos horneados y bebidas alcohólicas (Beland y col., 2005; Uthurry y col., 2006).

La urea se encuentra en muchos alimentos fermentados como yogurt, queso, alimentos horneados y en bebidas alcohólicas. Se puede encontrar desde la materia prima o es producida por microorganismos como *S. cerevisiae* como producto de desecho de la metabolización de la arginina.

Las bebidas destiladas, por ejemplo, las bebidas espirituosas derivadas de frutos con semilla, muestran la mayor concentración de etil carbamato. Por ello, en Canadá se impuso el límite superior de 0.15 mg/L, el cual ha sido adoptado por muchos países (Lachenmeier y col., 2009).

En la mayoría de los casos se han logrado controlar las concentraciones de etil carbamato mediante dos formas: i) reduciendo los precursores en alimentos y bebidas, y ii) evitando que estos precursores reaccionen formando cianato que es el más volátil (Hasnip y col., 2007).

En el tequila, debido a que las fermentaciones suelen ser prolongadas, y, por ende, se tiene mayor riesgo a que se generen precursores del etil carbamato, aunado al proceso de destilación es uno de los compuestos que pone en riesgo su inocuidad. En las diferentes categorías

del tequila se han cuantificado niveles promedio de 0.07 mg/L encontrándose dentro de la norma canadiense (Lachenmeier y col. 2009). Sin embargo, es necesaria la aplicación de medidas para evitar su generación.

II.4 Métodos para inducir la fermentación en el tequila

Debido al auge que ha tenido el tequila internacionalmente y en consecuencia al aumento en la demanda de este producto, desde la década de los noventa los principales productores de tequila han estado buscando nuevas estrategias para la mejora de los procesos de producción de la bebida. En algunas destilerías las fermentaciones ocurren espontáneamente y en consecuencia las características sensoriales pueden variar entre lotes de producción. Actualmente, para proveer una calidad homogénea en todos los productos se recomienda iniciar la fermentación con un inóculo idéntico y llevarla a cabo bajo condiciones controladas (Lappe-Oliveras y col., 2008; Hernández-Cortés y col., 2010).

Varios autores han realizado estudios relacionados con la identificación de las levaduras en fermentaciones espontáneas de bebidas destiladas de agave, la producción de estas bebidas mediante la inoculación ya sea de cepas comerciales de *Saccharomyces* obtenidas de la producción de vinos, u obtenidas del jugo de agave aisladas en diferentes etapas del proceso y en menor medida, han estudiado la relación de los cambios en las comunidades bacterianas y de levaduras, y las características físicas y químicas del mosto a lo largo de la fermentación espontánea. Un resumen de estas investigaciones se presenta a continuación.

II.4.1 Fermentación espontánea

En las fermentaciones espontáneas, los microorganismos nativos llevan a cabo la conversión de azúcares a alcohol y a otros compuestos, incluidos compuestos volátiles, que dan como resultado una gran complejidad aromática del producto terminado (Navarrete-Bolaños, 2012).

La fermentación del mezcal ha sido ampliamente estudiada, a diferencia del tequila en donde la información es más limitada. De los trabajos realizados por Lachance (1995), Andrade-Meneses y Ruíz-Terán (2004), Escalante-Minakata y col. (2008), Soto-García y col. (2009), Narváez-Zapata y col. (2010), Verdugo y col. (2011) se concluye que las comunidades de

levaduras nativas son diferentes en tequila y mezcal, y que pueden estar determinadas por la especie de *Agave* y el área geográfica en donde se cultivan. En general, se observó que *S. cerevisiae* no fue la levadura predominante durante la fermentación, sino géneros de no-*Saccharomyces* como *Kluyveromyces*, *Candida*, *Zygosaccharomyces* y *Pichia*.

La participación de las bacterias lácticas en los procesos de fermentación también es de importancia, se ha reportado su presencia en otras bebidas destiladas como el whisky, brandy y cachaça desde el inicio e incluso hasta estadios finales de las fermentaciones. Se ha señalado que las bacterias lácticas tienen un efecto benéfico en el sabor de la bebida espirituosa final (Barbour y Priest, 1988; Van Beek y Priest, 2002; du Plessis y col., 2002; du Plessis y col., 2004; de Carvalho-Netto, 2008). En el tequila y mezcal su participación ha sido poco estudiada. Únicamente existen dos trabajos en donde se caracterizó la diversidad de bacterias ácido lácticas durante la fermentación de mezcal sin llegar a evaluarse el papel que desempeñan en la fermentación (Escalante-Minakata y col., 2008; Narváez-Zapata y col., 2010).

Otro aspecto de interés para los productores de mezcal y tequila es la optimización de tiempo de fermentación y eficiencia en sus procesos. Se han observado tiempos de fermentación de 50 h a una temperatura de 32 °C, mientras que a 22 y 18 °C son necesarios 100 y 140 h, respectivamente (Soto-García y col., 2009). Terán y col. (2002) reportaron que el tiempo para finalizar una fermentación espontánea a 25 °C es de 196 h. Sin embargo, al adicionarse un cultivo iniciador y controlar las condiciones del proceso, ocurre una reducción significativa del tiempo de fermentación. Terán y col (2002) indican que en la empresa Casa Cuervo se adiciona un inóculo al jugo de agave y la fermentación se lleva a cabo a 34 °C finalizando en 18 h.

Las condiciones óptimas que se han reportado en fermentaciones espontáneas, pudieran no necesariamente conducir siempre a la obtención de las mismas características en el producto terminado ya que, al emplear un inóculo no controlado, el tipo y número de microorganismos que integran las comunidades microbianas puede variar en cada lote de producción afectando las características sensoriales del destilado obtenido.

II.4.2 Fermentación inoculando levaduras comerciales

Para hacer eficiente la producción de mezcal y tequila, los productores han propuesto la reducción del tiempo de fermentación empleando cultivos comerciales, que consisten principalmente en levaduras aisladas del ambiente de producción de vinos. Pinal y col. (1997) emplearon dos cepas de *S. cerevisiae* para la producción de tequila: una cepa nativa aislada a partir del mosto de uva y otra cepa nativa de panadería. Los autores concluyeron que la cepa de la levadura juega un papel importante en el desarrollo de las características sensoriales en el tequila, debido a que cada una generó diferentes alcoholes superiores y cantidades de ellos. También observaron que la temperatura y las proporciones de carbono/nitrógeno tienen un efecto en la producción de alcoholes superiores en la fermentación. La fuente de nitrógeno y el nivel de inóculo de las levaduras no tuvieron influencia en la producción de compuestos volátiles (alcohol isoamílico y alcohol isobutílico) responsables de algunas características sensoriales. La producción de estos compuestos volátiles se detectó después de la reducción sustancial de los azúcares y continuaron generándose posteriormente a la finalización de la fermentación alcohólica, confirmando la creencia empírica que prevalece en la industria tequilera, de que el tequila elaborado mediante una fermentación lenta es más rico en sabor y aroma comparado con aquellos que son obtenidos a partir de procesos rápidos.

II.4.3 Fermentación inoculando levaduras autóctonas seleccionadas

Las levaduras comerciales que se emplean como cultivo iniciador para la producción de bebidas de agave muestran reducida velocidad de crecimiento, baja productividad de etanol y bajos rendimientos de conversión dado que estos microorganismos no se encuentran adaptados a las condiciones del jugo de agave, en donde el principal azúcar es la fructosa y la concentración de nitrógeno es reducida. Recientemente, se han aislado levaduras autóctonas (a menudo sólo cepas de *S. cerevisiae*) del proceso de producción del tequila. Estas cepas se han empleado como cultivo iniciador añadiéndose al jugo de agave, que es suplementado con fuentes de nitrógeno para reducir los tiempos de fermentación y garantizar la calidad constante en el producto final (Escalante-Minakata y col., 2008; Hernández-Cortés y col., 2010).

En la fermentación espontánea se ha reportado una alta diversidad genética en diferentes levaduras aisladas de bebidas destiladas de *Agave*. La cepa de levadura es el factor más importante

en la producción de la cantidad de alcoholes superiores y etanol en la fermentación. Se ha reportado que las cepas de levaduras nativas aisladas del proceso del tequila producen mayores cantidades de componentes como alcohol isoamílico e isobutanol comparado con cepas de panadería (Lachenmeier y col., 2006).

En varios trabajos centrados en el estudio de la producción de tequila se han aislado cepas de *S. cerevisiae*, *Kloeckera africana*, *K. apiculata*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida magnolia*, *C. krusei* y *Pichia kluyveri* los cuales han mostrado mayor generación de etanol y producción de compuestos volátiles comparadas con cepas comerciales. Además, se han encontrado cepas que tienen la capacidad de liberar terpenoides y otros compuestos volátiles a lo largo de la fermentación; al realizarse evaluaciones de cepas nativas de jugo de uva y de agave en cada sustrato, las cepas aisladas del jugo de agave mostraron mayor tolerancia al etanol, al dióxido de azufre y oxiclورو de cobre, compuestos usados en vinificación para inhibir el crecimiento de bacterias (Fiore y col., 2005).

Algunos autores han señalado la importancia de aislar cepas que presenten bajos requerimientos de nitrógeno para aumentar la efectividad de conversión en fermentaciones. La diversidad fenotípica a nivel cepa confirma el potencial de las levaduras nativas en la producción de tequila, vinos y cervezas, dónde la tendencia es la de seleccionar y usar levaduras nativas específicas para producciones específicas. Una mezcla de cepas nativas podría ser utilizada para la producción de tequila con aroma deseable y único (Arrizón y Gshaedler, 2002; Fiore y col., 2005; Arrizón y col., 2007b; Gshaedler, 2007a; Arellano y col., 2008; González-Hernández y col., 2012; López-Álvarez y col., 2012; Amaya-Delgado y col., 2013; Oliva y col., 2013).

Algunas investigaciones están encaminadas a la optimización del proceso haciendo uso de una cepa nativa seleccionada. Por ejemplo, se realizó el estudio inoculando una cepa de *S. cerevisiae* y una de *K. africana* a jugo de agave suplementado con distintas fuentes de nitrógeno. Se observó que la adición de extracto de levadura aumentó el crecimiento, capacidad fermentativa y tolerancia al etanol de *K. africana* con parámetros fermentativos similares a *S. cerevisiae*. (Díaz-Montaña y col., 2010). Hernández-Cortés y col. (2010) evaluaron el empleo de dos cepas de *S. cerevisiae* de jugo de agave para producción de tequila y el efecto del pH, aireación y tipo de alimentación (jugo de agave estéril y no estéril) en una fermentación en continuo. El pH no afectó

la capacidad fermentativa y la aireación aumentó la producción de etanol, biomasa y glicerol. Adicionalmente, se observó un aumento en el consumo de amonio y azúcares reductores y en la concentración de ácido succínico en el jugo fermentado. El rol del tipo de cepa no pudo ser asociado con ninguna respuesta ya que no se realizó la comparación entre variables. El uso de jugo de agave no estéril mostró efecto en el etanol producido, en la presencia de diacetilo, acetoína y ácido succínico, los cuales pueden asociarse a la actividad de levaduras y bacterias nativas. Morán-Marroquín y col. (2011) evaluaron las mismas dos cepas de *S. cerevisiae* en fermentaciones continuas observando el efecto de la velocidad de dilución, la adición de fuentes de nitrógeno y fósforo, y la micro-aireación en el crecimiento, síntesis de etanol y compuestos volátiles. Las cepas mostraron diferencias en la producción de etanol, consumo de azúcares reductores y el tipo de compuestos volátiles producidos. Estas diferencias se asociaron con las características metabólicas inherentes a cada cepa, así como el efecto de la velocidad de dilución, adición de fosfato de amonio y micro-aireación. Pinal y col. (2009), determinaron el efecto de dos cepas de *S. cerevisiae* aisladas del proceso del tequila, de la edad de la planta de agave y de la localización del campo de cultivo sobre los parámetros cinéticos y los compuestos volátiles producidos en el proceso de fermentación. Se concluyó que la producción de etanol es afectada por la locación del campo de cultivo y la cepa de levadura empleada. La generación de compuestos volátiles acetato de etilo, alcoholes amílicos, 1-metil-propanol y 2-fenil-etanol varió según la cepa de levadura empleada.

II.5 Técnicas de estudio de comunidades microbianas durante la fermentación

El objetivo final del estudio de la ecología microbiana es el de elucidar los factores que controlan las comunidades microbianas, examinando la interacción de los microorganismos y la relación entre ellos y las características bióticas y abióticas del medio (Lozupone y col., 2007).

En la industria de los alimentos es de suma importancia buscar tanto la presencia como el número y tipo de microorganismo que se encuentran en el proceso y el producto terminado. Se tienen varios enfoques en el estudio de comunidades: identificar la flora microbiana de cultivos iniciadores y alimentos, determinar el número total de microorganismos, detectar cepas o biotipos particulares y detectar microorganismos patógenos o deterioradores (Giraffa y Carminati, 2008).

El desarrollo de tecnologías tales como la producción de perfiles empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR con transcriptasa reversa, PCR en tiempo real, genes

reporteros, hibridación fluorescente *in situ*, ha permitido el estudio de las dinámicas de comunidades simples o pequeños grupos de organismos dominantes en escenarios naturales (Gentry y col., 2006). Estas metodologías independientes de cultivo son relativamente fáciles de aplicar y con resultados rápidos, en las que se vislumbra el panorama completo de la comunidad.

Los métodos empleados generalmente se basan en la amplificación de una sola región variable o la totalidad de un gen, principalmente los genes que codifican para el ARNr, aunque también puede realizarse mediante la extracción del ARN desde el alimento y su amplificación por transcripción reversa (RT-PCR), lo que permitiría distinguir aquellos microorganismos que se encuentran metabólicamente activos (Giraffa y Carminati, 2008).

Existen varias técnicas para monitorear los cambios en la estructura y composición de la comunidad de microorganismos, como el análisis del espaciador intergénico ribosomal (RISA, por sus siglas en inglés), que implica la amplificación de la región intergénica de los genes del ARNr usando la totalidad del ADN de la comunidad, con iniciadores que tienen como blanco regiones conservadas. Esta región presenta una mezcla de segmentos altamente conservados y de moderada a alta variabilidad entre especies incluso a nivel de cepas (Fisher y Triplett, 1999; Sasche, 2004).

Otra técnica utilizada, es el análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés). En esta técnica se amplifica una región de un gen presente en la comunidad total. Los amplicones son digeridos con una o más enzimas de restricción que tienen sitios de reconocimiento, principalmente de cuatro pares de bases (Schütte y col., 2008; Bokulich y col., 2012).

Las regiones más empleadas han sido la región pequeña (16S o 18S) o en el caso específico de levaduras la región intergénica ITS1- 5.8S-ITS2 del ARNr, que ha mostrado tener mejores resultados al presentar una mayor variabilidad intraespecie (Esteve-Zarzoso y col., 1999). Sin embargo, las comunidades metabólicamente activas no pueden ser estudiadas a partir de intrones (regiones intergénicas) ya que en el ARNm madurado no contiene estas regiones.

Actualmente, la pirosecuenciación ha revolucionado el campo de la ecología microbiana, permitiendo una identificación más certera de los microorganismos, incluso aquellos que son difíciles de cultivar y/o que se encuentran en muy poca abundancia (Sogin y col., 2006). Se basa

en el método de secuenciación por síntesis, empleado enzimas específicas y las reacciones lumínicas asociadas para registrar cada inserción de nucleótidos en la cadena de ADN complementario, permitiendo la secuenciación paralela masiva de millones de cadenas de ADN (Grace, 2010).

Estas metodologías son de gran ayuda para determinar la estructura y dinámica durante procesos biológicos. A pesar de que las técnicas dependientes de cultivo son costosas, laboriosas y tardadas, son de suma importancia para la recuperación de cepas que pueden ser caracterizados además de corroborar los resultados de las técnicas independientes de cultivo.

Para la identificación de levaduras provenientes de vinificación, se ha usado la amplificación y secuenciación de la región D1 y D2 localizados en el gen 26S, principalmente por la disponibilidad de bases de datos de secuencias. Además de estas secuencias, la región espaciadora entre genes del ARNr ha sido usada para diferenciar a nivel de subespecie aplicada a bacterias y levaduras (Fernández-Espinar y col., 2006; Mills y col., 2008). Para bacterias, la amplificación y secuenciación del gen 16S, permite identificar a nivel de especie y la región intergénica espaciadora 16S-23S permite identificar hasta nivel cepa (Mills y col., 2008).

Estas metodologías se pueden aplicar para determinar la composición, estructura y dinámica de las comunidades microbianas durante la fermentación del jugo de agave para la producción de tequila, empleando las técnicas independientes de cultivo como DGGE y pirosecuenciación para determinar los cambios de las comunidades y conjuntando con el aislamiento e identificación mediante la secuenciación, y caracterización fenotípica para seleccionar cepas que puedan mejorar la eficiencia de la fermentación.

II.6 Selección de microorganismos nativos

En adición del rol primario de las levaduras de catalizar la conversión eficiente y completa de azúcares a etanol sin el desarrollo de sabores desagradables, las cepas para el cultivo iniciador deben poseer otras propiedades que dependerán del tipo de bebida (Tabla 2.2).

La selección de levaduras consiste en la identificación de aquellos cultivos que pueden fermentar el sustrato eficientemente y producir un producto de buena calidad. La selección se basa en el enriquecimiento de un género, es decir crear las condiciones que favorezcan el crecimiento

de un microorganismo en una población mixta e inhibir el resto. Principalmente, la alta concentración de etanol es el factor para la selección de cepas (Rainieri y Pretorius, 2000).

Tabla 2.2 Características relevantes para la selección de levaduras (modificado de Pretorius, 2000).

Propiedades de fermentación	Propiedades tecnológicas
Iniciación rápida de la fermentación	Alta estabilidad genética
Alta eficiencia fermentativa	Baja formación de espuma
Alta tolerancia de etanol	Propiedades de floculación
Alta osmotolerancia	Sedimentos compactos
Temperatura óptima baja	Resistencia a disecación
Producción moderada de biomasa	Producción de toxina killer
Características de sabor	Marcaje genético
Bajas producción de sulfuro, dimetil sulfato y tioles	Actividad proteolítica
Baja producción de acidez volátil	Baja demanda de nitrógeno
Baja producción de alcoholes superiores	Propiedades metabólicas con implicaciones en la salud
Liberación de precursores de sabor	Baja formación de compuestos sulfurados
Actividad hidrolítica	Baja formación de aminas biogénicas
Autólisis	Baja formación de precursores de etil carbamato
Actividad esterasa modificada	

En la fermentación del tequila, primariamente, se buscan microorganismos con ciertas características como buenos parámetros fermentativos que implícitamente incluyen alta osmotolerancia y tolerancia de etanol, la baja demanda de nitrógeno, la baja producción de precursores de etil carbamato y preferentemente, la producción de toxina *killer*, los cuales se describen a continuación.

II.6.1 Parámetros fermentativos

La velocidad y la cantidad de alcohol producido por unidad de azúcar durante la fermentación del mosto son características de importancia comercial. Durante la glucólisis, una molécula de glucosa o fructosa se transforman en dos moléculas de etanol y de CO₂. Sin embargo, no todos los azúcares se transforman en etanol, sino también en biomasa y otros productos como glicerol. El paso primordial y limitante para la fermentación es la interiorización de azúcares a la célula. Para fructosa, el principal azúcar en jugo de agave, el transporte ocurre mediante difusión facilitada en vez de transporte activo, aunque se sabe que existen especies (*S. bayanus* y *S. pastorianus*) que poseen cotransportadores fructosa-protones (Pretorius, 2000).

Las altas concentraciones de azúcares y de etanol, resulta en la inhibición del crecimiento, viabilidad y capacidad de fermentación de los microorganismos. Se sabe que el preacodicionamiento, como la exposición a concentraciones crecientes de etanol, las respuestas adaptativas al estrés son activadas, confiriendo al microorganismo un grado de resistencia a concentraciones mayores. También juegan un papel importante en la tolerancia al etanol: la presión osmótica, composición del medio de cultivo, modos de alimentación de sustrato, formación de productos de desecho, la presencia de factores de supervivencia como los ácidos grasos insaturados de cadena larga y esteroides (Pretorius, 2000).

II.6.2 Demanda de nitrógeno

El nitrógeno es el segundo nutriente más importante asimilado por los microorganismos durante la fermentación. Deficiencias en el suministro de compuestos nitrogenados asimilables causa bajos rendimientos o el paro total de la fermentación. La principal fuente de nitrógeno son los iones amonio y, en segundo lugar, los aminoácidos. Las cepas de levaduras varían ampliamente en sus requerimientos de nitrógeno, lo que indica que el objetivo es seleccionar la cepa que presente mejores eficiencias de utilización en mostos con bajos niveles de nitrógeno (Pretorius, 2000).

II.6.3 Formación de etil carbamato

Como se señaló previamente, la urea es el principal precursor del etil carbamato. En la levadura *S. cerevisiae*, la urea se produce a partir de hidrólisis de arginina por la arginasa codificada por CARI. En este proceso se convierte en ornitina, amonio y dióxido de carbono, en el que la urea es un producto intermediario. La urea se excreta al medio por ciertas cepas de levaduras que en las condiciones de fermentación no puede ser metabolizada. Algunos esfuerzos por reducir este precursor han sido el uso de ureasas resistentes a acidez, la silenciación del gen CARI, construcción de un operón para la síntesis de ureasa. Sin embargo, no se han logrado reducir en gran medida las concentraciones en el medio de este metabolito. La selección de levaduras con baja producción de urea o el uso de cepas que utilicen la urea siguen siendo las opciones más favorables (Pretorius, 2003).

II.6.4 Efecto *Killer*

Bevan y Makower (1963) reportaron por primera vez en levaduras, que algunas cepas aisladas de *S. cerevisiae* secretaban una sustancia que era letal para otras cepas de la misma especie.

En *S. cerevisiae* la producción de toxina *killer* es causado por la infección de virus citoplasmáticos persistentes de ARN de doble cadena, denominados virus crípticos o partículas parecidas a virus. Esta determina la producción y secreción de proteínas de bajo peso molecular y glicoproteínas tóxicas que matan cepas sensibles de la misma especie o con relación cercana, mediante la distorsión del gradiente de pH de membrana o por el bloqueo de la síntesis de ADN. La capacidad de secretar la toxina se le conoce cómo fenotipo *killer*. La transferencia del virus es estrictamente vertical, es decir, son solamente heredada después de la división celular o por apareamiento con una célula donante (Fink y col., 1972; Leis y col., 2005).

Se cree que las cepas *killer* son ubicuas en especies de *Saccharomyces* y otros géneros. Se han encontrado cepas *killer* a partir de frutos, hongos, fermentaciones espontáneas, suelo, material de plantas en degradación, al igual que de humanos (Pieczyńska y col., 2013).

El uso de cepas que generen características deseables y que sean fenotipo *killer* es de gran potencial para llevar a cabo la fermentación (Schmitt y col., 2009).

II.7 Perspectivas en el estudio de fermentación del tequila

Las investigaciones hasta ahora realizadas sobre la fermentación del tequila se han enfocado en estudiar las características que presentan las levaduras aisladas del proceso y los compuestos que se generan durante la fermentación. Sin embargo, no se ha verificado que la cepa inoculada sea la responsable de los cambios en el jugo de agave es la cepa que ha sido inoculada, o bien es el resultado de a la interacción de distintas cepas de levaduras y bacterias.

En bebidas destiladas de agave se tiene disponible muy poca información, debido quizá a que las grandes empresas productoras realizan investigación privada que no se difunde. Las investigaciones están limitadas a estudios puntuales; es decir, a un solo proceso de fermentación en una producción dada por lo que no es posible determinar si la microbiota se va modificando en

cada lote, además entre estos estudios se ha reportado la presencia de levaduras o de bacterias de forma individual. Para entender mejor la producción de estas bebidas tradicionales, en particular la fermentación del tequila, se requiere de estudios longitudinales para observar la evolución de las comunidades microbianas a través de técnicas moleculares, y determinar el papel que juegan en la generación de ciertas características de la bebida. El aislamiento de microorganismos y su posterior estudio basados en características de interés tecnológico permitirá tener la información necesaria para establecer un cultivo iniciador que permita llevar a cabo fermentaciones controladas y, en consecuencia, mejorar las características y el rendimiento en la producción de tequila.

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo general

Determinar la composición, estructura y dinámica de la microbiota presente durante el proceso de fermentación espontánea del jugo de *Agave tequilana* y seleccionar cepas de bacterias y levaduras de interés tecnológico en el proceso de producción de tequila

III.2 Objetivos particulares

1. Determinar la composición, estructura y dinámica de la microbiota (levaduras y bacterias) en la fermentación espontánea de jugo de agave mediante métodos moleculares.
2. Aislar e identificar microorganismos autóctonos durante la fermentación de tequila.
3. Seleccionar levaduras nativas con características de interés tecnológico en la producción de tequila.
4. Evaluar las dinámicas de desarrollo de levaduras nativas seleccionadas bajo condiciones de altas concentraciones de azúcares y etanol.
5. Determinar el comportamiento fermentativo *in vitro* de la levadura nativa seleccionada.

IV. HIPÓTESIS

La caracterización de la microbiota en la fermentación del tequila mediante técnicas moleculares y el aislamiento y selección de cepas nativas de levaduras permitirá la generación de un cultivo iniciador que, al adicionarse en el jugo de agave para inducir la fermentación, mejorará el consumo de fructosa, producción de etanol y, por tanto, el rendimiento del proceso.

IV. METODOLOGÍA

IV.1 Equipo

Espectrofotómetro. Spectronic Instruments Genesys 2

Equipo de electroforesis. Owl Easycast B2, Thermo scientific

Fuente de poder para electroforesis. EPS301, GE

Fotodocumentador MiniBis. *DNR Bioimaging*

Termociclador. Techne TC512

Centrifuga Universal. Zentrifuge Z400, Hermle

Balanza analítica. Denver Instruments APX-602

Baño termostático. Shel Lab

Potenciómetro. Orion 410A

Nanodrop 2000. Thermo scientific

HPLC IR-UV Prominence-i LC-2030 C. Shimadzu

DCode system for DGGE. Biorad

IV.2 Materiales

Cajas de petri

Tubos con tapón de rosca

Micropipetas

Puntas 0.5-10 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L

Microtubos (1.5 mL)

Tubos para PCR (200 μ L)

IV.3 Reactivos

Agar MRS, BD Difco

Agar papa dextrosa, Difco

Agar WL nutritivo modificado (para 1 L: extracto de levadura 4 g, peptona de caseína 5 g, fructosa 25 g, K_2HPO_3 0.55g, KCl 0.425g, $CaCl_2$ 0.125 g, $MgSO_4$ 0.125g, $FeCl_3$ 0.0025g, $MnSO_4$ 0.0025g, verde de bromocresol 0.022g, agar 20g, pH 5.5)

Caldo MRS, BD Bioxon

Caldo YPD y YPF, BD Bioxon
Peptona de caseína, BD Bioxon
Glicerol, Meyer
Agua libre de nucleasas, SIGMA
Etanol absoluto, Meyer
Tampón TBE 10x, Ultrapure™, Invitrogen
Tampón TE Ultrapure™, Invitrogen
Tampón de carga 10x, Invitrogen
Solución stock de dNTP (2.5µM), Invitrogen
Solución stock de iniciadores: ITSf (5'-GTCGTAACAAGGTAGCCGTA-3') e ITSReub (5'-GCCAAGGCATCCACC-3'), ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y 1492R (GGTACCTTGTTACGACCTT), NL1 (GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) y NL4 (GGTCCGTCTTTCAAGACGG), RF2 (5'-CGGCCCTGT-3'), M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'), Integrated DNA Technologies
Marcador de peso molecular de ADN 100 pb, Invitrogen
TaKaRa Ex Taq™ hot start version
Kit de extracción Powerfood Microbial, DNA Isolation kit, MoBio
Illustra GFX PCR DNA and Gel Band purification, GE Healthcare
EcoR1, Invitrogen
HaeIII, Invitrogen
Agarosa Ultrapure™, Invitrogen
Solución de bromuro de etidio (0.5 µg/mL)
Solución NaOH 1M
Buffer de citrato/fostato, Invitrogen
Buffer TNES (Tris 50 mM, 0.4M NaCl, 100 mM EDTA y 0.5 % SDS)

IV.4 Obtención de muestras

Jugo de agave proveniente de tanques de recepción y fermentación de la destiladora Corralejo localizada en Guanajuato se colectaron de manera aséptica en frascos Schott en distintas

fechas de muestreo en el periodo de producción comprendido entre enero y febrero de los años 2015 y 2016 (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Descripción de muestras obtenidas de la destilería Corralejo.

Muestra	Fecha	Tanque de procedencia
A	23/01/2015	Fermentación (tanque 20)
B		Fermentación (tanque 20)
C		Fermentación (tanque 28)
D		Fermentación (tanque 28)
E	10/02/2015	Fermentación (tanque 20)
F		Fermentación (tanque 20)
G		Fermentación (tanque 20)
H		Recepción
I		Recepción
J		Recepción
K	18/01/2016	Recepción
L		Fermentación (tanque 18)
M		Fermentación (tanque 19)
N	28/01/2016	Recepción
O		Fermentación (tanque 20)
P	21/02/2016	Recepción
Q		Fermentación (tanque 22)

IV.5 Fermentación espontánea

IV.5.1 Fermentación por microflora nativa

De cada muestra se colocaron 400 mL de jugo de agave por duplicado en frascos Schott de 500 mL y se incubaron a 35 °C para inducir la fermentación. Se realizó el análisis físico, químico, microbiológico tradicional y molecular del jugo en fermentación cada 24 h.

IV.5.2 Análisis físicos y químicos

IV.5.2.1 Comportamiento fermentativo

Se realizó el pesado de los matraces con jugo de agave durante la fermentación hasta encontrar un valor constante de peso. Se determinó el porcentaje de CO₂ desprendido por unidad de tiempo.

IV.5.2.2 Grados Brix

Se cuantificaron los sólidos solubles en °Brix utilizando un refractómetro a 25 °C.

IV.5.2.3 pH

Se midió el pH del mosto a 20 °C del mosto al que se eliminó previamente el CO₂ mediante agitación hasta no observar desprendimiento de burbujas.

IV.5.2.3 Urea

Se midió la concentración en el mosto final mediante el *Urea assay kit* (Sigma Aldrich)

IV.5.2.4 Cuantificación de metabolitos mediante HPLC con detector IR

Se preparó la muestra de jugo de agave fermentado mediante centrifugación a 15000 g por 5 min, el sobrenadante se diluyó 1:100 con agua calidad HPLC (volumen final de 1.5 mL) y se filtró utilizando una membrana de 0.45 µm de diámetro de poro.

Se preparó la curva patrón con 10 g/L de sacarosa, glucosa, fructosa, ácido láctico, etanol, y 5 g/L de ácido acético y glicerol. Se diluyó 1:10 y se filtró. Las muestras diluidas fueron inyectadas (10 µL) en un equipo de HPLC (Prominence-i LC-2030 C, Shimadzu) equipado con una columna Aminex HPX-87H (Biorad, USA). La fase móvil consistió de H₂SO₄ 0.005 M con un flujo de 0.6 mL min⁻¹ con un tiempo de análisis de 22 min, a una temperatura de 35 °C y medición de índice de refracción (detector IR).

IV.5.3 Análisis microbiológico

Se tomó 1 mL de jugo de agave fermentado cada 24 h para realizar las diluciones decimales necesarias en diluyente de peptona para efectuar la cuantificación de las poblaciones microbianas.

IV.5.3.1 Hongos y Levaduras

Se realizó el cultivo por el método de vaciado en placa en agar papa dextrosa (APD) y medio lisina (ML) adicionados con cloranfenicol (100 mg/L); las placas se incubaron a 35 °C por 24 h. No hubo presencia de hongos al incubar las placas por una semana.

IV.5.3.2 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Se realizó el cultivo por el método de extensión en superficie en agar MRS adicionado con cicloheximida (100 mg/L); las placas se incubaron a 35 °C por 48 h.

IV.5.4 Análisis molecular de fermentaciones de jugo de agave

Se realizó el análisis de las comunidades de levaduras y bacterias durante el proceso de fermentación mediante las técnicas RISA y RFLP utilizando el ADN genómico total (ADNg).

IV.5.4.1 Extracción del ADN

A partir de 1.5 mL de jugo de agave fermentado, se separó la biomasa mediante centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se lavó con solución salina y se extrajo el ADNg con el protocolo comercial *Powerfood*® *Microbial DNA isolation kit* siguiendo el procedimiento descrito por el proveedor. El ADN extraído se conservó a -20 °C hasta su uso, en un periodo no mayor a 6 meses.

IV.5.4.2 Análisis de integridad, cuantificación y pureza del ADNg extraído

La integridad del ADNg se verificó por electroforesis utilizando un gel de agarosa a 0.8 %, 95 V por 120 min, en tampón 1x TBE. El gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) por 15 min y se capturó la imagen con el sistema fotográfico *MiniBis* (*DNR Bioimaging*, Israel).

Se cuantificó el ADNg extraído mediante la medición de la absorbancia a 260 nm. Se usó tampón de elusión o agua libre de nucleasas como blanco para la calibración del espectrofotómetro. La cantidad de ADN se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de ADN } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right) = \left[(A)_{260\text{nm}} \right] \times 10 (\text{factor de dilución}) \times 50 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right)$$

IV.5.4.3 PCR-DGGE

Se realizó el análisis de la comunidad bacteriana y de levaduras de muestras de jugo fermentado mediante la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE, por sus siglas en inglés).

Se prepararon mezclas de reacción que incluyeron 0.5 μM de iniciadores para amplificar la región 16S de bacterias (Muyzer y col., 1993), los iniciadores GC-357F (CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG) y 518R (ATTACCGCGGCTGCTGG); para la región D1/D2 del 26S de levaduras (Kurtzman, 1997; Cocolin y col., 2000), GC-NL1 (CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) y LS2 (GGTCCGTCTTTCAAGACGG).

Las condiciones de PCR fueron: un paso inicial de desnaturización de 94 °C por 300 s y posteriormente, 32 ciclos de 94 °C por 40 s, 55.5 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 30 s y un paso final de 72 °C por 180 s.

El DGGE se llevó a cabo en el *D-Code Universal Mutation Detection System* (Biorad, USA), empleando un gel de 8 % de poliacrilamida con un gradiente desnaturizante de 25-50 %. Los geles se corrieron por 3 h a 200 V en tampón TAE 1X a una temperatura constante de 60 °C. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador *Gel Doc XR+* (Biorad, USA).

Se cortaron bandas representativas de los perfiles, se eluyeron en 100 μL de agua libre de nucleasas y se incubaron por una noche a 4 °C. Se realizó la reamplificación de las bandas eluidas en una mezcla conteniendo los iniciadores sin la grapa GC con las mismas condiciones que para el DGGE. Los productos se corrieron en un gel de agarosa separando los iniciadores, las bandas se cortaron y el producto de PCR se purificó con el protocolo del *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band purification*. Los productos fueron enviados a la “Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA” del IBT, Cuernavaca, Morelos. Las secuencias fueron comparadas con la base de datos del NCBI para identificar los microorganismos a nivel especie (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

IV.5.4.5 Secuenciación masiva en paralelo por la plataforma *Illumina MiSeq*

Se llevó a cabo la selección de fermentaciones con base en la producción de etanol para el estudio de la estructura y dinámica de las comunidades microbianas.

El ADN_g de las muestras de jugo de agave fermentado se envió al laboratorio *Molecular Research DNA*, Clovis, Shallowater, TX para la amplificación de la región 16S (bacterias) usando los iniciadores 27Fmod (5'- AGRGTTTGATMTGGCTCAG -3') y 519Rmodbio (5'-GTNTTACNGCGGCKGCTG-3') y para la región D1/D2 del gen 26S (levaduras), los iniciadores NL1 (GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) y NL4 (GGTCCGTCTTTCAAGACGG). Se usaron los instrumentos y reactivos de *Illumina HiSeq*.

Las secuencias se sometieron a un proceso de verificación de calidad, con el programa Mothur v.1.31.2 (Schloss, 2009). Se eliminaron las secuencias con baja calidad, longitudes cortas, altos números de homopolímeros y bases degeneradas mediante el comando *trim.seqs*. Se redujo el número de secuencias repetidas con el comando *unique.seqs*, para reducir el tiempo del análisis bioinformático. Se realizó el alineamiento múltiple tomando como referencia la base de datos curada SILVA. Se cortaron las secuencias alineadas en la región en que se empalmaron con el comando *screen.seqs*. Se redujo el número de secuencias identificando aquellas duplicadas y aquellas que difirieron por algunos nucleótidos fueron unidas a las de mayor abundancia formándose las Unidades Operacionales Taxonómicas (OTU por sus siglas en inglés) y posterior remoción de quimeras con el método *uchime*. Las OTUs, fueron definidas mediante agrupamiento a 3 % de divergencia (97 % de similitud). Las bacterias se clasificaron con referencia en la base de datos 16S rRNA RDP9 (Actualizada en marzo del 2012) y las levaduras con la base de datos 28S rRNA RDP7 (Actualizada en noviembre del 2011) y se eliminaron aquellas que fueron clasificadas como mitocondria, cloroplasto, *Archaea* y desconocido.

Para evaluar la red de interacciones entre microorganismos, los datos curados del número de secuencias para cada especie bacteriana fueron sometidos al programa MetaMis (Tzun-Wen y col., 2016). El programa ajusta los datos del metagenoma a ecuaciones diferenciales de Lotka-Volterra generando mapas de interacciones.

IV.6 Técnicas dependientes de cultivo para el estudio de microorganismos nativos

De forma paralela al estudio molecular de la comunidad de microorganismos en la fermentación del jugo de agave, se realizó el aislamiento de levaduras y bacterias, la formación de grupos con base en los perfiles genotípicos y la identificación a nivel especie.

IV.6.1 Aislamiento de levaduras y bacterias

Colonias de levaduras provenientes de APD y ML (sección IV.5.3.1), y bacterias provenientes de agar MRS (sección IV.5.3.2) fueron purificadas mediante pases consecutivos hasta observar una morfología única (al menos tres pases). La incubación se realizó a 35 °C por 24 h. Los cultivos puros fueron congelados a -80 °C en caldo YPD adicionado con 20 % de glicerol.

IV.6.2 Extracción del ADN de los aislamientos

Los aislamientos se cultivaron en 0.3 mL de caldo YPF a 35 °C por 24 h. Posteriormente, se realizó la separación de la biomasa celular para la extracción de ADN. Se empleó el método descrito por Soto-Muñoz y col. (2014) con modificaciones. Se resuspendió la biomasa con tampón TNES, se homogeneizó y se incubó a 100 °C por 10 min. Se centrifugó a 16000 g por 1 min, se obtuvo el sobrenadante, se adicionó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5.0). Se incubó a 4 °C por 5 min y se centrifugó para obtener el sobrenadante, al cual se le adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto y se incubó a -20 °C por 10 min. Se centrifugó a 20000 g por 5 min, se eliminó el sobrenadante y el ADN se secó a 50 °C por 10 min, o el tiempo necesario hasta completa sequedad. Finalmente, fue resuspendió en 100 µL de tampón TE.

IV.6.3 PCR-RISA

Se realizó el análisis del espaciador intergénico ribosomal (RISA, por sus siglas en inglés) mediante la amplificación de las secuencias presentes entre las regiones genéticas 16S y la 23S utilizando el ADNg de las bacterias aisladas.

Se prepararon mezclas de reacción que consistieron en tampón 10X, desoxinucleótidos trifosfato 2.5 mM, Taq polimerasa (0.32 U) y 0.5 µM de iniciadores ITSF (5'-GTCGTAACAAGGTAGCCGTA-3') e ITSReub (5'-GCCAAGGCATCCACC-3') (Cardinale y

col., 2004) y se completó con agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 25 μ L. El PCR se llevó a cabo en un termociclador (Techne TC-512, Essex, Inglaterra) con las siguientes condiciones: un paso inicial de desnaturalización de 94 °C por 300 s y posteriormente, 32 ciclos de 94 °C por 60 s, 55 °C por 50 s, extensión a 72 °C por 90 s y un paso final de 72 °C por 180 s.

Se capturó la imagen del gel después de su tinción con bromuro de etidio y se generó una matriz binaria de presencia/ausencia de bandas por peso molecular observadas de cada aislamiento.

IV.6.4 RFLP

Se realizó el análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) de las levaduras aisladas mediante la amplificación de la región intergénica ITS-5.8S (White y col., 1990) y su posterior digestión con enzimas de restricción.

Para la amplificación se emplearon los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). El PCR se llevó a cabo con las condiciones descritas en el apartado IV.5.4.3 PCR-RISA. Se corrieron los productos de PCR en una electroforesis de gel de agarosa al 1.5 % para observar que la amplificación fuera específica.

Cinco μ L de los productos de PCR fueron digeridos con la enzima de restricción HaeIII, adicionando 1 μ L tampón 10X, enzima de restricción (5 U) y completando a 10 μ L. Se incubó en el termociclador a 37 °C por 150 min y se detuvo la reacción mediante el calentamiento a 80 °C por 20 min. Finalmente se obtuvieron los perfiles electroforéticos en un gel de agarosa a 1.5 %.

IV.6.5 Secuenciación de genes ribosomales

Se tomó una cepa al azar de los grupos con alta similitud de perfiles genotípicos para realizar su identificación mediante la secuenciación de genes ribosomales.

Se realizó la amplificación del gen 16S para bacterias utilizando los iniciadores 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y 1492R (GGTTACCTTGTTACGACCTT) y para levaduras NL1 (GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) y NL4 (GGTCCGTCTTTCAAGACGG). La

preparación de las mezclas de reacción y las condiciones del termociclado, fueron las mismas de la sección IV.5.4.3 PCR-RISA.

Se observó la amplificación de una sola banda mediante electroforesis en un gel de agarosa a 1.2 %. Los productos fueron purificados mediante el protocolo *Illustra GFX gel band purification* siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos se enviaron a la “Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA” del IBT, Cuernavaca, Morelos. Las secuencias se compararon con la base de datos del *NCBI* para identificar a nivel especie.

IV.7 Caracterización fenotípica de microorganismos

Se realizó el estudio de los microorganismos aislados de forma cualitativa y cuantitativa con el fin de realizar su selección.

IV.7.1 Pruebas fenotípicas cualitativas

En una primera etapa se evaluó la capacidad de los aislamientos para crecer en un medio de cultivo con fructosa (20 %) y otro con etanol (10 %). También, se observó el tipo de metabolismo que presentan con base en la producción de ácidos o compuestos nitrogenados. Se seleccionaron aquellos microorganismos tolerantes a 20 % de fructosa y 10 % de etanol para continuar con el estudio de sus parámetros cinéticos.

IV.7.1.1 Tolerancia a altas concentraciones de fructosa

Cultivos (0.3 mL) de cada uno de los microorganismos seleccionados se inocularon en caldo YPF (2.7 mL) ajustando la concentración de fructosa a 200 g/L y se incubaron a 35 °C por 24 h. La turbidez en el medio generada por el desarrollo de los microorganismos indicó su tolerancia a la fructosa.

IV.7.1.2 Tolerancia al etanol

Se inocularon 0.3 mL de cada uno de los cultivos seleccionados a 2.7 mL de YPF (2 % de fructosa) adicionado de 10 % de etanol y se incubó 35 °C por 24 h. La turbidez en el medio generada por el desarrollo de los microorganismos indicó su tolerancia al etanol.

IV.7.1.3 Cambio de pH del medio

Los microorganismos seleccionados se inocularon (0.3 mL) en caldo YPF (2.7 mL) con indicador de pH (0.5 % extracto de levadura, 4 % peptona de caseína, 0.5 % de fructosa, 0.002 % de verde de bromotimol y 0.002 % de púrpura de bromocresol ajustado a pH 5 con tampón de citrato/bifosfato de potasio). El cambio de coloración de verde a amarillo indicó el descenso del pH del medio por la producción de ácido al metabolizarse la fructosa, mientras que el cambio de verde a morado debido al incremento del pH por la liberación de compuestos nitrogenados (iones amonio y/o urea) por el metabolismo de aminoácidos.

IV.7.1.4 Sensibilidad a toxina *killer*

Se realizó una dilución 1:100 del cultivo de *S. cerevisiae* K1-V116 (cepa de referencia productora de toxina *killer*). Un mL de esta dilución se sembró por la técnica de vaciado en placa utilizando agar YPD con 0.003 % de azul de metileno. Se inocularon 20 μ L de la dilución de los cultivos de levaduras seleccionadas sobre el agar solidificado. Se secaron las placas y se incubaron a 35 °C por 48 h. Si la cepa inoculada se encontraba rodeada de una región de células con pigmentación azul, se consideró sensible.

IV.7.1.5 Fenotipo *killer*

Se realizó una dilución 1:100 del cultivo de *S. cerevisiae* ATCC 38626. Un mililitro de esta dilución se sembró por la técnica de vaciado en agar YPD con azul de metileno (0.003 %). Se inocularon 20 μ L de la dilución de los cultivos de las levaduras seleccionadas sobre el agar solidificado. Se secaron las placas y se incubaron a 25 °C por 48 h. Si la cepa inoculada se encontraba rodeada de un halo de inhibición, se consideró como fenotipo *killer*.

IV.7.2 Prueba fenotípica cuantitativa

IV. 7.2.1 Dinámicas de desarrollo de cepas de levaduras seleccionadas tolerantes a fructosa y etanol

Se preparó medio base YP y se le adicionó fructosa y etanol según las concentraciones indicadas en la Tabla 4.1. Los medios de cultivo (190 μ L) se colocaron en pocillos de una

microplaca y se inocularon con 10 μ L de cada una de las cepas seleccionadas para obtener una concentración final de 5 Log UFC en cada pocillo. Se utilizó YPF (2 % de fructosa) como control positivo y los medios de cultivo sin inocular como control negativo. La microplaca se colocó en el analizador turbidimétrico Bioscreen C y se incubó a 35 °C por 48 h. Cada 30 min se realizaron mediciones de la densidad óptica a 600 nm con agitación previa de la microplaca.

Tabla 4.2. Combinación de concentraciones de fructosa y etanol en medio YPF

Tratamiento	Fructosa (%)	Etanol (%)
1	20	0
2	20	5
3	15	5
4	15	7.5
5	10	7.5
6	10	10
7	5	10
8 (C+)	2	0

IV.7.2.2 Análisis de curvas de crecimiento

Las curvas fueron analizadas con el programa DMfit (www.combase.cc) para obtener los parámetros de desarrollo: tiempo de adaptación (h), crecimiento máximo (DO) y velocidad de crecimiento μ (DO/h), la cual se transformó a tiempo de duplicación ($\ln(2)/\mu$). Se seleccionaron aquellas levaduras con el menor tiempo de adaptación, mayor velocidad de desarrollo y con un crecimiento máximo intermedio para ser evaluados en microfermentaciones.

IV.7.2.3 Determinación de las condiciones óptimas de las cepas pre-seleccionadas.

Se realizó la evaluación dual para determinar las condiciones óptimas de desarrollo de las cepas de levaduras pre-seleccionadas en el apartado IV.6.2.2 mediante un diseño central compuesto giratorio teniendo como variables: el porcentaje de fructosa (10-20 %) y el pH del medio (3.5-4.5), y la temperatura del proceso (22-35 °C). Se utilizó la cepa comercial K1-V1116 como control. Los medios YPF modificados se inocularon con 6 Log (UFC/mL) de cada cepa de levadura. Se realizó la medición de la evolución de la fermentación por pesado de los matraces. Al finalizar la fermentación se determinaron los metabolitos por HPLC. Se realizó la selección de la

mejor cepa en relación a su mayor consumo de azúcares, mayor producción de etanol y menor de ácido acético.

IV.8 Microfermentaciones

Se realizó la evaluación de la interacción de la mejor cepa de levadura con las especies de bacterias aisladas del proceso de fermentación espontáneo, mediante dos pruebas:

La primera consistió en la evaluación del efecto individual de una cepa representativa de cada especie de bacterias en la fermentación de la levadura. Para ello, se inoculó caldo YPF con 6 Log UFC/mL de levadura y bacteria. Se realizaron las mediciones descritas en el apartado IV.5.2. Se realizó el análisis de componentes principales para determinar el efecto de la especie de bacteria en la fermentación alcohólica.

La segunda prueba consistió en evaluar el comportamiento de la levadura en jugo de agave durante la fermentación en condiciones óptimas en presencia de una comunidad de bacterias nativas que puede encontrarse durante la fermentación. Para ello, se inocularon 6 Log UFC/mL de cada una de las especies de bacterias aisladas del jugo de agave y 6 Log UFC/mL de la levadura. Como control, se empleó la levadura K1-V1116. El jugo de agave se incubó a 35°C por 96 h. El seguimiento de la evolución de la población de la levadura se realizó efectuando recuentos en placas de YPF con cloranfenicol y el de las bacterias en YPF con cicloheximida cada día.

IV.9 Diseño y análisis estadístico

Se utilizaron el programa Primer 6 (Plymouth Marine Laboratory, Plymouth, UK), PAST v 2.12 (Hammer y col., 2001) o R v 3.3.0 utilizando la librería *vegan* para realizar los análisis multivariantes.

Para los perfiles electroforéticos de la sección PCR-RISA y RFLP, se realizó un análisis de conglomerados utilizando el coeficiente de Jaccard y el método de agrupamiento por medias.

En la Sección Secuenciación masiva en paralelo, se calcularon los índices de diversidad, Simpson Inverso (*Inverse Simpson*) y de *Shannon*. También, se determinó la cobertura de la secuenciación (*Good's coverage*) y las curvas de rarefacción.

V. RESULTADOS

V.1 Fermentación espontánea

V.1.1 Cambios físicos y químicos

El proceso de obtención del mosto de agave en la destilería “Corralejo” consiste en el desgarrando de las piñas de agave crudas en tiras delgadas, seguida de la lixiviación de los fructanos con agua caliente. La solución es sometida a un tratamiento térmico 108°C por 8-h para la hidrólisis de fructanos a azúcares simples. El mosto es enviado al tanque de recepción para ser enfriado a aproximadamente 35 °C mediante contacto con el ambiente, posteriormente el jugo tibio es bombeado a los diferentes tanques de fermentación.

En esta destilería se realizaron dos muestreos durante el 2015 y tres en 2016. En las fermentaciones que se llevaron a cabo en 2015 en las dos y tres réplicas que se obtuvieron en cada fecha de muestreo, se observaron diferencias importantes respecto a las características físicas, químicas y microbiológicas, e incluso la diversidad de microorganismos. Estas diferencias podrían deberse a que los tanques no cuentan con agitación, que hubiera permitido homogeneizar el jugo de agave. Por esta razón se decidió presentar los resultados como muestras individuales.

La concentración inicial de azúcares totales en los jugos de agave osciló entre 176.7 y 86.2 g·L⁻¹ (Tabla 5.2). Durante la fermentación, los microorganismos fueron consumiendo los azúcares a distintas velocidades y en general, éstos no fueron agotados en su totalidad. El mayor consumo de azucares ocurrió en la fermentación K (94.3 %) y el menor en la fermentación I (7.7 %).

La fructosa fue el principal azúcar presente (entre 86.42 a 88.61 % de los azúcares totales), presentó un rango muy amplio en el consumo con un mínimo de 7.42 % en la fermentación N y un máximo de 97.86 % en la fermentación K, ambas obtenidas de los muestreos realizados en el 2016. La glucosa se encontró en un rango entre 4.64 a 9.3 % de los azúcares totales iniciales y fue consumida casi en su totalidad en la mayoría de las fermentaciones.

Tabla 5.1. Parámetros físicos y químicos del mosto de agave inicial y al finalizar la fermentación.

Muestra	Azúcares totales (g/L)		Etanol (% v/v)	Rendimiento azúcar/etanol ^a (g/g)	Eficiencia fermentativa ^b (%)	pH		Urea (mg/L)
	Iniciales	Consumidos				Inicial	Final	
A	111.06	85.63	2.06	89.49	22.34	3.71	3.37	0.94
B	113.61	85.22	1.74	77.41	23.68	3.73	3.32	0.58
C	176.68	97.82	1.6	96.66	14.00	3.73	3.25	0.46
D	145.40	58.75	1.16	80.02	12.29	3.56	3.22	0.58
E	116.18	73.53	1.74	67.18	23.09	3.37	3.4	0.27
F	111.18	67.38	2.24	51.03	22.05	3.39	3.41	0.11
G	135.76	35.54	1.51	168.10	1.36	3.35	3.36	0.05
H	117.59	13.48	0.1	161.34	1.33	3.35	3.33	0.43
I	110.79	8.52	0.17	687.94	1.23	3.35	3.3	0.24
J	156.03	48.27	0.43	510.75	1.66	3.35	3.37	0.50
K	109.6	103.4	2.34	70.12	33.00	4.26	4.23	0.18
L	91.55	48.47	1.09	70.63	19.52	4.25	3.66	0.14
M	86.3	56.2	1.39	64.26	24.85	4.3	3.57	0.23
N	141.6	18.1	0.15	190.60	1.64	4.39	3.88	0.17
O	106.7	89.5	1.97	72.31	28.45	4.02	4.11	0.26
P	143.8	78.3	2.1	59.22	22.55	4.02	3.88	0.34
Q	96.7	86.7	2.59	53.10	41.41	3.98	3.88	0.47

^a g de azúcares consumidos por grado alcohólico (g de etanol x 0.798 x 1000/100).

^b g de etanol producido por g de etanol teóricos (g de azúcares iniciales x 0.511).

La sacarosa proviene de la degradación incompleta de la inulina del agave, encontrándose en porcentajes de entre 3.03 y 8.02 % de los azúcares totales iniciales de los jugos muestreados. La concentración de sacarosa a lo largo del proceso de fermentación no varió, es decir, este sustrato no fue aprovechado (Anexo 1). Esto se puede deber a que, para poder ser consumida por las levaduras, requiere ser hidrolizada por una invertasa extracelular; sin embargo, la expresión de genes que codifica a esta enzima puede ser reprimida por los productos de la hidrólisis (Batista y col., 2004). Por otra parte, solo algunas especies de BAL pueden utilizar la sacarosa como fuente de carbono (Reid y Abratt, 2005).

Entre los productos de fermentación, predominó el ácido láctico. Por los datos recabados, se puede hipotetizar que la mayor producción de este ácido se lleva a cabo en el tiempo que pasa el jugo de agave en el tanque de recepción, ya que las muestras recién obtenidas en los tanques de fermentación contenían elevadas concentraciones de este ácido. Por ejemplo, en el muestreo del 10 de febrero del 2015, las muestras H, I y J obtenidas del mosto sobrante de la producción contenido en el tanque de recepción mostraron valores de 21.89, 20.65 y 27.25 g·L⁻¹, respectivamente, mientras que las muestras E, F y G obtenidas del mosto que había sido bombeado hacia los tanques de fermentación mostraron valores de 15.54, 18.07 y 22.25 g·L⁻¹,

respectivamente. Esto contrasta con las muestras del 2016, donde la concentración inicial nunca fue superior a los 9 g/L. Esto evidencia la necesidad de mejorar las condiciones de producción, ya que la acumulación de este ácido antes de iniciarse la fermentación alcohólica afectará negativamente el proceso, pues inhibe el crecimiento de las levaduras y la producción de etanol incluso en niveles tan bajos como 0.9 % p/v (Bayrock e Ingledew, 2004). Cuando la concentración inicial de este ácido fue baja la tendencia general fue la de aumentar durante la fermentación; cuando las concentraciones iniciales eran altas, se mantuvo en los mismos niveles durante la fermentación con excepción de las muestras G, H, I y J donde se observó una leve disminución.

En todas las fermentaciones se produjo ácido acético generalmente en bajas concentraciones entre 0.43 a 2.90 g·L⁻¹. En las muestras C y D se detectaron las mayores concentraciones que fueron de 3.79 y 5.92 g·L⁻¹, respectivamente. Este compuesto puede ser generado por el metabolismo de las bacterias acéticas y de levaduras y por la vía heterofermentativa de las BAL (Zoecklein y col., 1999). Al igual que con el ácido láctico su acumulación durante la fermentación causa la pérdida de la viabilidad de las levaduras en mayor medida en pH bajos (Narendranath y col., 2001).

En cada fermentación se produjo etanol a distinta velocidad. Las fermentaciones alcohólicas más lentas se observaron en 2015 con tiempos que oscilaron entre 7 y 12 días; asimismo en tres muestras no ocurrió la fermentación alcohólica. En 2016, las fermentaciones finalizaron en menos de cinco días. Esta diferencia entre años de muestreo se puede relacionar con el hecho de que en 2016 la producción de tequila se duplicó, por lo que las fermentaciones fueron sucesivas sin realizar limpiezas profundas a los tanques entre fermentaciones, que sí ocurrieron en 2015. La ausencia de limpieza a los tanques pudo contribuir a la presencia de microbiota fermentativa seleccionada y favorecer el predominio de los microorganismos que toleraran mayor estrés como el generado por el etanol. Se observó la tendencia de mayores concentraciones de etanol en las muestras obtenidas de los tanques de fermentación. Sin embargo, en todos los casos se presentaron bajos rendimientos fermentativos (valores mayores a 17 g de azúcar por grado alcohólico). Es de destacar que el mayor rendimiento azúcar/etanol se obtuvo en la fermentación Q con 53.1 g/°EtOH y, además, mostró la mayor eficiencia fermentativa con 41.41 %. Esto indicó que los microorganismos presentes en esa fermentación consumieron una alta proporción de azúcares y estos fueron convertidos en mayor medida en etanol. Sin embargo, no se comparan con

las eficiencias fermentativas reportados para *S. cerevisiae* y *K. marxianus* nativas seleccionadas con 84 y 94 %, respectivamente (López-Alvarez y col., 2011).

Respecto al pH, algunas muestras de 2015 presentaron valores iniciales mayores (entre 3.73 a 3.56) (muestras A, B, C y D) que disminuyeron durante la fermentación, mientras que las otras (muestras E, F, G, H, I y J) permanecieron en el rango entre 3.41 a 3.30. En el caso de las muestras del 2016, éstas presentaron rangos de pH menos ácidos (entre 4.39 y 3.98), y en general, éste disminuyó durante la fermentación, a excepción de la muestra O, en la que se observó un aumento.

La concentración final de urea tuvo estrecha relación con la cantidad de ácido acético y el láctico generado durante la fermentación (Figura 5.1), indicando la relación de su producción con el metabolismo de las bacterias. Los niveles de urea están en el rango de lo que se reporta en vinos tintos inoculados con cepas de *Schizosaccharomyces pombe* y *S. cerevisiae* que van de 0.1 hasta 1.4 mg/L (Benito y col., 2014). Además, se evidencia la relación entre la producción de etanol y glicerol, generados por el metabolismo de levaduras.

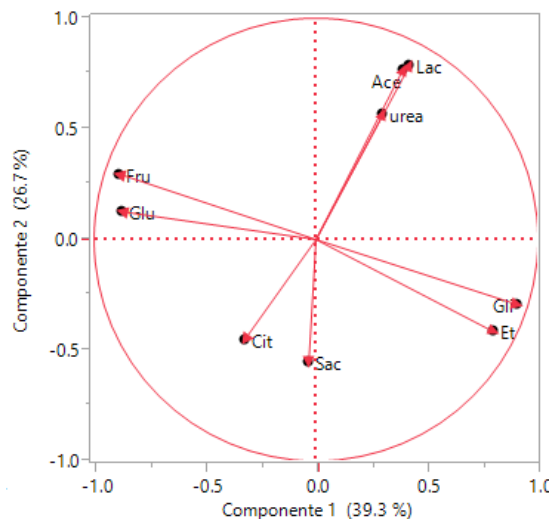


Figura 5.1 Análisis de componentes principales de los parámetros físicos y químicos de las fermentaciones espontáneas.

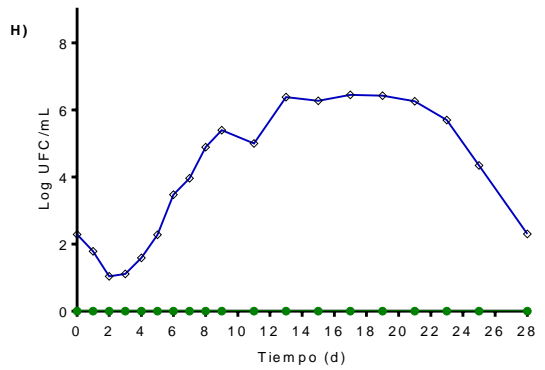
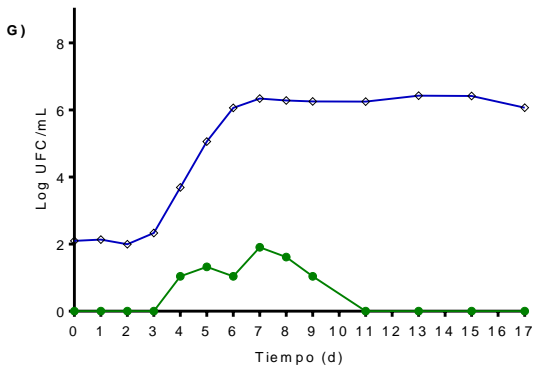
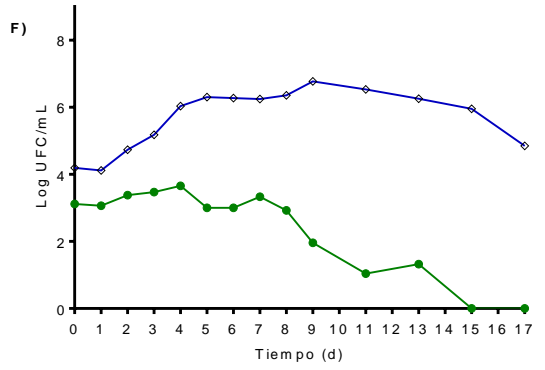
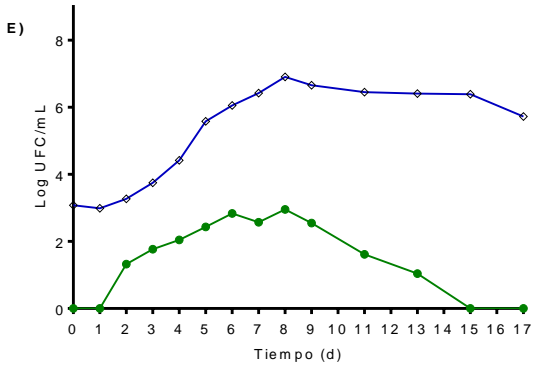
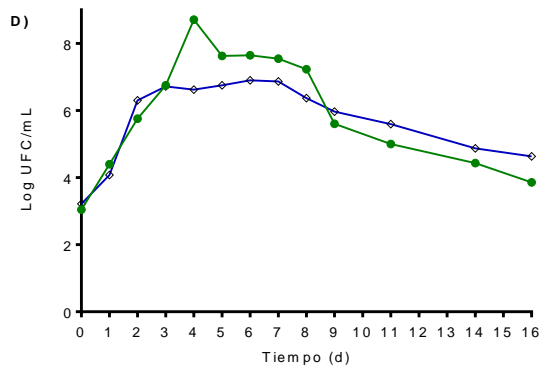
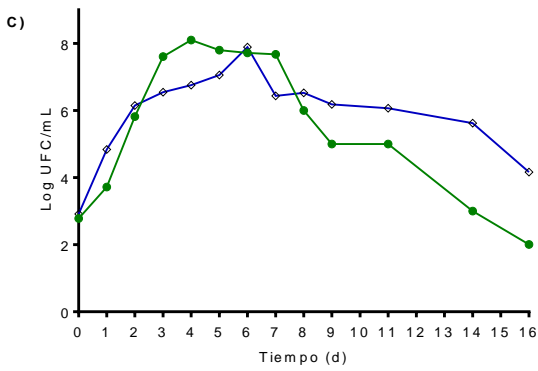
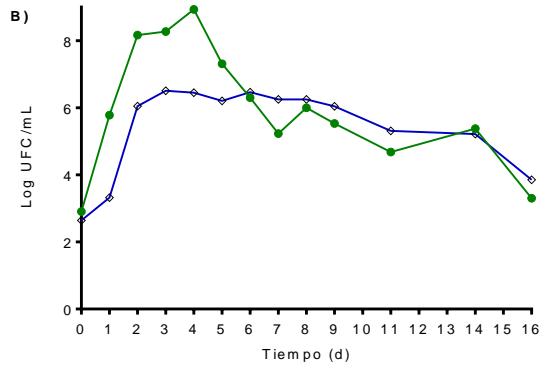
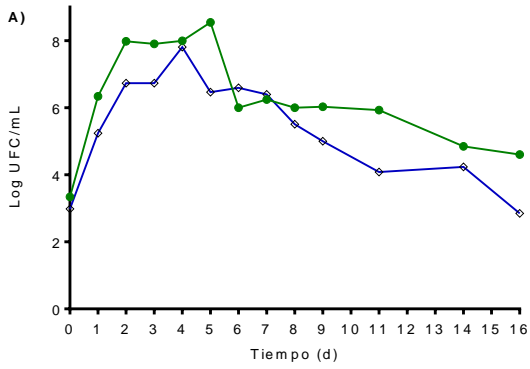
V.1.2. Dinámicas de la microbiota

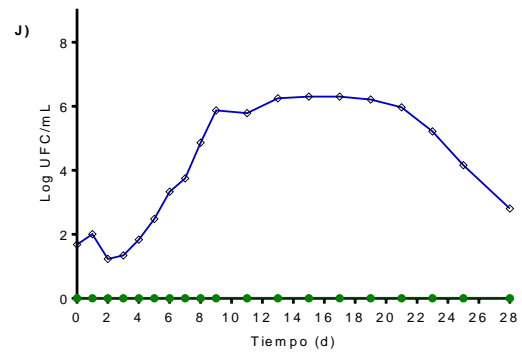
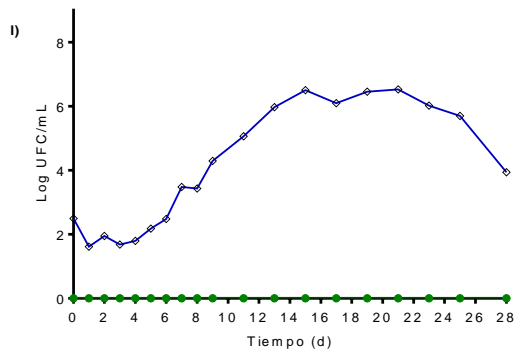
La evolución de las poblaciones de BAL y levaduras durante la fermentación espontánea del jugo de agave se muestran en la Figura 5.2. En la mayoría de los casos, ambos tipos de microorganismos siguieron la curva típica de crecimiento microbiano: una etapa de adaptación, fase exponencial, estacionaria y de muerte. Sin embargo, se evidenciaron diferencias en las tendencias en las diferentes fermentaciones.

La población cultivable inicial de levaduras en APD en los distintos lotes se encontró en un rango de entre 1.7 a 4.8 Log UFC/mL; al avanzar la fermentación su número se incrementó hasta llegar a un máximo cercano a 7 Log UFC/mL después de 1 a 7 días de incubación, dependiendo de la muestra. En las muestras del 2015 fue evidente la fase de muerte cuando el pH se encontró por debajo de 3.45 y con la máxima concentración de etanol (Fermentaciones A-D).

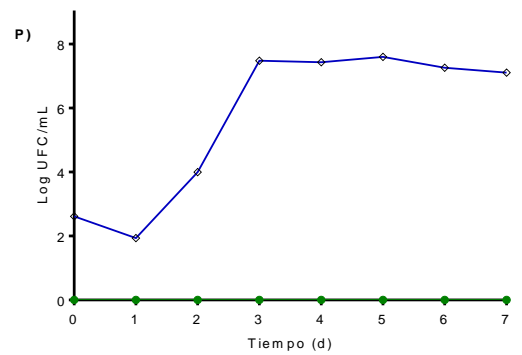
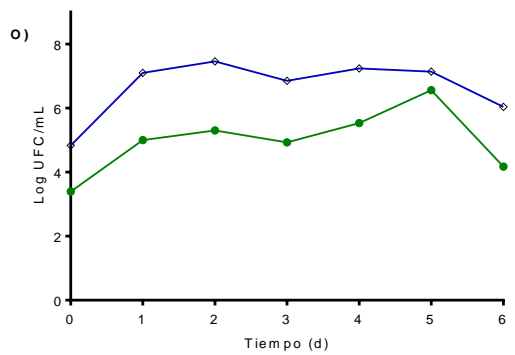
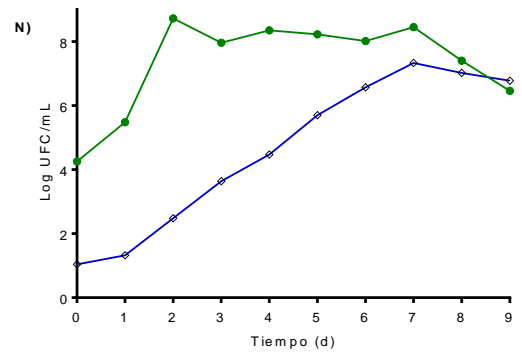
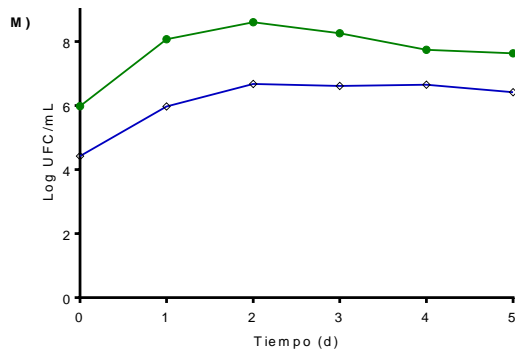
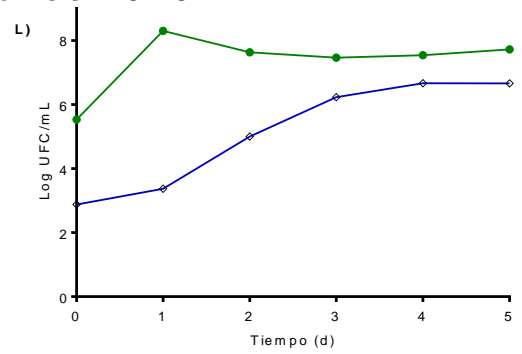
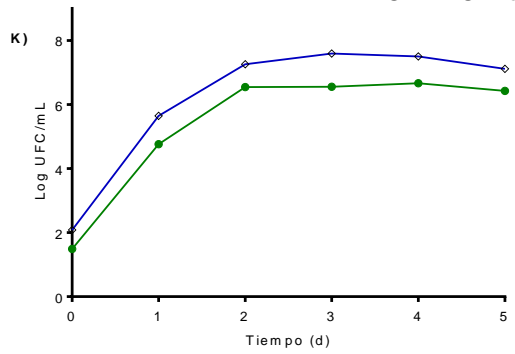
Los recuentos de bacterias presentaron mayor variación entre fermentaciones. En las muestras provenientes de tanque de fermentación (A hasta la F), los recuentos en el mosto inicial se encontraron en un rango entre 1.71 a 5.98 log UFC/mL siguiendo el comportamiento normal de crecimiento, en la muestra G hubo escaso desarrollo y posterior disminución, y en muestras de tanque de recepción (H, I, J) no hubo evidencia de crecimiento en las placas. Esto puede estar asociado al pH del jugo de agave ya que se observó que aquellas con pH inicial de 3.33, mostraron los menores o nulos recuentos de bacterias (Anexo 2). Tampoco en la muestra P, procedente de tanque de fermentación en el muestreo del 2016, se evidenció crecimiento de bacterias; sin embargo, su ausencia no pareció estar relacionado con las variables físicas y químicas evaluadas como en los casos de las muestras del 2015.

Fermentaciones 2015





Fermentaciones 2016



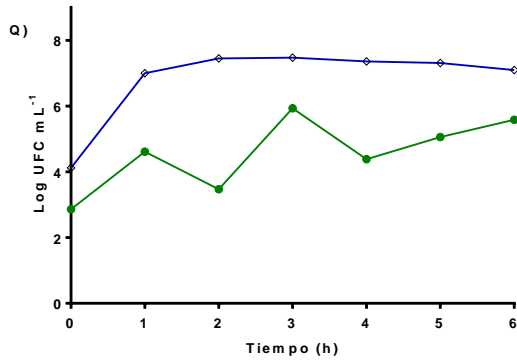


Figura 5.2. Dinámica de las poblaciones de levaduras (línea azul) y BAL (línea verde) durante la fermentación espontánea de jugo de agave.

V.1.3 Análisis molecular por PCR-DGGE

Se utilizó la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE por sus siglas en inglés) para obtener la imagen microbiana durante las fermentaciones de jugo de agave.

A) Levaduras

Los perfiles de levaduras consistieron de un número reducido de bandas entre muestras y tiempos de fermentación, indicando baja diversidad de especies (Figura 5.3). Algunas bandas se cortaron, reamplificaron y fueron secuenciadas.

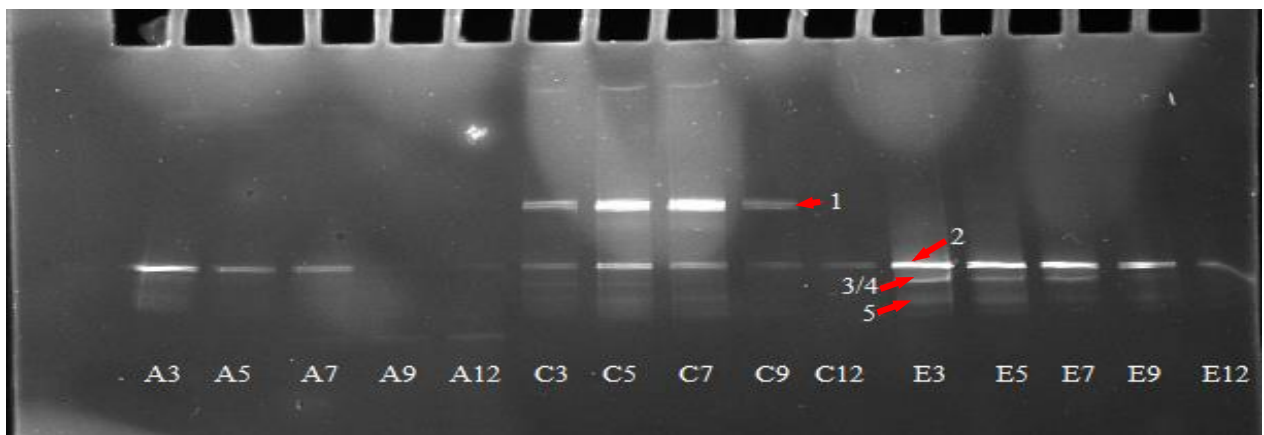


Figura 5.3. Perfil DGGE representativo de las dinámicas de levaduras correspondientes a tres fermentaciones (A, C y E) en distintos tiempos de fermentación (3, 5, 7, 9 y 12 días). Los números con flechas rojas son las especies identificadas: 1) *Kluyveromyces marxianus*, 2 a 5) *Saccharomyces cerevisiae*.

La secuenciación de estas bandas permitió la identificación de los miembros de la comunidad de levaduras, encontrándose a *Kluyveromyces marxianus* y *S. cerevisiae* (Figura 5.4).

La banda 1 correspondiente a *K. marxianus* se observó en las fermentaciones C, D, K, L, N, O, P y Q; de acuerdo a los cambios en la intensidad de estas bandas durante las fermentaciones hubo un aparente incremento en su proporción en etapas tempranas para después disminuir e incluso desaparecer. *K. marxianus* ha sido reportado como microorganismo nativo de la fermentación espontánea del mezcal (Lachance, 1995; Escalante-Minakata y col., 2008) y ha sido propuesto como cultivo iniciador para la producción del tequila (Amaya-Delgado y col., 2013).

Las demás bandas (2 a 5) correspondieron a *S. cerevisiae*. La banda 2 de mayor intensidad fue encontrada en todas las fermentaciones, mientras que las bandas 3/4 y 5 sólo en algunas muestras. Se observó la disminución de la intensidad al avanzar la fermentación. La presencia de esta especie ha sido previamente reportada en jugo de agave para la producción de tequila o de mezcal, donde suele predominar a través de la fermentación (Andrade-Meneses y col. 2004; Lappe y col., 2004; De León y col., 2006; Arrizón y col., 2007).

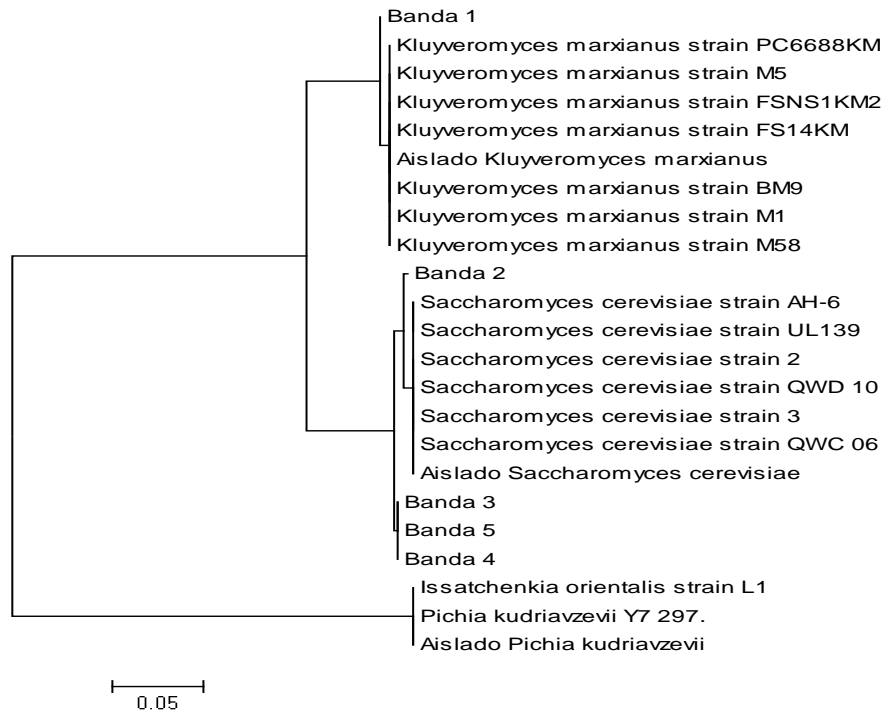


Figura 5.4. Árbol filogenético de las secuencias de los productos de PCR-DGGE de levaduras, utilizando el método de máxima verosimilitud.

Es importante hacer notar que estas cuatro bandas presentaron diferentes posiciones en el gradiente desnaturizante. El análisis de las secuencias permitió observar pequeñas diferencias en los porcentajes de GC debido a inserciones y sustituciones de nucleótidos que se puede relacionar con este hallazgo: la banda 2 tuvo 48.62 % de GC; la 3/4, 49.08 % y la banda 5, 49.54 % (Figura 5.5). La presencia de más de una banda proveniente de *S. cerevisiae* en DGGE con los mismos iniciadores empleados en este trabajo fue observado en otro estudio, sin embargo, los autores no comentan los polimorfismos encontrados (Mills y col., 2002). Estas variaciones pudieran sugerir la presencia de distintas cepas de *S. cerevisiae*.

	Δ	C	G	G	G	C	A	T	-	G	C	-	T	T
Saccharomyces cerevisiae strain UL139
Banda 2	.	A
Banda 3	C	.	.
Banda 4	A	C	.	.
Banda 5	A	.	C	T	.	.	.	C	.	.

Figura 5.5. Polimorfismos en las secuencias de las bandas de DGGE identificadas como *S. cerevisiae*. La secuencia Δ corresponde a la secuencia consenso de 20 cepas.

Al realizar el análisis de presencia de microorganismos en relación a la producción de etanol, se observó que la presencia de *K. marxianus* probablemente esté asociado a una mayor producción de este compuesto, principalmente en las muestras de 2016 (Figura 5.6). Esto pudiera estar relacionado a que en 2016 se encontraron mejores condiciones para el desarrollo de este microorganismo, como la concentración de azúcares, el pH u otro factor desconocido; otra posible causa es que se encontraban presentes una o más cepas de *K. marxianus* que pudieran tener mejor capacidad fermentativa que las observadas en 2015 o inclusive las proporciones o concentración en la que se encontró pudiera jugar un papel importante en el desarrollo del proceso.

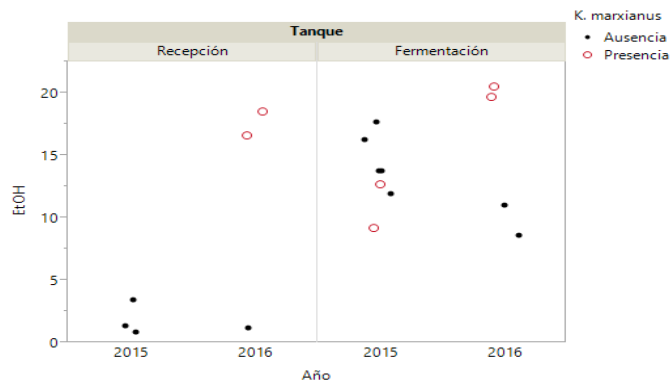


Figura 5.6. Presencia de *K. marxianus* con relación a la producción de etanol según el tipo de tanque y año de muestreo.

B) Bacterias

La secuenciación de las bandas permitió determinar la diversidad de bacterias presentes en las fermentaciones espontáneas. Las especies identificadas fueron *Lb. fermentum*, *Lb. gallinarum*, *Lb. farraginis* y *Lb. mucosae* (Figura 5.7). No hubo gran variación en las comunidades de bacterias respecto al año, por lo que se pudieran considerarse como microorganismos residentes del proceso, a pesar de los esfuerzos por la limpieza de los equipos.

Las muestras de tanques de fermentación E, F, G y de tanque de recepción H, I, J y P no amplificaron productos de PCR, por lo que se confirma lo observado en la cuantificación de bacterias en placa: la ausencia o muy baja concentración de bacterias en estas muestras.

Al igual que para las levaduras, más de una banda correspondió a una misma especie. Esto se debe a la presencia de múltiples copias del gen 16S del ARN ribosomal y a la heterogeneidad en las secuencias entre estas copias (Peixoto y col., 2002).

En general, la presencia de las bacterias no varió a través del tiempo de fermentación (Figura 5.8). Únicamente en la muestra A en el día 1 de fermentación, se encontró una banda de bajo % de GC (la banda no avanzó mucho en el gradiente desnaturalizante), para posteriormente encontrarse las bandas de *Lb. fermentum*, *Lb. mucosae* y *Lb. farraginis*.

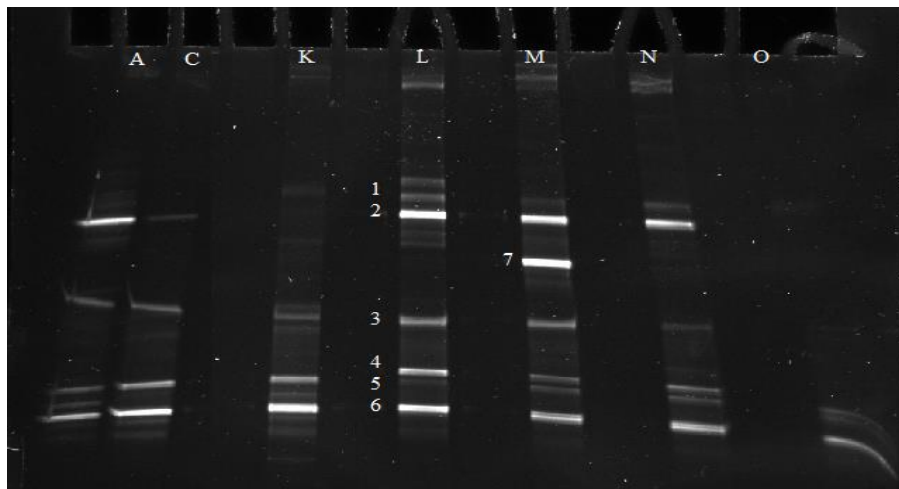


Figura 5.7. Perfiles DGGE de muestras representativas para normalizar los distintos geles y para identificar las bacterias presentes en las fermentaciones. Los números corresponden a las bandas que fueron cortadas y reamplificadas para su secuenciación, siendo identificadas como: 1 y 2 a *Lb. fermentum*, 3 y 4 a *Lb. mucosae*, 5 y 6 a *Lb. farraginis*, y 7 a *Lb. gallinarum*.

Lb. fermentum estuvo presente en la mayoría de las fermentaciones, excepto en las muestras C y K. Su presencia no estuvo vinculada a una característica en particular. En las fermentaciones la intensidad de la banda de *Lb. fermentum* aparentemente se incrementó indicando un aumento en la proporción de esta bacteria al avanzar la fermentación. *Lb. fermentum* ha sido encontrada en masas fermentadas europeas (Randazzo y col., 2005), en pozol (Omar y Ampe., 2000), en queso mozzarella italiano (Ercolini y col., 2001) y vino de palma africano (Ouoba y col., 2012). Se ha reportado la preferencia en el consumo de fructosa por parte de algunas cepas de esta especie en la fermentación de pulpa de cocoa (Lefeber y col., 2011). Además, *Lb. fermentum* ha sido empleado en cultivos mixtos con levaduras para la fermentación de cassava (Freire y col., 2015), en la fermentación de masa de maíz de Ghana (Annan y col., 2003), en la producción de cachaça (Duarte y col., 2011) demostrándose la mejora del proceso al no afectar el crecimiento ni actividad de las levaduras generando mayor concentración de compuestos volátiles y mejorando así el agrado en evaluaciones sensoriales. Por otra parte, hay reportes en que se considera como bacteria contaminante que causa fermentaciones alcohólicas lentas (Bischoff y col., 2009).

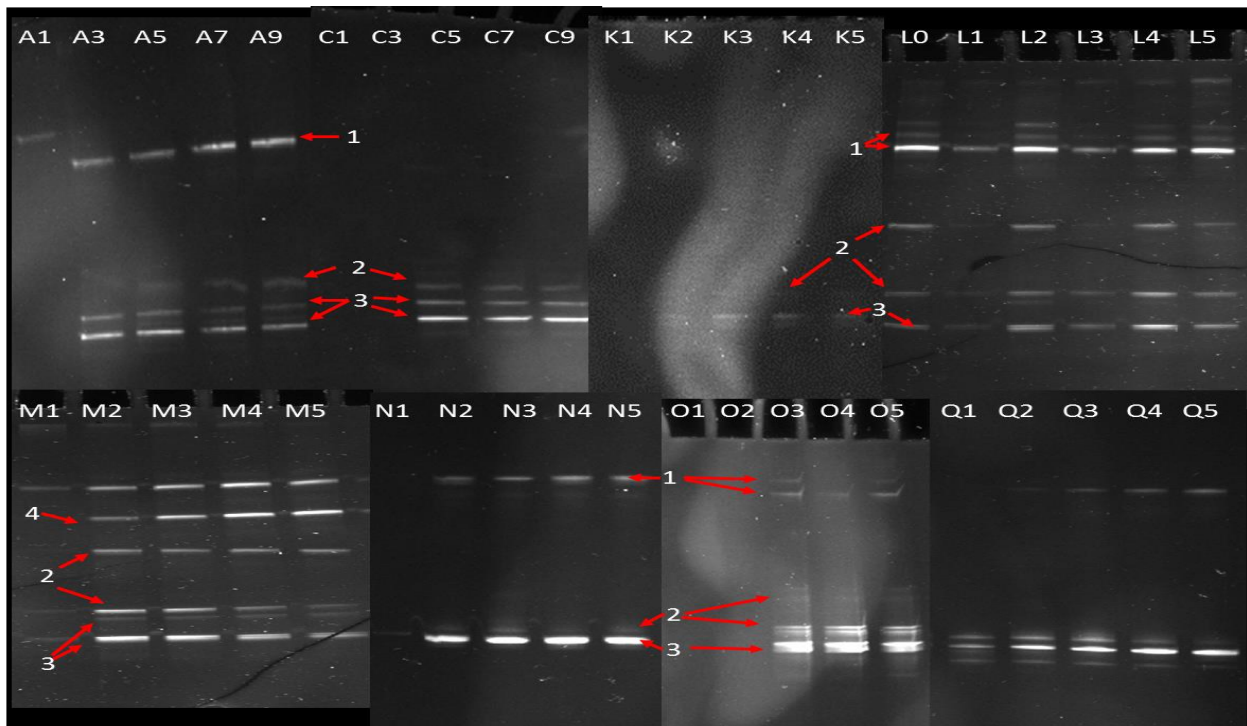


Figura 5.8. Perfiles de DGGE de fermentaciones espontáneas de jugo de agave. Las letras y números sobre los pozos corresponden a la muestra y el tiempo transcurrido de fermentación en días. Los números con flechas rojas son las especies de bacterias identificadas: 1) *Lb. fermentum*, 2) *Lb. mucosae*, 3) *Lb. farraginis*, 4) *Lb. gallinarum*.

La fermentación M fue el único caso donde se encontró a *Lb. gallinarum*, por lo que se puede considerar un microorganismo transitorio en el proceso. Esta bacteria ha sido identificada en fermentaciones espontáneas de masa ácida sin gluten (Moroni y col., 2011) y en nukadoko, un fermento de arroz (Sakamoto y col., 2011). Se ha considerado como una bacteria atípica presente durante la fermentación en estos alimentos.

Lb. mucosae fue descubierta en el intestino delgado de cerdo (Roos y col., 2000). Se ha encontrado además en intestino de caballo (Al Jassim, 2005), en fermentados de desperdicios de vegetales (Ye y col., 2007) y en heces de vaca (Kagkli y col., 2007). Se aisló de un fermentador para producción de etanol de molienda seca siendo considerado como potencial contaminante al tolerar las condiciones del proceso, reducir la producción de etanol, producir altas concentraciones de ácido acético. Sin embargo, durante ese estudio no se observaron fermentaciones fallidas, por lo que se sugiere que la pérdida del balance de la microbiota “normal” que incluye a este microorganismo pudiera causar problemas en la fermentación (Bischoff y col., 2009).

Lb. farraginis se ha encontrado en fermentaciones de mezcal producido a partir de *Agave salmiana* (Escalante-Minakata y col., 2008) y en cerveza de banana de Ruanda (Shale y col., 2012). En las muestras de tequila, es posible que ocurra una asociación entre *Lb. mucosae* y *Lb. farraginis*, pues no hubo presencia de una sin la otra.

Es evidente una mayor concentración de ácido láctico cuando se encontraron presentes bacterias ($p < 0.001$) (Figura 5.9). Inclusive en su ausencia las levaduras metabolizaron este compuesto. *K. marxianus* produce ácido láctico como parte de su metabolismo de carbohidratos, sin embargo, su producción es baja comparada la de las bacterias (Plessas y col. 2008).

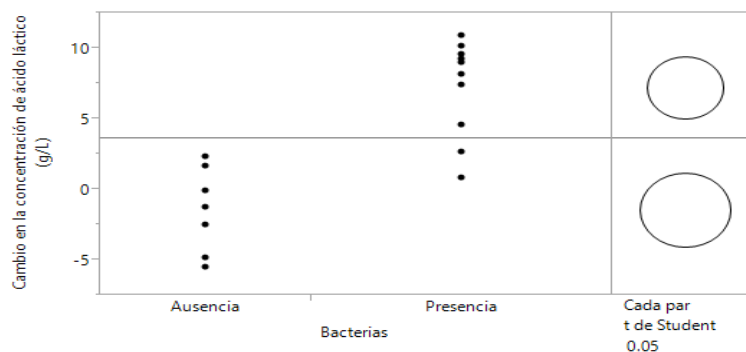


Figura 5.9. Cambio en la concentración de ácido láctico en relación a la presencia de bacterias ácido lácticas. El cambio corresponde a la concentración final menos la inicial.

V.1.4 Secuenciación masiva en paralelo por *Illumina Miseq*

Se seleccionaron tres muestras con la mayor producción de etanol, rendimiento y menor tiempo de fermentación para obtener la estructura y dinámica de la microbiota durante la fermentación, incluyendo muestras de 2015 y 2016, una procedente de tanque de recepción y otra de fermentación. Las muestras seleccionadas bajo estos criterios fueron: de 2015, A (tanque de fermentación) y de 2016, K (tanque de recepción) y M (tanque de fermentación). Se decidió no realizar la secuenciación masiva para la muestra de recepción de 2015 ya que las muestras H, I y J presentaron bajas producciones de etanol y no hubo evidencia de la presencia de bacterias. El número de secuencias obtenidas de la plataforma *Illumina* fueron 564,268 y 593,645 para levadura y bacteria, respectivamente. De éstas, 92.76 y 88.14 % de las secuencias de levaduras y bacterias, respectivamente, pasaron el control de calidad. Debido a la baja diversidad encontrada para levaduras, se muestran únicamente los análisis de diversidad para bacterias. Las curvas de rarefacción de bacterias tendieron a alcanzar la asíntota al aumentar el número de secuencias analizadas, es decir la probabilidad de encontrar más especies es muy baja (Figura 5.10).

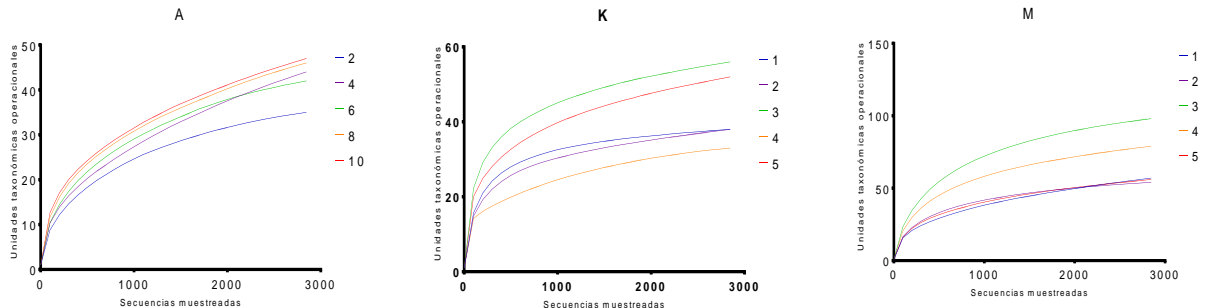


Figura 5.10 Curvas de rarefacción de secuencias de bacterias en fermentaciones espontáneas de jugo de agave.

Los índices de diversidad indicaron que la mayor abundancia de especies (índice de Simpson) se encontró en la muestra K, seguido de la muestra M y la menor en la A (Tabla 5.2).

La muestra M mostró la mayor homogeneidad de proporción entre especies (índice de Shannon), y en la A, con una especie dominante. En general, no hubo cambios drásticos en la diversidad de especies ni en la homogeneidad de proporciones al avanzar las fermentaciones.

Tabla 5.2 Índices de diversidad α para bacterias en fermentaciones espontáneas de jugo de agave.

Fermentación	Tiempo (Días)	Simpson inverso	Índice de Shannon	Cobertura (%)
A	2	2.01 \pm 0.11	1.14 \pm 0.07	99.68
	4	2.87 \pm 0.13	1.46 \pm 0.07	99.33
	6	2.83 \pm 0.12	1.44 \pm 0.07	99.61
	8	2.75 \pm 0.16	1.53 \pm 0.08	99.40
	10	2.88 \pm 0.20	1.66 \pm 0.08	99.40
K	1	4.04 \pm 0.27	1.97 \pm 0.08	99.82
	2	4.77 \pm 0.30	2.03 \pm 0.07	99.68
	3	8.75 \pm 0.68	2.7 \pm 0.07	99.61
	4	8.57 \pm 0.47	2.39 \pm 0.05	99.75
	5	9.72 \pm 0.69	2.68 \pm 0.06	99.54
M	1	3.75 \pm 0.27	1.96 \pm 0.08	99.23
	2	4.06 \pm 0.25	2.02 \pm 0.08	99.65
	3	4.43 \pm 0.37	2.41 \pm 0.1	99.23
	4	4.55 \pm 0.34	2.28 \pm 0.09	99.26
	5	2.78 \pm 0.20	1.79 \pm 0.09	99.44

En las tres fermentaciones se detectaron únicamente dos especies de levaduras *S. cerevisiae* y *K. marxianus*, lo que corresponde a los microorganismos identificados mediante las otras técnicas moleculares (Tabla 5.4). *S. cerevisiae* fue la única especie de levadura encontrada en las muestras A y M. En la muestra K, además se encontró a *K. marxianus* en baja abundancia al principio y aumentando conforme evolucionó la fermentación siendo al día 7 el 40 % de las secuencias; posteriormente, hacia el día 10 desapareció de la fermentación (Figura 5.11).

En relación a las bacterias se encontró una mayor diversidad, encontrándose por lo menos 22 especies. Se confirmó la presencia de *Lb. fermentum*, *Lb. farraginis* y *Lb. mucosae* identificadas en los geles de DGGE. Sin embargo, *Lb. mucosae* fue cuantificada en bajas proporciones mediante la secuenciación.

El análisis de la comunidad bacteriana mostró diferencias en la estructura de las tres fermentaciones espontáneas analizadas (Figura 5.12). En todos los casos, el género *Lactobacillus* predominó en las fermentaciones. Al inicio de la fermentación de la muestra A, *Lb. fermentum* presentó mayor abundancia disminuyendo posteriormente. *Lb. farraginis* aumentó en el día 4 manteniéndose en esas proporciones hasta el final. *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus ghanensis* y *W. confusa* presentaron bajas proporciones a lo largo del proceso. En la muestra K se

encontraron especies consideradas como ambientales (del suelo y procedentes de superficies de vegetales) como *Roseomonas mucosa*, *Sphingomonas rosea*, *Acinetobacter johnsonii*, *Kocuria turfanensis*, *Pseudomonas* sp. *Motilibacter rhizosphaerae*, *Stenotrophomonas maltophila* y *Brevibacterium siliguriense*. También, estuvieron presentes especies como *Staphylococcus epidermidis*, *Propinibacterium acnes* y *Cystobacter miniatus* vinculadas al suelo y a la piel de rumiantes (Reichenbach, 2015). Además, *Salmonella enterica* o *Citrobacter freudii* (ambas secuencias con 100 % de identidad, valor E de 0) fue detectada en muy bajas proporciones.

Tabla 5.3. Porcentaje total de secuencias de las especies identificadas en tres fermentaciones espontáneas de jugo de agave.

Tipo de microorganismo	Especies	Porcentaje
Levadura	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99.73
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0.27
Bacteria	<i>Lactobacillus fermentum</i>	36.41
	<i>Lactobacillus farraginis</i>	35.87
	<i>Oenococcus alcoholitolerans</i>	4.79
	<i>Lactobacillus ghanensis</i>	2.53
	<i>Roseomonas mucosa</i>	1.24
	<i>Sphingomonas rosea</i>	1.23
	<i>Pseudomonas putida</i>	0.60
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0.55
	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	0.49
	<i>Kocuria turfanensis</i>	0.19
	<i>Lactobacillus mucosae</i>	0.15
	<i>Lactobacillus brevis</i>	0.14
	<i>Salmonella enterica/ Citrobacter freudii</i>	0.14
	<i>Motilibacter rhizosphaerae</i>	0.13
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.09
	<i>Lactobacillus buchneri</i>	0.09
	<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	0.08
	<i>Propinibacterium acnés</i>	0.07
	<i>Cystobacter miniatus</i>	0.06
	<i>Brevibacterium siliguriense</i>	0.06
Otros	15.07	

Figura 5.11 Especies de levaduras encontrados en las fermentaciones espontáneas de jugo de agave.

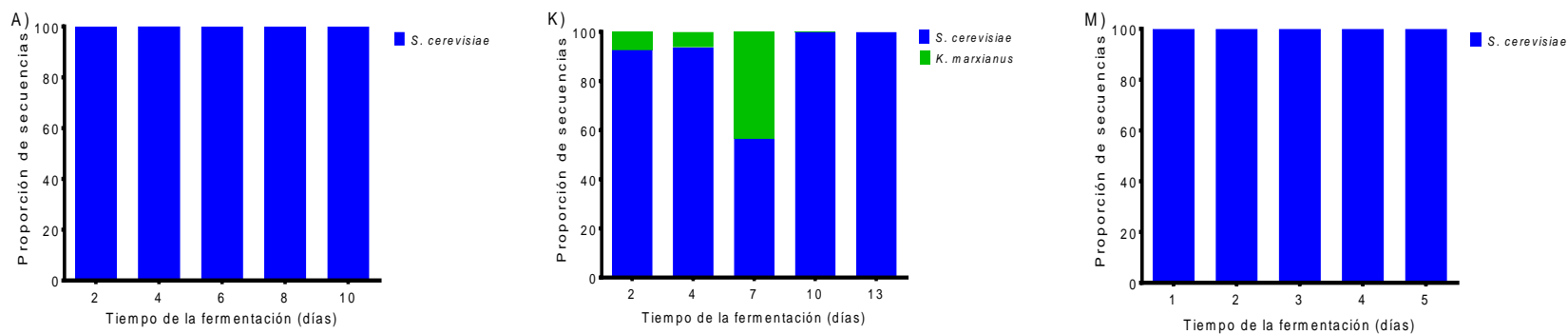
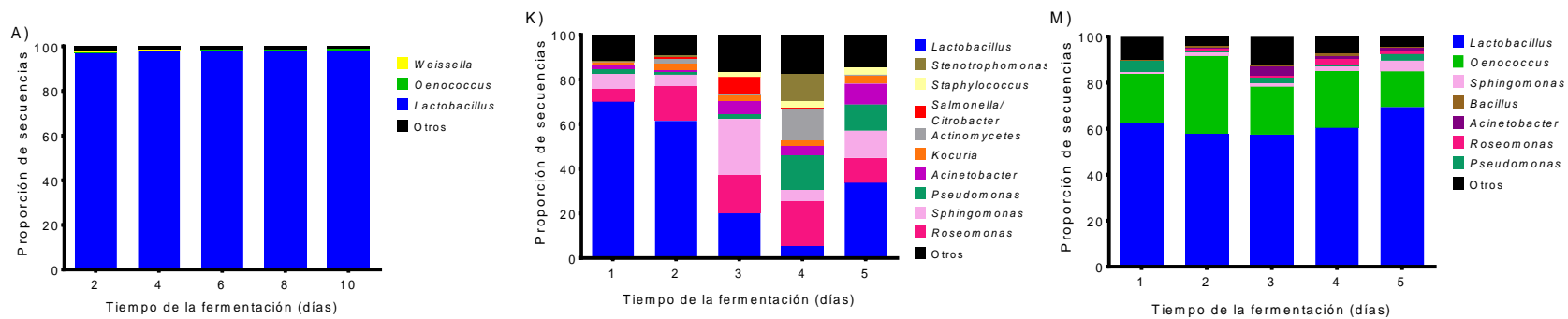


Figura 5.12 Géneros de bacterias encontrados en las fermentaciones espontáneas de jugo de agave.



La presencia de estas especies se puede relacionar a la localización de la empresa en una zona rural, con cercanía a establos de cerdos, gallinas y caballos. Posiblemente, la contaminación procedió de la exposición del tanque de recepción al polvo o al contacto humano. Otra posibilidad, es que se haya añadido al mosto algún fertilizante orgánico para incrementar el nitrógeno asimilable para mejorar la fermentación, esta hipótesis pudiera concordar con la detección de secuencias de hongos en la secuenciación masiva de *Hypocrea*, *Sordariomycetes*, *Capnodiales*, *Cladosporium* y *Eurotiomycetes* asociados a la descomposición de vegetales (Huhe y col. 2017). Las especies bacterianas se encontraron en una proporción considerablemente alta (cerca de 30 % de las secuencias) al inicio de la fermentación, y en conjunto aumentaron a través del tiempo llegando a ser aproximadamente 80 % de las secuencias totales al día 10, cuya consecuencia pudiera estar asociada a la escasa concentración de etanol generada, la cual pudiera ejercer una inhibición de cierta microbiota.

En la muestra M, *Lb. farraginis* y *Oenococcus oeni* dominaron el proceso. Se encontraron también algunas especies bacterianas asociadas al ambiente en baja concentraciones, también detectadas en la muestra K. Sorpresivamente no se detectó a *Lb. gallinarum* identificada en el DGGE.

Se utilizó el análisis de múltiples factores (AMF) para dilucidar la relación entre las especies de microorganismos y los cambios durante la fermentación (Figura 5.13). Se dividieron en grupos de variables que comparten unidades de medición similares: metabolitos que incluye sustratos y productos de fermentación, recuentos en placa de levaduras y bacterias, pH y las proporciones de especies de bacterias y levaduras.

La variabilidad explicada en las muestras A, K y M fue 94.54, 76.42 y 93.97 %, respectivamente, mostrando que no hubo pérdida de la estructura de los datos. En todos los casos, el grupo de variables que contribuyó en mayor medida a la dimensión 1 (eje horizontal) fue la de los metabolitos (más del 20 %), y en cada caso, grupos diferentes tuvieron una participación importante en esa separación; por ejemplo, en la muestra A, el pH y la estructura de la comunidad bacteriana. En todos los casos para la dimensión 2, los recuentos en placa (UFC) contribuyeron en la distribución.

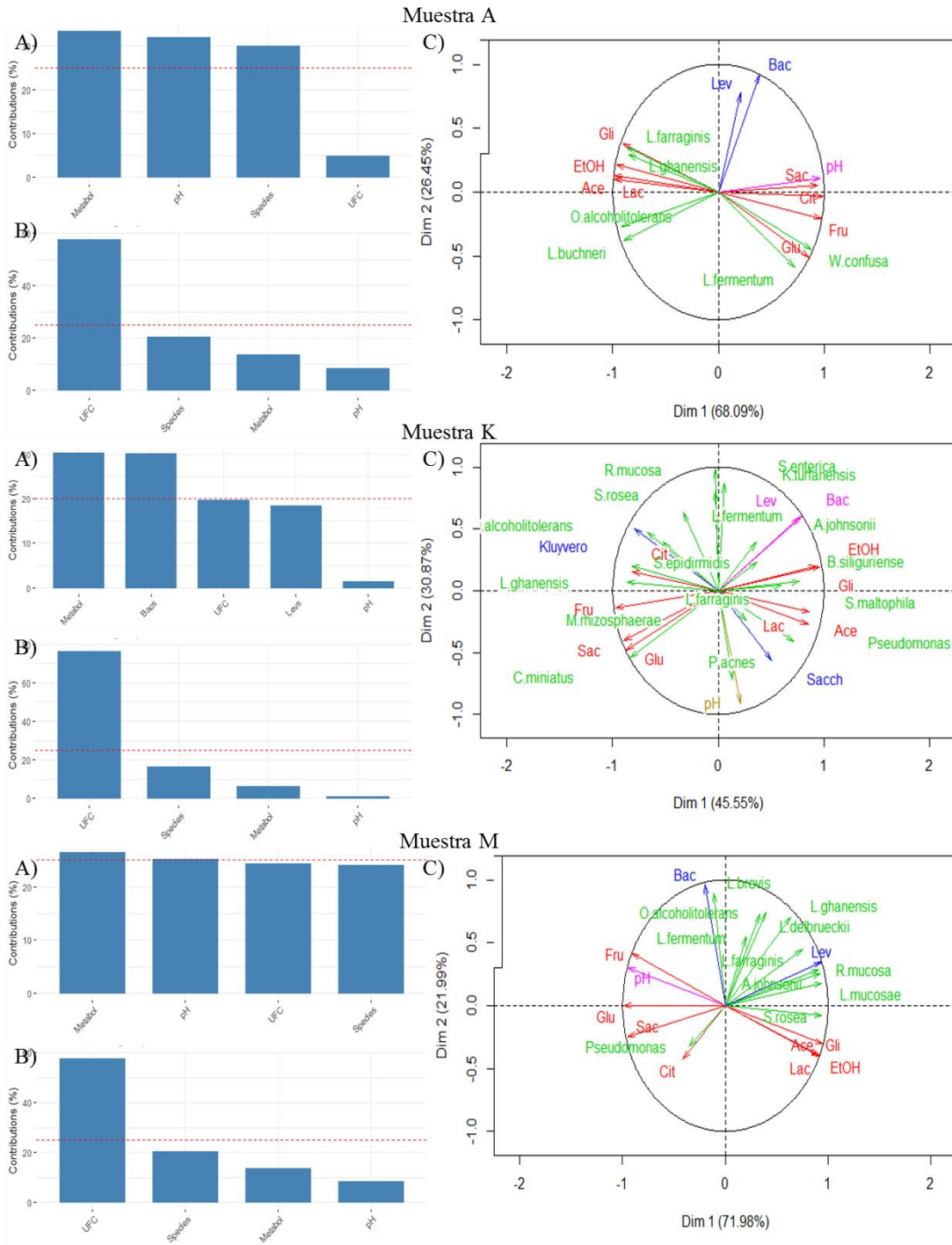


Figura 5.13 Análisis de factores múltiples de las fermentaciones de jugo de agave. A) Contribución de grupos de variables a la dimensión 1, B) a la dimensión 2, C) Correlación entre variables. En rojo los metabolitos: Glu – glucosa, Fru – fructosa, Cit – ácido cítrico, Lac – ácido láctico, Gli – Glicerol, EtOH – Etanol. En azul los recuentos en placa, Lev – Levaduras, BAL – Bacterias ácido lácticas. En verde las especies de microorganismos.

Como era de esperarse, los sustratos (sacarosa, glucosa, fructosa y ácido cítrico) y los productos (ácido láctico, glicerol, ácido acético y etanol) se encontraron en cuadrantes contrarios, denotando que la disminución de los sustratos da lugar a los productos. El pH se encontró en la dirección contraria a los productos, debido a la disminución de esta variable al aumentar la concentración de los ácidos que ocurrió durante las fermentaciones A y M. En la muestra K, el pH se encontró en el eje vertical sin relación con la concentración creciente de los ácidos, probablemente por la generación de algún compuesto alcalino por parte de las bacterias o debido al cambio de la composición del mosto debido a la posible adición de un fertilizante que propició a que el pH se mantuviera casi constante.

El incremento de algunas especies estuvo relacionado a la concentración creciente de productos de fermentación por presentar la misma dirección en el vector: *Lb. ghanensis* y *Lb. farraginis* en la muestra A; *B. siliguriense* y *S. malthophila* en la K y *S. rosea* en la M. Es importante destacar que, en estos análisis se reflejan las correlaciones de las variables, pero no la magnitud en la que actúan. Por ejemplo, *S. rosea* presentó las menores abundancias en la muestra M, y el análisis AMF indicó que el bajo incremento de esta especie estuvo ligado a la generación de los productos de fermentación.

Además de la generación de metabolitos primarios por parte de ciertas especies que pueden afectar a los microorganismos, también ocurren otro tipo de interacciones que pueden influir en el desarrollo de las especies durante la fermentación. El análisis de redes de interacciones microbianas señaló las relaciones bacterianas que ocurrieron en las fermentaciones K y M. La muestra A no mostró interacciones significativas (Figura 5.14).

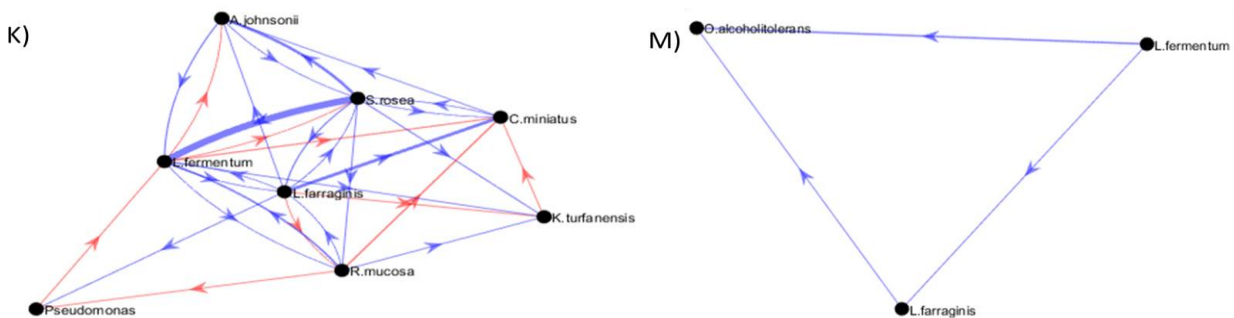


Figura 5.14 Redes de interacciones bacterianas A) muestra K, B) muestra M. La dirección de la flecha indica que el microorganismo del que parte efectúa la interacción, el color azul indica inhibición y el rojo, sinergia. El grosor de la línea indica mayor magnitud de la interacción.

La muestra K presentó una red compleja de interacciones entre bacterias. *Lb. fermentum* produjo el mayor número de sinergias con las bacterias ambientales *A. johnsonii*, *K. turfanensis* y *C. miniatus*. También, presentó relaciones inhibitorias con *Lb. farraginis* y *R. mucosa*. Las bacterias ambientales generaron efecto negativo en *Lb. fermentum* y *Lb. farraginis*, destacando la mayor magnitud de inhibición de *S. rosea* contra *Lb. fermentum* y el aparente efecto benéfico ocasionado por *Pseudomonas* sp. En la muestra M únicamente se presentaron efectos negativos de una sola vía. En general, las interacciones que pudieron ocurrir van desde la producción de metabolitos secundarios que impactan en el crecimiento de otros tanto negativa como positivamente. *Lactobacillus* es bien conocido por la producción de bacteriocinas inhibitorias de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Zacharof y Lovitt, 2012), y también por su efecto sinérgico en el crecimiento de otras especies como el caso particular de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en el yogur, al hidrolizar péptidos y producir CO₂ (Mchiouer y col., 2017).

Asimismo, entre las causas de interacciones negativas se ha reportado la competencia por nutrientes limitantes, por ejemplo, *Lb. hilgardii*, una bacteria deterioradora del vino, que compite por la baja concentración de nitrógeno asimilable restante en el medio, puede ocasionar que la fermentación maloláctica llevada a cabo por *Oenococcus oeni* se vea afectada (Aredes y col., 2010). En el tequila pudiera ocurrir el mismo efecto con las bacterias, debido a la baja concentración asimilable de nitrógeno del jugo de agave, algunas especies pueden consumirlo de manera más rápida, disminuyendo su disponibilidad para las otras.

También es importante destacar que el análisis no logró dilucidar interacciones entre bacterias presentes en la muestra A, que puede indicar que las interacciones no fueron tan marcadas y los cambios de las proporciones de estas bacterias pudieron ser influidos únicamente por la fermentación en sí.

En la fermentación del tequila sería deseable encontrar interacciones que inhiban a bacterias ambientales y que beneficien a bacterias ácido lácticas, ya que estas últimas tienen mayor relación con producción de compuestos que benefician sensorialmente a la bebida final.

Sin lugar a dudas, las técnicas moleculares han revolucionado el estudio de la ecología microbiana permitiendo mostrar un mayor detalle de las dinámicas de microorganismos que

ocurren durante los procesos fermentativos. A pesar de su versatilidad, éstas siguen presentando sesgos en la información que se puede obtener. Por ejemplo, los resultados entre la técnica DGGE y la secuenciación masiva concordaron sólo parcialmente, como lo fue la detección de algunas especies en uno de los análisis que no fueron observadas en el otro y las diferentes proporciones de especies encontradas que dificulta evidenciar las especies predominantes durante el proceso.

V.2. Aislamiento e identificación de microorganismos autóctonos

A) Levaduras

Durante las fermentaciones del jugo de agave se aislaron 328 levaduras en 2015 y 277 en 2016. A partir de los aislados de levaduras se obtuvieron los perfiles de RFLP de la región ITS para diferenciar a nivel especie. Tres perfiles fueron identificados después de la digestión con la enzima *HaeIII*: 1) cuatro fragmentos 320, 230, 180 y 150 pb, 2) un fragmento de 650 pb y 3) un fragmento de 400.

Se eligieron seis representantes del perfil 1 (cepas 12, 13, 62, 86, 150 y 245), uno del perfil 2 (cepa 7) y uno del perfil 3 (cepa 36) para ser identificados mediante secuenciación. Los resultados se muestran en la Figura 5.15.

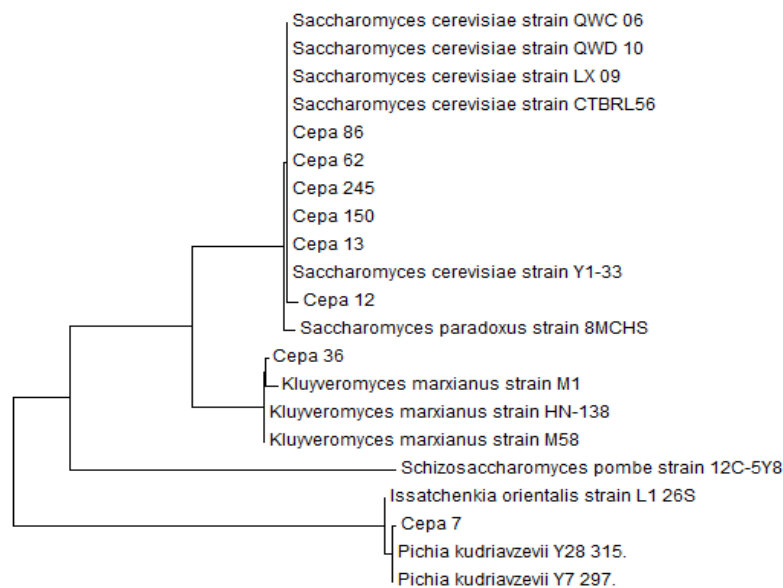


Figura 5.15. Árbol filogenético de las cepas de levaduras representativas de los perfiles RFLP para la identificación a nivel especie, creado con el método de máxima verosimilitud.

El resto de las cepas aisladas fueron identificadas por comparación de los perfiles de RFLP con las cepas identificadas por secuenciación (Figura 5.16).

S. cerevisiae fue la única que se logró aislar de las fermentaciones del 2015 y fue la especie con mayor número de aislamientos en las fermentaciones del 2016. *K. marxianus* fue aislada únicamente en el segundo año de muestreos, aunque se tenía la información de que se encontraba en las muestras C y D, de las cuales no se pudo recuperar mediante cultivo (Anexo 3). El aislamiento de *P. kudriavzevii* no concuerda con la ausencia de detección en las técnicas moleculares. Probablemente este microorganismo se encontraba en bajas proporciones durante la fermentación o los iniciadores utilizados en el PCR-DGGE fueron más selectivos para otras especies y por ello no se pudo detectar su presencia con la técnica molecular. Esta levadura ha sido aislada de la “Taberna”, un vino de palma (Santiago-Urbina y col., 2015) y de vino de uva en la que fue empleada como inóculo iniciador, presentando mejores características sensoriales que al ser utilizadas otras levaduras (Clemente-Jiménez y col., 2005; Sharma y col., 2011). Estos datos corroboran que su presencia si puede estar asociado al proceso fermentativo.

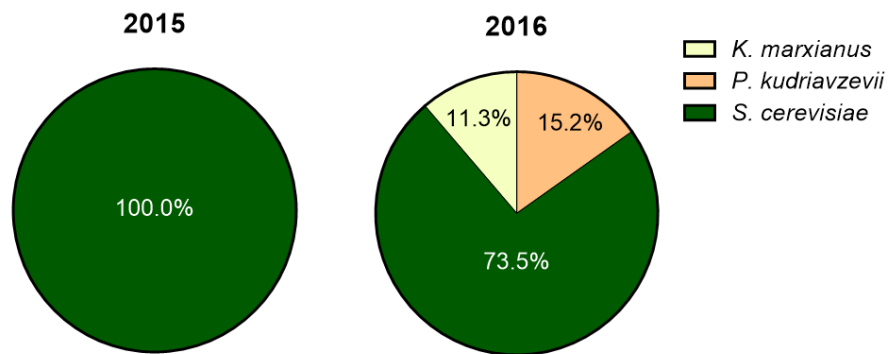


Figura 5.16. Porcentaje de especies de levaduras aisladas de muestras de jugo de agave colectado en 2015 y 2016 y fermentado espontáneamente.

B) Bacterias

Durante la fermentación espontánea de los jugos de agave se aislaron 138 cepas de bacterias en 2015 y 91 en 2016. Se obtuvieron los perfiles de RISA de 66 y 30 cepas de bacterias aisladas en los muestreos de 2015 y 2016, respectivamente, y mediante una matriz binaria se realizó el análisis de conglomerados para agrupar las distintas especies (Figura 5.17).

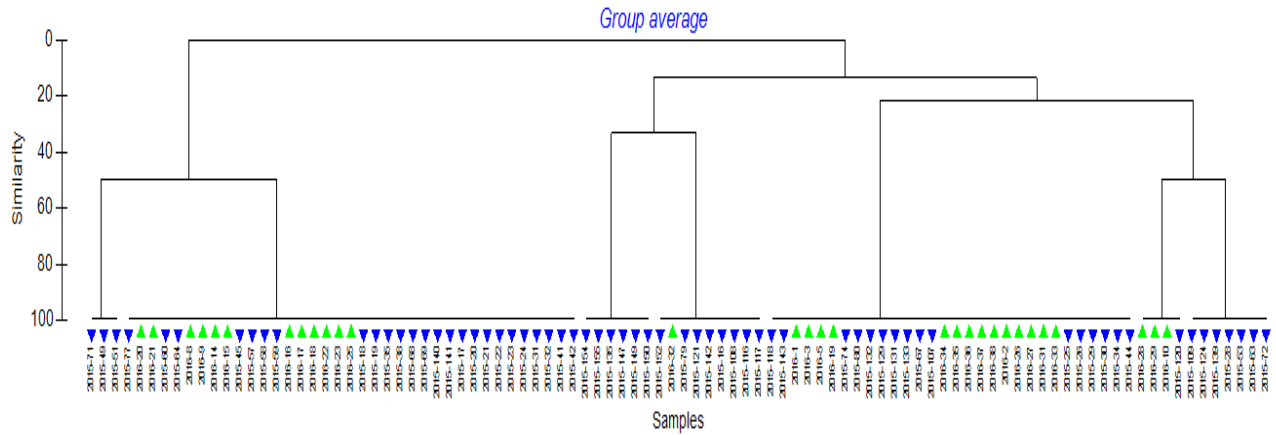


Figura 5.17. Análisis de conglomerados de perfiles RISA de bacterias aisladas de fermentaciones espontáneas de jugo de agave colectado en 2015 y 2016.

Del análisis de conglomerados se formaron siete grupos con 100 % de similitud. De los grupos se eligieron algunas cepas aleatoriamente para realizar la identificación de las bacterias. Las especies que se encontraron fueron *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Weissella confusa*, *W. paramesenteroides*, *Pediococcus acidilactici* y *Acetobacter okinawensis* (Figura 5.18 y 5.19).

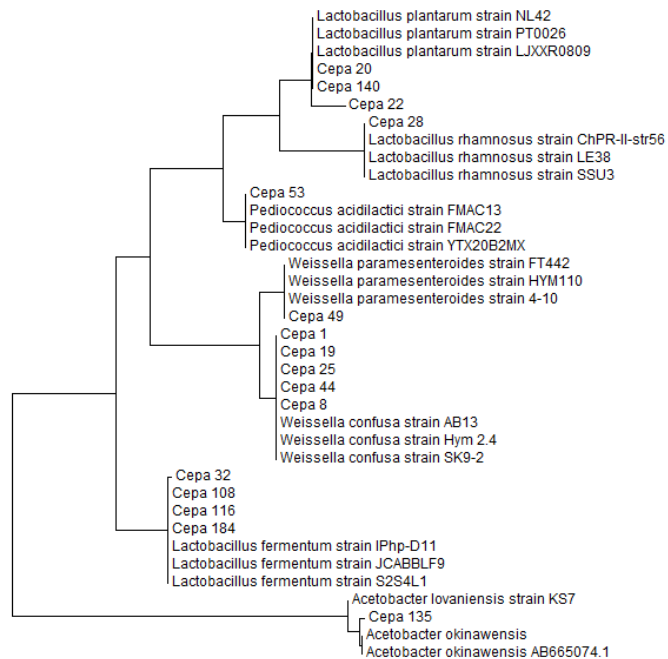


Figura 5.18. Árbol filogenético de las cepas de bacterias representativas de los perfiles RISA para la identificación a nivel especie, creado con el método de máxima verosimilitud.

Comparando las poblaciones de bacterias en los dos años, se encontró una mayor diversidad presentes en 2015 a pesar de que únicamente en cuatro muestras (A, B, C y D) se encontraron presentes bacterias. Estos hallazgos pudieran tener relación con los diferentes procesos de lavado y desinfección de los tanques después de la fermentación que se llevaron a cabo en cada año. Como se mencionó con anterioridad, en 2015 el saneamiento de los tanques de fermentación se realizó de manera adecuada entre cada fermentación, mientras que en 2016 sólo se aplicaron enjuagues. En el primer año las bacterias que llegaron al mosto estéril no encontraron competencia con otras, por lo que se observó una mayor diversidad, mientras que en 2016 por la falta de higienización se pudo propiciar el establecimiento de ciertas especies reflejado en el hallazgo del aislamiento de sólo tres especies del género *Lactobacillus* y *W. confusa*.

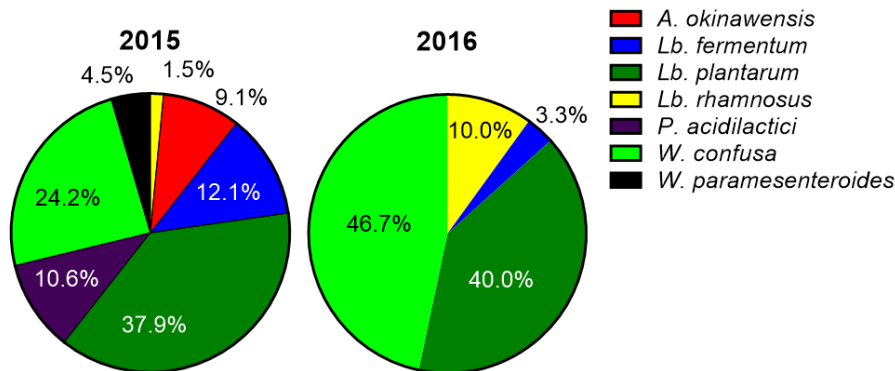


Figura 5.19. Porcentaje de especies de bacterias aisladas de muestras de jugo de agave colectado en 2015 y 2016 y fermentado espontáneamente.

Acetobacter okinawensis es una bacteria acética, aislada por primera vez de tallos de caña de azúcar en Japón (Lino y col., 2012). También se ha aislado de kéfir del Tíbet (Chen y col., 2016) y de fermentaciones acéticas de vinagre de manzana (Yetiman y Kesmen, 2015). Dado que puede consumir el etanol y generar ácido acético, suele considerarse un microorganismo contaminante en las fermentaciones, además de su alta osmotolerancia (20 % de glucosa) y la elevada tolerancia al etanol (10 %). El aislamiento en 2015, se puede relacionar a que las fermentaciones fueron más prolongadas por lo que se generaron condiciones favorables para su desarrollo.

Lb. plantarum ha sido reportada en la fermentación de jugo de agave para la producción de mezcal (Escalante-Minakata y col., 2008). Esta bacteria se considera como microbiota deseable

en fermentaciones para la producción de bioetanol, pues no afecta negativamente el desarrollo de las levaduras y puede inhibir el crecimiento de otras bacterias que pudieran ser perjudiciales (Bischoff y col., 2009). En vinificación se ha reducido el tiempo de la fermentación alcohólica y maloláctica en coinoculaciones de esta bacteria con *S. cerevisiae* (Berbegal y col., 2016).

Lb. rhamnosus ha sido aislado de vinificaciones efectuadas en Chile (Henríquez-Aedo y col., 2016), pero está más relacionado con fermentaciones de lácteos (Innocente y col., 2016). Esta bacteria no fue detectada por ninguna técnica molecular.

W. confusa y *W. paramesenteroides* han sido aisladas en fermentación de jugo de agave para la producción de mezcal (Escalante-Minakata y col., 2008) y en la producción de cachaça (Gomes y col., 2010). Solamente fueron encontrados en los muestreos de 2015, lo que puede deberse a que no toleran la presión selectiva de fermentaciones consecutivas.

Pediococcus acidilactici es considerado como un microorganismo iniciador en cárnicos y vegetales fermentados usado a nivel mundial (Leroy y De Vuyst, 2004). Esta bacteria produce bacteriocinas que actúan contra otras bacterias, inhibiéndolas (Albano y col. 2007).

El llevar a cabo un enfoque polifásico para determinar la diversidad de los microorganismos permite tener una imagen más clara de los cambios que ocurren en una fermentación. Cada metodología ha proporcionado información valiosa que en conjunto permitió dar más luz de qué ocurre durante el proceso tradicional de elaboración del tequila.

Sin lugar a dudas, la limpieza y desinfección de los tanques es una etapa crítica para la generación de producto de buena calidad. Su aplicación afectó el proceso de fermentación espontáneo que, si bien pareciera un resultado negativo en este estudio, se pone de manifiesto que el microorganismo que será inoculado no encontrará competencia y dominará la fermentación.

V.3 Selección de levaduras

V.3.1 Preselección: pruebas fenotípicas cualitativas

Durante la fermentación, los microorganismos se enfrentan a diversas condiciones estresantes, siendo la presión osmótica (concentración de azúcares) y la concentración creciente

de etanol, las más importantes en términos de cambios durante el proceso de fermentación (Tofalo y col., 2009).

A las 605 cepas de levaduras aisladas durante los dos años se les evaluó la tolerancia a 20 % de fructosa y 10 % de etanol como prueba para su preselección. También se evaluó el cambio del pH del medio debido a la producción de ácido o compuestos nitrogenados como indicadores de producción de compuestos indeseables (Tabla 5.4).

Tabla 5.4 Número de cepas de levaduras tolerantes a las pruebas fenotípicas.

Prueba	Nivel	Número de cepas	Porcentaje (%)
Tolerancia	20 % de fructosa	569	94.05
	10 % de etanol	89	14.71
Cambio del pH del medio	Ácido (pH<5.0)	70	11.57
	Neutro (pH 5.0)	519	85.79
	Básico (pH>5.0)	11	1.82

La mayoría de las levaduras crecieron en altas concentraciones de fructosa, que es una característica deseable pues permitiría la fermentación del jugo de agave obtenido después del tratamiento térmico (entre 16 y 20 °Brix) que suele ser diluido a valores entre 10 y 14 °Brix.

Se sabe que las levaduras pueden transformar durante la fermentación la glucosa a etanol en una relación estequiométrica de 1 a 0.511 (Bai y col., 2008), entonces teóricamente es posible obtener a partir de 200 g/L (20 %) de glucosa, un total de 102.2 g/L etanol (12.9 % v/v). Para fructosa no se tienen estudios que calculen esta relación directa. Utilizando el valor del rendimiento de etanol $Y_{etOH/S}=0.43$ de cepas fructolíticas de *S. cerevisiae* en medio sintético similar al jugo de agave obtenido por De la Torre-González y col. (2016), se puede esperar que 200 g/L de fructosa generen 86 g/L de etanol (10.9 % v/v), por ello es deseable seleccionar levaduras que tengan tolerancias similares a este valor y por ello, teóricamente, presenten conversiones similares de fructosa a etanol.

Solamente 89 aislados mostraron tener tolerancia a 10 % de etanol y de éstas ninguna mostró cambios en el pH del medio, es decir no hay producción y liberación significativa de ácidos orgánicos o compuestos nitrogenados que pudieran implicar reducción en la eficiencia fermentativa y generación de precursores de etil carbamato, respectivamente. Todas mostraron ser

tolerantes a 20% de fructosa. Las 89 levaduras preseleccionadas correspondieron a las tres especies detectadas por métodos tradicionales, es decir, *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *P. kudriavzevii* (Figura 5.20). *S. cerevisiae* presentó el mayor número de aislamientos osmotolerantes y tolerantes a altas concentraciones de etanol (Anexo 4).

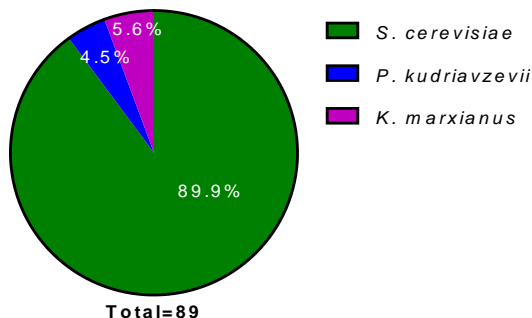


Figura 5.20 Porcentaje de especies de levaduras pre-seleccionadas con base en la tolerancia a fructosa (20 %) y etanol (10 %).

Sorprendentemente, ninguna cepa presentó efecto *killer* contra la cepa sensible, y todas fueron resistentes contra la cepa productora de toxina. Este resultado está acorde a lo reportado por Lachance (1995), donde las cepas nativas con efecto *killer* no dominaron el proceso.

V.3.2 Selección de levaduras con base en sus cinéticas de desarrollo

Se obtuvieron las curvas de crecimiento y los parámetros cinéticos de las 89 levaduras seleccionadas en medio base YP con concentraciones combinadas de fructosa y etanol, para simular condiciones más drásticas a las que se pudieran enfrentar las cepas en los diferentes estadios del proceso de fermentación (Figura 5.21).

Se sabe que la composición del medio influye en la producción de biomasa, el crecimiento de las levaduras y la producción de metabolitos (Bell y Henschke, 2005). Las levaduras difieren en sus fases de crecimiento cuando son sometidas a distintas fuentes de carbono (Aguilar-Uscanga y François, 2003). En las fermentaciones de jugo de agave, el principal azúcar que se metaboliza por la microbiota es la fructosa encontrándose en un rango de 100 a 250 g/L, concentración que genera un estrés osmótico en las células. Además, la fructosa es de menor fermentabilidad que la glucosa (De la Torre-González y col., 2016). Las células de levaduras se adaptan después de un breve periodo de estar en contacto en las nuevas condiciones. Una vez que se genera la maquinaria

metabólica requerida para sobreponerse al nuevo medio, las células comienzan a crecer exponencialmente (Rezaei y col., 2014). En la fase estacionaria, el flujo metabólico cambia de la formación de biomasa a la producción de etanol y otros compuestos (Dong y col., 2015).

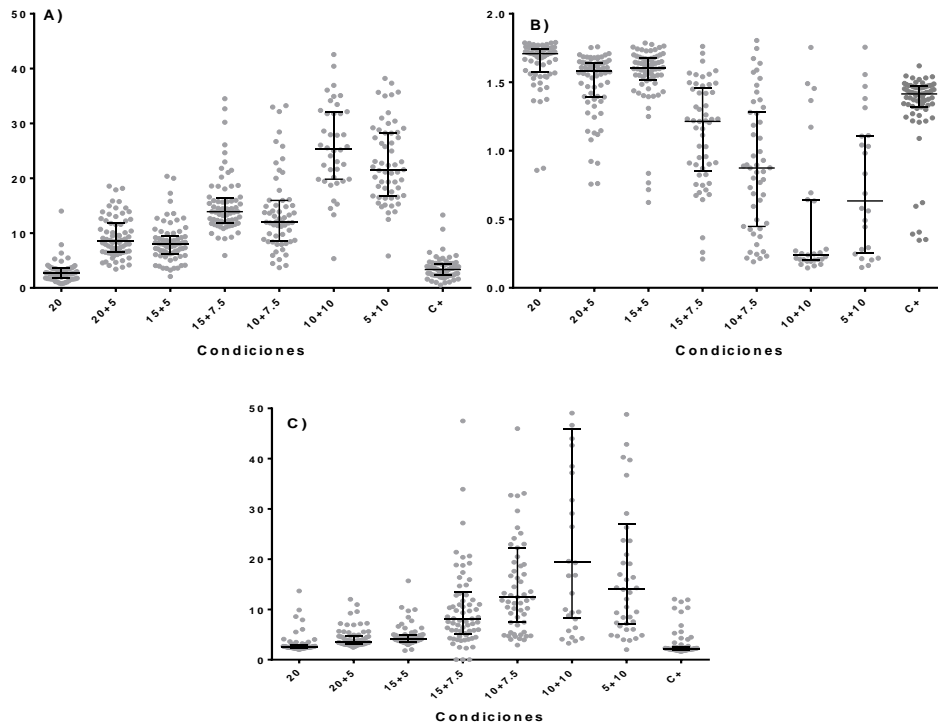


Figura 5.21 Parámetros cinéticos de las cepas de levaduras a diferentes concentraciones combinadas de fructosa (primer número) y etanol (segundo número) (Eje X). En el eje Y se muestran: A) Tiempo de adaptación (h), B) Densidad óptica máxima (OD), y C) Tiempo de duplicación (h^{-1}). La línea central corresponde a la mediana y la dispersión al rango intercuartil.

La mayoría de las levaduras crecieron similar al control en la concentración de 20 % de fructosa, con una fase de adaptación en promedio de 3.3 h, tiempos de duplicación de 3.4 h y densidad óptica máxima de 1.6, corroborando la alta osmotolerancia observada en la prueba de preselección de estas cepas. Sin embargo, se pudo diferenciar a las cepas 196, 222 y 243, que desarrollaron después de períodos de adaptación más largos, crecimientos más lentos y con menor biomasa formada (menor DO), lo cual no hubiera sido posible observar mediante la metodología de preselección, la cual se basó solamente en la presencia de turbidez en el medio de cultivo. Es decir, se pudo discriminar a aquellas levaduras con menor capacidad para desarrollar en una fermentación.

Cada cepa generó curvas de crecimiento con diferentes tiempos de adaptación, velocidades de crecimiento y crecimiento máximo, hecho que se relaciona con el nivel de adaptación de estos microorganismos a los cambios durante la fermentación (Bell y Henschke, 2005). En general, el incremento de la concentración de etanol causó un incremento en el tiempo de adaptación, en el tiempo de duplicación y la disminución de la OD máxima (crecimiento máximo). En la misma concentración de etanol, los niveles altos de fructosa causaron la reducción del crecimiento de las levaduras. Por ejemplo, la presencia de 10 % de etanol y 10 % de fructosa causó que solo 23 cepas pudieran crecer, mientras que en 5 % de fructosa, todas las levaduras lograron crecer, aunque lentamente.

La tolerancia a las altas concentraciones de fructosa y etanol se han estudiado anteriormente de forma independiente. Arroyo-López y col. (2009), reportaron que la concentración óptima de fructosa para cepas de *S. cerevisiae* proveniente de diferentes industrias de fermentación se encontraba entre 4.33-6.05 % y con niveles que completamente inhibían completamente el desarrollo de la levadura en el rango de 59.6-63.8 %. Respecto a la resistencia al etanol, las cepas de *S. cerevisiae* se muestran viables a niveles de hasta 18 % en medios sintéticos formulados con glucosa (Capece y col., 2014). De la Torre-González y col. (2016) observaron la tolerancia a 15 % de etanol y 2 % de glucosa, mientras que en la presencia de 2 % de fructosa la tolerancia fue solo del 9 % de etanol.

Para la selección de las levaduras que tuvieron el mejor comportamiento en el mayor número de condiciones, se utilizó un análisis de partición, para formar tres grupos: bajo desarrollo, intermedio y alto (Figura 5.22). Los dos ejes del análisis de componentes principales sumaron el 87.2 % de la variabilidad total explicada, mostrando una buena representación de los datos. El primer eje indicó que las cepas con corta duración de la fase lag y tiempo de duplicación presentó mayores crecimientos máximos. El segundo eje contrastó a cepas que presentaron cepas con fases de adaptación prolongada presentaron tiempos de duplicación cortos, y viceversa. Como era de esperarse en el grupo de alto desarrollo (color azul) se encontraron todas las levaduras en condiciones de menor estrés (20 % de fructosa hasta 15 % con 5 % de etanol). Los diferentes comportamientos de las cepas evidenciados en las pruebas con altas concentraciones de etanol (>7.5 %) permitió seleccionar aquellos con mejor tolerancia. Las cepas, que en este momento se

denominaron Teq-199, Teq-230 y Teq-231 desarrollaron rápidamente en cuatro condiciones de siete evaluadas (20 % de fructosa hasta 15 % con 7.5 % etanol).

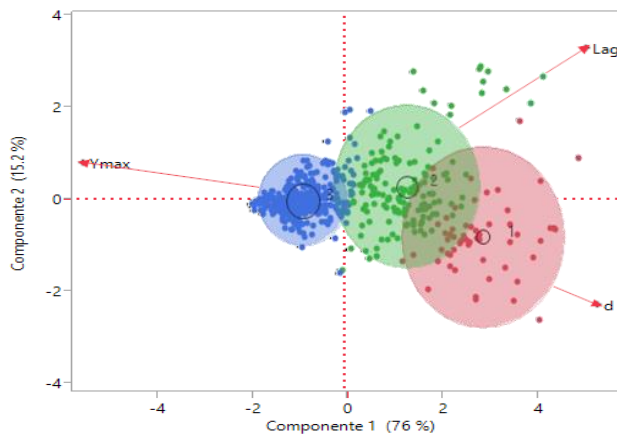


Figura 5.22 Representación mediante un análisis de componentes principales del análisis de conglomerados de partición, formando grupos: 1) de bajo desarrollo, 2) intermedio y 3) alto.

V.4 Fermentaciones de jugo de agave empleando levaduras seleccionadas.

Las cepas de *S. cerevisiae* Teq-199, Teq-230 y Teq-231 mostraron las mejores cinéticas de desarrollo en distintas condiciones de fructosa y etanol que pueden ocurrir durante la fermentación. Sin embargo, es necesario determinar los productos de su metabolismo en distintas condiciones de temperatura, pH y azúcares iniciales y así, conocer las condiciones óptimas para una mejor fermentación alcohólica.

Para cada cepa, las variables que mostraron un efecto significativo sobre la producción de alcohol y la eficiencia fermentativa fueron la temperatura, la concentración de fructosa y sus componentes cuadráticos (Tabla 5.5). El término cuadrático mostró que existe un punto de inflexión donde se encontró el máximo o mínimo (dependiendo de la respuesta).

Las cuatro cepas de *S. cerevisiae* evaluadas (K1-V116, Teq-199, Teq-230 y Teq-231) mostraron las mejores respuestas a pH de 3.5, y una disminución del consumo de fructosa al incrementarse la concentración inicial del azúcar, presentando un óptimo de 10 % (Figura 5.23).

Tabla 5.5 Resumen de significancia estadística de variables que afectan el consumo de azúcar, producción de etanol y rendimiento fermentativo de las cepas K1-V116, Teq-199, Teq-230 y Teq-231.

Cepa	K1-V116			Teq-199			Teq-230			Teq-231		
	Parámetro	Consumo de azúcar	Etanol	Rendimiento	Consumo de azúcar	Etanol	Rendimiento	Consumo de azúcar	Etanol	Rendimiento	Consumo de azúcar	Etanol
Concentración de fructosa (F)	0.042*	0.473	0.005*	0.0008*	0.595	<0.0001*	0.009*	0.096**	0.018*	0.026*	0.506	0.0003*
pH	0.535	0.747	0.811	0.967	0.058**	0.013*	0.417	0.479	0.414	0.334	0.499	0.928
Temperatura (T)	0.332	0.418	0.481	0.0162*	0.006*	0.01*	0.422	0.018*	0.021*	0.021*	0.009*	0.012*
F*pH	0.367	0.737	0.571	0.235	0.395	0.459	0.232	0.258	0.663	0.546	0.863	0.936
F*T	0.417	0.457	0.334	0.141	0.057**	0.044*	0.606	0.323	0.398	0.947	0.631	0.911
pH*T	0.322	0.251	0.075**	0.261	0.415	0.888	0.127	0.171	0.69	0.996	0.973	0.739
F*F	0.616	0.903	0.219	0.106**	0.026*	0.061*	0.55	0.511	0.697	0.229	0.554	0.079**
pH*pH	0.299	0.156	0.058**	0.84	0.64	0.719	0.881	0.701	0.661	0.226	0.632	0.629
T*T	0.105**	0.069**	0.009*	0.09**	0.007*	0.005*	0.028*	0.037*	0.284	0.91	0.903	0.37

*Factor significativo ($\alpha < 0.05$); **Factor significativo ($\alpha < 0.1$).

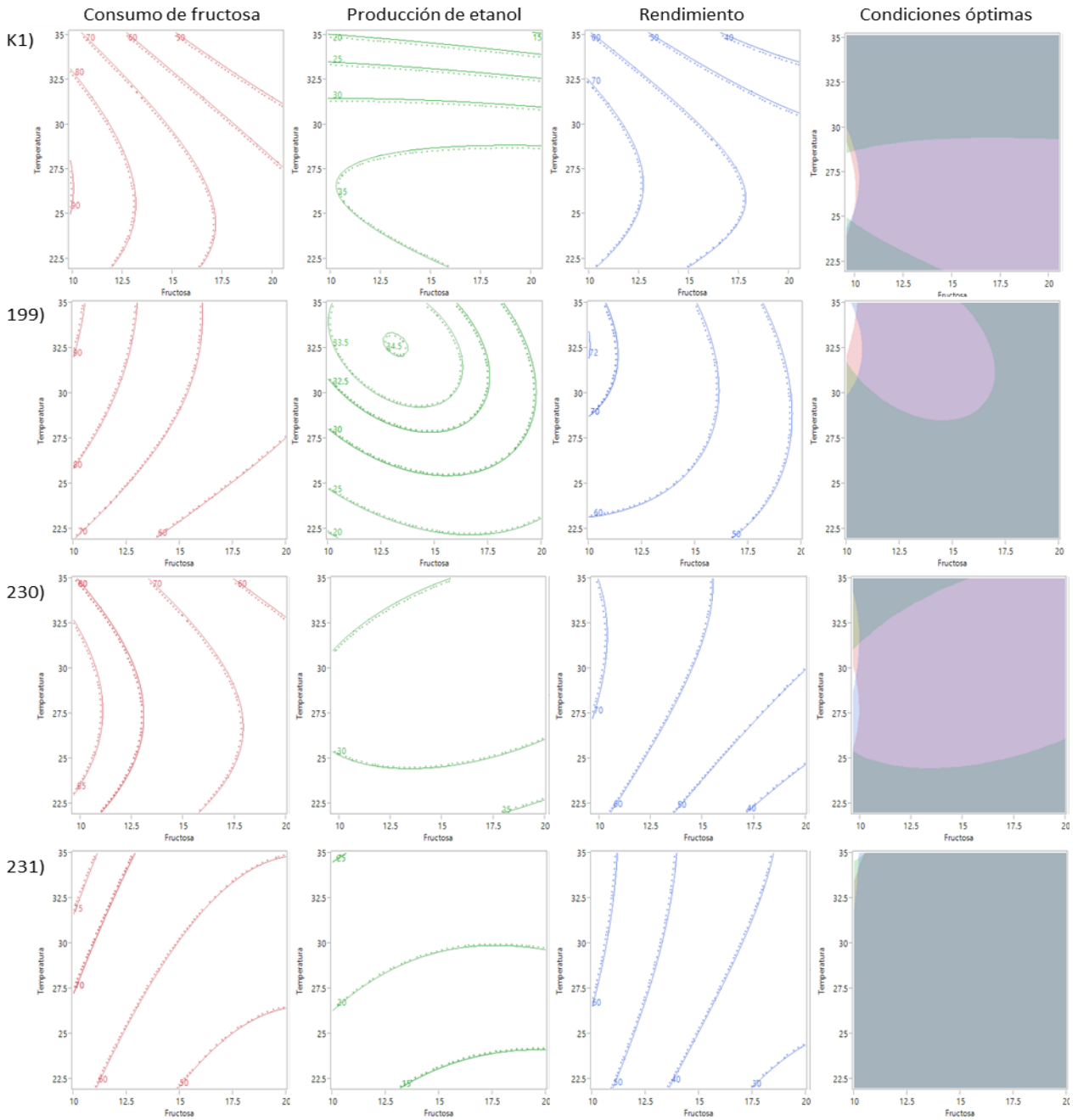


Figura 5.23 Contorno de respuesta para el consumo de fructosa (rojo), producción de etanol (verde), rendimiento de fermentación (azul) y gráficos superpuestos de condiciones óptimas de las cuatro cepas de levaduras evaluadas en pH de 3.5.

La producción de etanol varió en función de la cepa, mostrando una relación positiva hasta cierta concentración de fructosa, después de la cual, disminuyó. El rendimiento de la fermentación se vio más influenciado por la disminución en el consumo de fructosa por ser un cambio de mayor magnitud que el aumento de etanol. Los azúcares además de ser la fuente de

energía para la levadura, a una cierta concentración afectarán de forma negativa a las células debido a la presión osmótica que genera. Aunado a esto, si la concentración de azúcar aún es alta cuando se eleva la concentración de etanol, ocurrirá la pérdida de viabilidad celular más rápidamente (Pratt y col., 2012).

La temperatura mostró mayor influencia en la respuesta de las distintas cepas evaluadas. Temperaturas de entre 23 y 27 °C fueron mejores para K1-V116, debido a que esta cepa fue seleccionada para fermentaciones vínicas donde las temperaturas suelen encontrarse entre los 15 a 28 °C (Molina y col., 2007). Las cepas aisladas del proceso del tequila presentaron rangos más cortos de temperaturas óptimas, para la cepa Teq-230 entre 28 y 30 °C, mientras que las cepas Teq-199 y Teq-231 más cercanas a 35 °C concordando con las temperaturas que emplea la empresa Corralejo en el proceso de fermentación del tequila, que suele presentar temperaturas por encima de los 30 °C.

Con el análisis anterior fue posible establecer las condiciones óptimas en las que se obtuvieron en conjunto las máximas respuestas, representado como la región blanca en la gráfica 5.16, que consistieron en pH de 3.5, concentración de fructosa de 10 % y la temperatura óptima varió para cada cepa. Finalmente, la cepa Teq-199 presentó las características más deseables para ser usada en el proceso de fermentación de jugo de agave que se lleva a cabo en la empresa ya que mostró la temperatura óptima más alta, por consiguiente, fue la levadura seleccionada para los siguientes ensayos (Tabla 5.7).

Tabla 5.6. Temperatura óptima de desarrollo de las tres cepas de levadura seleccionadas y sus respectivas variables respuesta en fermentaciones llevadas a cabo en YPF a pH de 3.5 y concentración de fructosa de 10 %

Cepa	Temperatura (°C)	Consumo de fructosa (%)	Producción de etanol (g/L)	Rendimiento fermentativo (%)	Producción de acético (g/L)
K1-V116	27	90.0	34.9	77.7	0.56
Teq-199	33	91.0	33.5	72.0	0.21
Teq-230	28	87.9	31.0	69.4	0.63
Teq-231	35	76.7	25.0	62.5	0.45

V.5 Evaluación del comportamiento de *S. cerevisiae* Teq-199 en combinación con bacterias.

En una fermentación alcohólica se encuentran presentes levaduras, que llevan a cabo el proceso de conversión de azúcares a etanol, y bacterias, consideradas como contaminantes pues

son potenciales agentes que reducirán el rendimiento de la producción al afectar el metabolismo de las levaduras por la producción de ácidos orgánicos u otros metabolitos y por competencia por nutrientes (Bartowsky y col., 2009; Muthaiyan y col., 2011). Dependiendo de la especie de bacteria será el grado en que afecte a las levaduras fermentativas, y el efecto que tendrán en la calidad de la bebida final, pues algunas son capaces de producir aromas benéficos (Jussier y col., 2006). Por ello, se determinó el efecto de las especies de bacterias nativas de manera individual en la fermentación del jugo de agave empleando la cepa de *S. cerevisiae* Teq-199.

No hubo efecto de la especie de bacteria en el crecimiento de la cepa de levadura ya que las curvas de crecimiento fueron similares en todos los casos (Figura 5.24A). La concentración de levadura inoculada (promedio de 4.39 ± 0.08 Log UFC/mL) aumentó las primeras 24 h hasta alcanzar el valor máximo (promedio de 7.39 ± 0.08 Log UFC/mL) que se mantuvo hasta el quinto día de la fermentación.

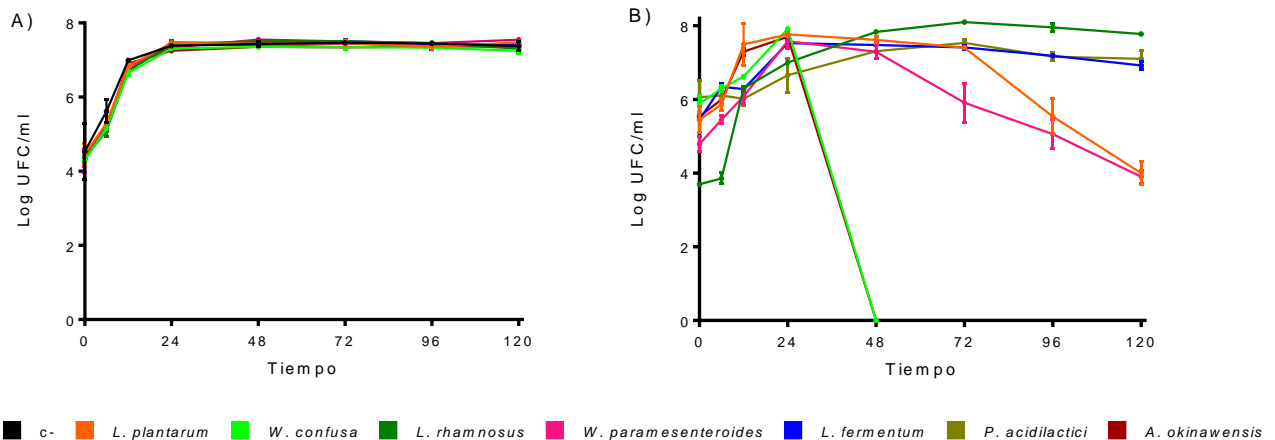


Figura 5.24 Crecimiento de *S. cerevisiae* Teq-199 (A) y especies de bacterias durante la fermentación de jugo da agave (B).

Las dinámicas de desarrollo de las bacterias variaron dependiendo de la especie (Figura 5.24B). *W. paramesenteroides* y *L. plantarum* aumentaron sus concentraciones a la par que *S. cerevisiae* Teq-199, sin embargo, al segundo y tercer día, respectivamente, comenzaron con la fase de muerte disminuyendo a la concentración inicial en el quinto día. Por su parte, *W. confusa* y *A. okinawensis* después de las 48 h de fermentación no pudieron ser recuperadas ni observadas en el microscopio. *Lb. fermentum* permaneció en altas concentraciones hasta el final de la fermentación. *P. acidilactici* y *L. rhamnosus* desarrollaron más lentamente, alcanzando su máxima concentración hasta las 72 h.

Los tratamientos en los que se inoculó la levadura y las distintas especies de bacterias mostraron una mayor pérdida de peso comparado con el control (sin inocular bacterias), a excepción de *W. confusa* y *A. okinawensis* (Figura 5.25A). La mayor pérdida de peso por la producción de CO₂ se debe a que el metabolismo de estas bacterias es heterofermentativo, es decir, además de ácido láctico también producen CO₂, y otros metabolitos (König y Fröhlich, 2009). La ausencia de *W. confusa* y *A. okinawensis* después del tercer día de fermentación explica la similitud con el mosto control (Figura 5.25B).

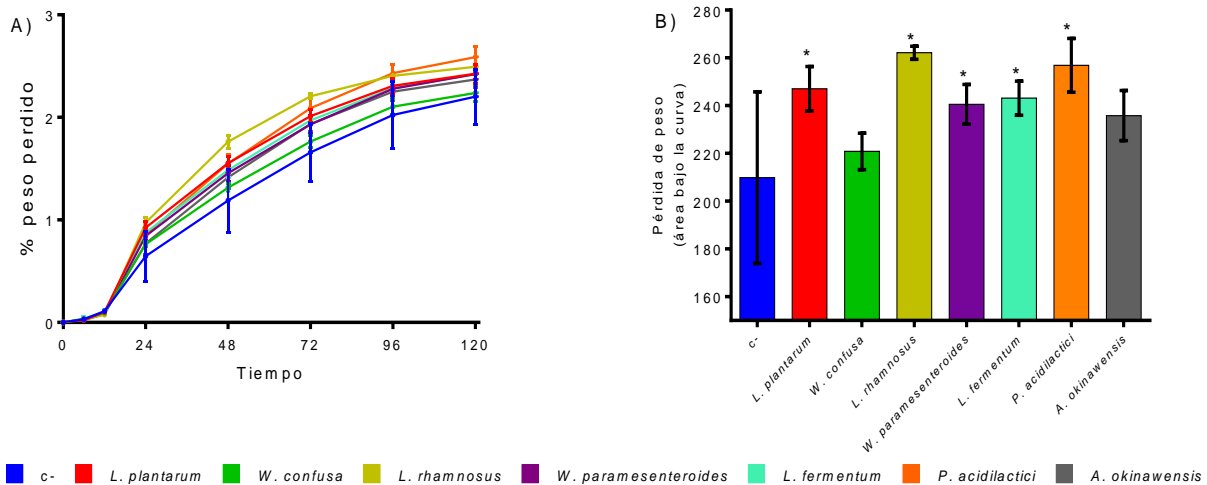


Figura 5.25 Evolución de la fermentación de jugo de agave inoculando la cepa Teq-199 y cepas de bacterias nativas, determinada como pérdida de peso por producción de CO₂ (A), y área bajo la curva de pérdida de peso (B). *Diferencia significativa respecto al control ($\alpha < 0.05$)

El consumo de fructosa de todas las bacterias fue mayor comparado con la fermentación por la levadura de forma individual ($P < 0.0001$) y tuvo diferencia significativa entre especie ($P < 0.0018$) siendo *L. rhamnosus* la que mostró el mayor consumo, aunque solamente fue 1.42 g mayor que el control (Figura 5.26).

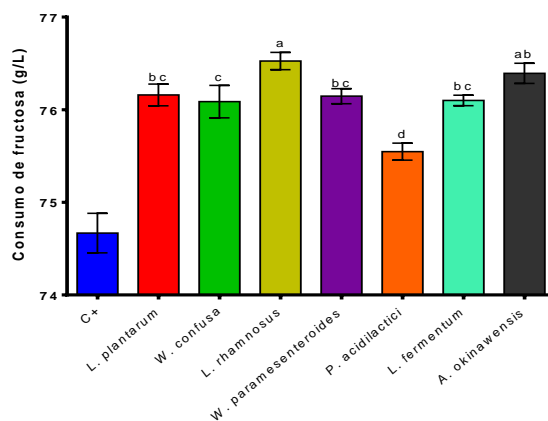


Figura 5.26 Consumo de fructosa en fermentaciones de jugo de agave inoculando la levadura Teq-199 y cepas nativas de bacterias. Letras diferentes indican diferencia significativa.

Solamente en cuatro tratamientos se produjo ácido acético. La mayor concentración (0.92 g/L) fue generada por *P. acidilactici*, seguida por *W. paramesenteroides*, *W. confusa* y la menor (0.78 g/L) por *A. okinawensis* (Figura 5.27). Estos valores son mayores comparado con lo reportado para el jugo de agave para producción de tequila a nivel semi-industrial llevado a cabo por *K. marxianus*, encontrándose entre 75.2 a 110 mg/L (Díaz-Montaño y col., 2008) y son mucho menores, comparados con el proceso artesanal del mezcal que presenta valores entre 6.17 y 8.82 g/L (Narváez-Zapata y col., 2010). No hay especificaciones en la NOM-006-SCFI-2012 para ácido acético en el destilado, donde se esperaría que las condiciones del proceso de destilación fraccionada sean óptimas para removerlo del producto final. Cabe destacar que a pesar de que *P. acidilactici* se ha reportado que realiza únicamente el metabolismo homofermentativo, se ha observado que bajo ciertas condiciones también puede producir ácido acético, propiónico, butírico y málico (Yuliana y Garcia, 2009; Ley de-Coss y col. 2013). El género *Weissella* es heterofermentativo obligado (Fusco y col., 2015), por lo que siempre producirán ácido acético como producto de su metabolismo. Al ser *A. okinawensis* una bacteria aerobia estricta, se puede explicar la inhibición de esta bacteria en la fermentación debido al desarrollo la levadura, su consecuente producción de CO₂ y con ello, el desplazamiento de oxígeno del medio (Mamlouk y Gullo, 2013).

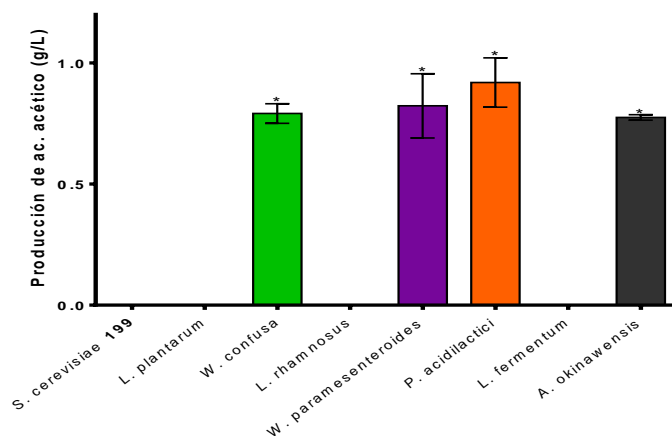


Figura 5.27 Producción de ácido acético en la fermentación de jugo de agave inoculando la levadura Teq-199 y especies nativas de bacterias. *Diferencia significativa respecto al control.

El principal producto de la fermentación de las bacterias fue el ácido láctico, siendo *L. rhamnosus* quien generó la mayor concentración, seguido de *W. confusa* a pesar de haber desaparecido desde la mitad de la fermentación (Figura 5.28).

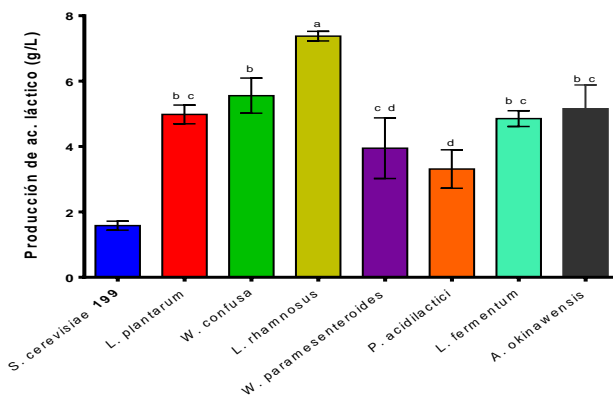


Figura 5.28 Producción de ácido láctico en la fermentación de jugo de agave inoculando la levadura Teq-199 y especies nativas de bacterias. Letra diferente indica diferencia significativa respecto al control.

Finalmente, el etanol producido en la fermentación con *W. confusa* tuvo la menor diferencia a la concentración que generó el monocultivo de la levadura; en los demás casos la presencia de la bacteria tuvo mayor influencia al reducir la concentración final de etanol, siendo *L. rhamnosus* el que tuvo un mayor efecto (Figura 5.29).

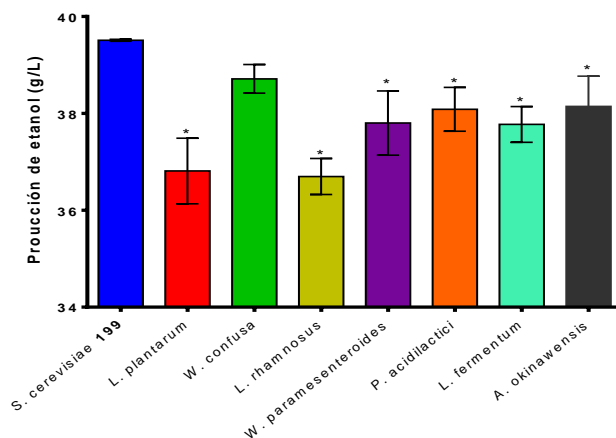


Figura 5.29 Producción de etanol en la fermentación de jugo de agave inoculando la levadura Teq-199 y especies nativas de bacterias. *Diferencia significativa respecto al control.

Algunos microorganismos producen urea como producto de desecho durante el metabolismo del nitrógeno y éste es un potencial precursor del etil carbamato al reaccionar con el etanol del medio (Xia y col. 2018). La levadura Teq-199 generó concentraciones de urea similares a las encontradas en las fermentaciones espontáneas (Figura 5.29). Las concentraciones de este metabolito son menores a las reportadas en vino tinto elaborado con *S. bayanus* o *S. cerevisiae* seguidas de la fermentación maloláctica con *L. hilgardii* u *O. oeni* con un promedio de 2.8 mg/L (Uthurry y col., 2006) y de vino de ciruela usada para destilación, en la que las cepas de *S. cerevisiae* generaron en promedio 22.8 mg/L (Balcerek y Stanislaw, 2006)

A pesar de que no mostró diferencia significativa, se observa la tendencia a disminuir la concentración de urea en el desarrollo de la fermentación con *W. confusa* y *P. acidilactici* comparada con únicamente la levadura individual. Estos cambios se pueden deber a que las bacterias pudieron absorber y utilizar la urea como fuente de nitrógeno (Ough y col., 1991). La fermentación con *W. paramesenteroides* mostró la mayor concentración de urea, indicando que la bacteria produce el compuesto.

Sería necesario implementar otra estrategia para eliminar la concentración de urea durante la fermentación, como pudiera ser la adición de ureasa ácida al mosto, modificar la levadura mediante ingeniería genética o bien, llevar a cabo estudios para determinar la mejor fuente de nitrógeno y su concentración óptima y así evitar la liberación de urea en el medio (Zhao y col., 2013).

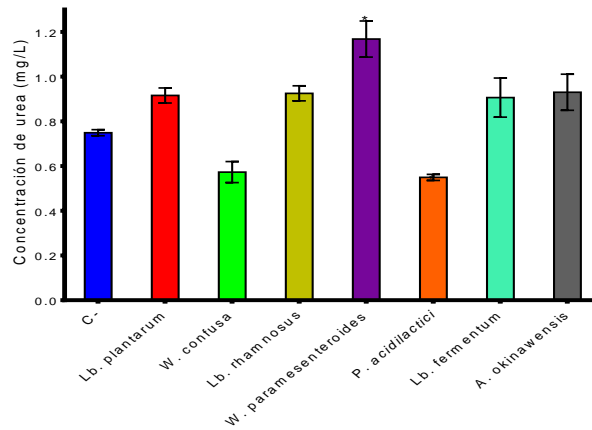


Figura 5.30 Concentración de urea producida por la levadura Teq-199 en conjunto con bacterias nativas en jugo de agave.

V.6 Desempeño del *S. cerevisiae* en fermentación de jugo de agave inoculado con un consorcio de bacterias nativas.

Los resultados anteriores ponen de manifiesto la competencia por nutrientes realizada por las bacterias que afectará la producción de etanol en el proceso. Sin embargo, es importante evaluar el desempeño de la levadura que se empleará como cultivo iniciador para la producción de tequila en condiciones similares a la realidad. Es decir, evaluarla en presencia de una comunidad de bacterias nativas, para determinar si lograría colonizar el medio, competir contra la microbiota nativa y dominar la fermentación para desarrollar el proceso de manera eficiente (Meersman y col., 2015). Por ello, se evaluó el comportamiento de *S. cerevisiae* Teq-199 contra la mezcla de bacterias nativas que pudieran estar presentes en una fermentación de mosto de agave. También, se comparó su comportamiento con el de una levadura comercial. Las cepas de bacteria incluidas en el estudio presentaron una tolerancia de por lo menos 5% de etanol.

Durante la fermentación del jugo de agave, ambas cepas de levaduras alcanzaron la mayor concentración en las primeras 24 h (Figura 5.31). Ambas cepas disminuyeron su número después de 72 h, pero la reducción fue mayor en la cepa K1-V116. Las dinámicas de las bacterias fueron similares en ambos casos, mostrando que no hubo efecto de la cepa de levadura en la concentración de bacterias.

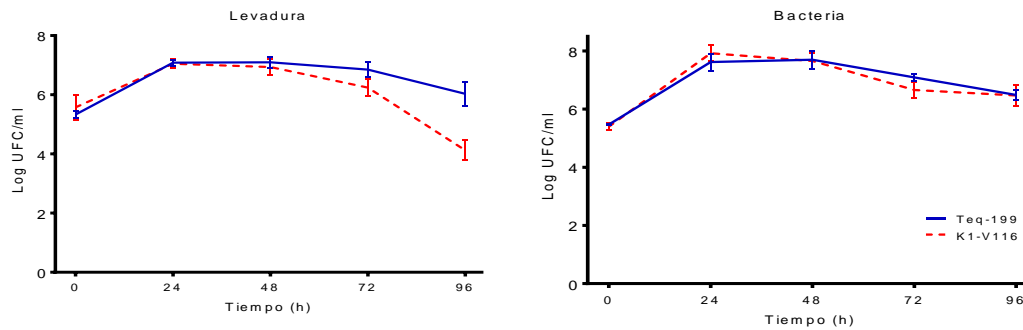


Figura 5.31 Curvas de desarrollo de levaduras y bacterias inoculadas simultáneamente en mosto de agave.

Se hizo evidente la reducción en el consumo de azúcares y la producción de etanol al estar presente una comunidad de bacterias en el mosto de agave (Figura 5.32). Esto debido a la mayor producción de ácido acético, llegando a valores cercanos a 7 g/L, que se asemejan a lo reportado para fermentaciones de mezcal artesanal (Narváez-Zapata y col., 2010). También se observó claramente el efecto del tipo de cepa en el desarrollo de la fermentación. La cepa de levadura nativa consumió la mayor cantidad de azúcares y produjo más etanol, lo que demuestra su capacidad de adaptación al mosto de agave comparada con la levadura comercial de vinificación K1-V116. No hubo diferencias respecto a la producción de ácido láctico ni acético indicando que el tipo de levadura no tuvo efecto con el metabolismo de las bacterias.

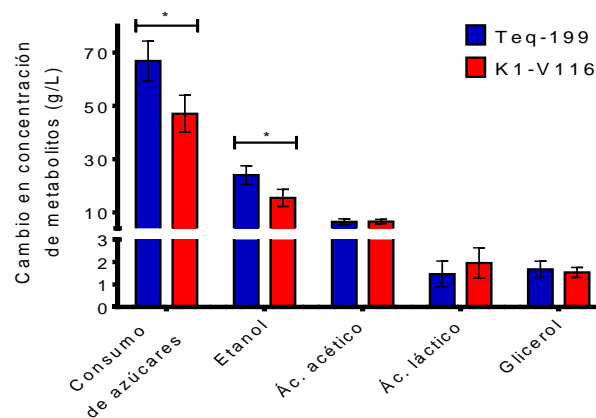


Figura 5.32 Consumo de azúcares y producción de metabolitos durante la fermentación de mosto de agave por *S. cerevisiae* Teq-199 y K1-V116 en presencia de bacterias nativas.

La selección de levaduras nativas es el primer y principal paso para tener un mayor control de la fermentación. Sin embargo, hay muchos otros factores que influyen el resultado del proceso a nivel industrial, como la concentración de nitrógeno asimilable, la forma en cómo se

prepara el inóculo, es decir, la historia previa de la cepa, la presencia de oxígeno disuelto en el mosto para la generación de biomasa, entre otros. Estos factores juegan un papel importante en la dominación de la cepa inoculada y el metabolismo que efectuará. Es necesario realizar otros estudios para encontrar las condiciones óptimas para la mejora del proceso industrial.

V. CONCLUSIONES

Las fermentaciones espontáneas que se llevaron a cabo en los dos años de muestreo presentaron una variación importante en las características físicas y químicas evaluadas y en el contenido de levaduras y bacterias.

En general, en las fermentaciones se presentaron bajas conversiones debido al pobre consumo de los azúcares, y, por ende, bajas producciones de etanol. Las fermentaciones espontáneas del 2015 se desarrollaron en mayor tiempo, hecho que se asoció al bajo pH de los mostos ocasionado por la elevada concentración de ácido láctico producido por bacterias, disminuyendo el desarrollo y la actividad de las levaduras.

Las fermentaciones del 2016 ocurrieron en un máximo de cinco días. Este hallazgo se asoció al establecimiento de levaduras nativas adaptadas al substrato y a las condiciones del proceso, asociado a un saneamiento deficiente de los tanques de fermentación.

Los perfiles de PCR-DGGE de las comunidades de microorganismos durante las fermentaciones espontáneas revelaron la presencia de *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *Lb. fermentum*, *Lb. gallinarum*, *Lb. mucosae* y *Lb. farraginis*. No hubo cambios drásticos en las comunidades que pudiera sugerir la secuencia de microorganismos en diferentes etapas de la fermentación.

Se determinó la estructura y dinámica de tres fermentaciones espontáneas mediante secuenciación masiva en paralelo, confirmando la dominancia de *S. cerevisiae* y del género *Lactobacillus*. Se evidenció la presencia de bacterias ambientales durante las fermentaciones que no pudieron ser detectada por DGGE.

Los metabolitos generados por los mismos microorganismos afectaron la dominancia de las especies bacterianas. *Lb. fermentum* y *Lb. farraginis* produjeron interacciones antagónicas con la mayoría de las bacterias presentes. La bacteria *S. rosea* presentó un fuerte antagonismo contra *Lb. fermentum* a pesar que su abundancia fue baja.

La mayor proporción de las cepas aisladas se identificaron como *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *Lb. fermentum* confirmando lo observado en la detección por métodos moleculares.

Adicionalmente, se aislaron a *P. kudriavzevii*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *W. confusa*, *W. paramesenteroides*, *P. acidilactici* y *A. okinawensis*.

Se seleccionaron 89 (14.7 %) cepas de levaduras por su tolerancia a 20 % de fructosa y 10 % de etanol, consistiendo principalmente de aislamientos de *S. cerevisiae*, seguido de *K. marxianus* y finalmente *P. kudriavzevii*.

Las cepas de *S. cerevisiae* Teq-199, Teq-230 y Teq-231 mostraron la mejor capacidad para desarrollar en condiciones combinadas de fructosa y etanol que pueden ocurrir durante la fermentación de mosto de agave.

La cepa de *S. cerevisiae* Teq-199 presentó los mejores consumos de fructosa, producción de etanol y rendimiento de la fermentación, y desarrolló de manera óptima bajo condiciones de temperatura, pH y concentración inicial de azúcares que se presentan durante la fermentación tradicional del mosto de agave que ocurre durante la producción de tequila en la empresa con la cual se colaboró en este estudio. Estos hechos la hacen una cepa que potencialmente pudiera usarse como cultivo iniciador.

La incorporación de bacterias a la fermentación de mosto de agave inoculado con *S. cerevisiae* Teq-199 tuvo un efecto negativo en la fermentación alcohólica. Estos resultados sugieren que se debe reducir el desarrollo de bacterias para evitar que se vea afectada la producción de etanol.

VI. REFERENCIAS

- Aguilar-Uscanga, B., François, J. 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol.* 37(3): 268-274.
- Al Jassim, R., Scott, P., Trebbin, A., Trott, D., Pollitt, C. 2005. The genetic diversity of lactic acid producing bacteria in the equine gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol. Lett.* 248: 75-81.
- Albano, H., Todorov, S., van Reenen, C., Hogg, T., Dicks, L., Teixeira, P. 2007. Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from “Alheira”, a fermented sausage traditionally produced in Portugal. *Int. J. Food Microbiol.* 116(2): 239-247.
- Alcázar M., Kind, T., Gschaedler, A., Silveria, M., Arrizon, J., Fiehn, O., Vallejo, A., Higuera, I., Lugo, E. 2017. Effect of steroidal saponins from *Agave* on the polysaccharide cell wall composition of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *LWT.* 77: 430-439.
- Amaya-Delgado, L., Herrera-López, E., Arrizón, J., Arellano-Plaza, M., Gschaedler, A. 2013. Performance evaluation of *Pichia kluyveri*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in industrial tequila fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29: 875-881.
- Andrade-Meneses, O., and Ruiz-Terán, F. 2004. Study of yeast populations in a mezcal fermentation. Poster PF 17, p. 157. 11th International Congress on Yeasts. Yeasts in Science and Technology, the quest for sustainable development. Rio de Janeiro, Brazil.
- Annan, N., Poll, L., Sefa-Dedeh, S., Plahar, W., Jakobsen, M. 2003. Volatile compounds produced by *Lactobacillus fermentum*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida krusei* in single starter culture fermentations of Ghanaian maize dough. *J. Appl. Microbiol.* 97(3): 462-474.
- Aredes, P., Farías, M., Manca, M., 2010. Interaction between *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii* isolated from wine. Modification of available nitrogen and biogenic amine production. *Biotech Lett.* 32(8): 1095-1102.
- Arellano, M., Pelayo C., Ramírez, J. Rodríguez, I. 2008. Characterization of kinetic parameters and the formation of volatile compounds during the tequila fermentation by wild yeast isolated from *Agave* juice. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35: 835-841.
- Arrizón, J., Arizaga, J., Hernández, R., Estarrón, M., Gschaedler, A. 2007b. Production of volatile compounds in tequila and raicilla musts by different yeast isolated from Mexican agave beverages. In: *Hispanic foods, chemistry and flavor.* pp. 167-177. American Chemical Society Symposium series 946, Washington, D.C.
- Arrizón, J., Fiore, C., Acosta, G., Romano, P., Gschaedler, A. 2006. Fermentation behaviour and volatile compound production by agave and grape must yeast in high sugar *Agave tequilana* and grape must fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek.* 89: 181-189.
- Arrizón, J., Gschaedler, A. 2002. Increasing fermentation efficiency at high sugar concentrations by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of the tequila fermentation process. *Can. J. Microbiol.* 48:965-970.
- Arrizón, J., Gschaedler, A. 2007a. Effects of the addition of different nitrogen sources in the tequila fermentation process at high sugar concentration. *J. Appl. Microbiol.* 102:1123-1131.
- Arrizón, J., Morel, S., Gschaedler, A., 2010. Comparison of water-soluble carbohydrates composition and fructan structures of *Agave tequilana* plants. *Food Chem.* Vol. 122(1): 123-130.
- Arroyo-López F, Querol A, Barrio E. 2009. Application of a substrate inhibition model to estimate the effect of fructose concentration on the growth of diverse *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36: 663-669. doi: 10.1007/s10295-009-0535-x.
- Bai, F., Anderson, W., Moo-Young, M. 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch from feedstocks. *Biotech Advances.* 26(1): 89-105.
- Balcerek, M. and Stanislaw, J. 2006. Evaluation of the effect of carbamylophosphato synthetase and urease activities in selected strains of wine yeast on the production of ethyl carbamate. *Pol J Food Nutr Sci.* 15/56 (4): 445-452.
- Barbour, E. y Priest, F. 1988. Some effects of *Lactobacillus* contamination in Scotch whisky fermentations. *J. Inst. Brew.* 94: 89-92.
- Bartowsky, E. 2009. Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Lett Appl Microbiol.* 48 (2): 149-156.
- Batista, A., Miletto, L., Stambuk, B. 2004. Sucrose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 8: 26-33.
- Bauer, F. and Pretorius, I. 2002. Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine – a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* Vol 21:27-51.

- Bautista-Justo, M., García-Oropeza L., Barbosa-Corona, J., Parra-Negrete, L. 2001. El *Agave tequilana* Weber y la producción de tequila. *Acta universitaria*. Vol. 11(2): 26-34.
- Bayrock, D., Ingledew, M. 2004. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and/or acid toxicity. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31: 362-368.
- Beland, F., Benson, W. Mellick, P., Kovatch, R., Roberts, D., Fang, J., Doerge, D. 2005. Effect of ethanol on the tumorigenicity of urethane (ethyl carbamate) in B6C3F1 mice. *Food and Chemical Technology*. 43:1-19.
- Bell, S. and Henschke, P. 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust J Grape Wine Res.* 11: 245-295.
- Benito, S., Palomero, F., Gálvez, L., Morata, A., Calderón, F., Palomero, D., Suárez-Lepe, J. 2014. Quality and composition of red wine Fermented with *Schizosaccharomyces pombe* as sole fermentative yeast, and in mixed and sequential fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol Biotechnol.* 52 (3): 376-382.
- Berbegal, C., Peña, N., Russo, P., Grieco, F., Pardo, I., Ferrer, S., Spano G., Capozzi, V. 2016. Technological properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from grape must fermentation. *Food Microbiol.* 57: 187-194.
- Bevan, E., Makower, M. 1963. The physiological basis of the *killer* character in yeast. 21 st. Int. Congr. Genetics. 1: 202-203.
- Bischoff, K., Liu, S., Leathers, T., Worthington, R., Rich, J. 2009. Modelling bacterial contamination of fuel ethanol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 103: 117-122.
- Bokulich, N., Hwang, C., Liu, S., Boundy-Mills, K., Mills, D. 2012. Profiling the yeast communities of wine fermentations using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* 63(2): 185-194.
- Bowen, S., Valenzuela, A. 2009. Geographical indications, terroir, and socioeconomic and ecological sustainability: the case of tequila. *J Rural Studies.* 25(1): 108-119.
- Cardinale, M., Brusetti, P., Quatrini, S., Borin, A., Puglia, A., Rizzi, E., Zanardini, C., Sorlini, C., Corselli y Daffonchio, D. 2004. Comparison of different promoter sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6147-6156.
- Capece A, Romaniello R, Siesto G, Pietrafesa R, Massari C, Poeta P, Romano P. 2014. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation. *Int J Food Microbiol.* 144: 187-192. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.009
- Ceballos-Magaña, S., de Pablos, F., Jurado, J., Martín, M., Alcázar, A., Muñoz-Valencia, R., Gonzalo-Lumbreras, Izquierdo-Hornillos, R. 2013. Characterisation of tequila according to their major volatile composition using multilayer perceptron neural networks. *Food Chem.* 136: 1309-1315.
- Chen, Z., Shi, J., Yang, X., Liu, Y., Nan B., Wang, Z. 2016. Isolation of exopolysaccharide-producing bacteria and yeast from Tibetan kefir and characterisation of exopolysaccharides. *Int. J. Dairy Tech.* DOI: 10.1111/1471-0307.12276
- Clemente-Jimenez, J., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F., Rodríguez-Vico., F. 2005. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 98: 301-308.
- Cocolin, L., Bisson, L., Mills, D. 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentation. *FEMS Microbiol Lett.* 189: 81-87.
- Consejo Regulador del Tequila. 2018. Producción total: Tequila y Tequila 100%. México. Recuperado de www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/
- de Carvalho-Netto, O., Dias, D., Aranha, L. 2008. Identification of contaminant bacteria in cachaca yeast by 16S rDNA gene sequencing. *Sci. Agri.* 65(5): 508-515.
- De la Torre-González F, Narváez-Zapata J, López-y-López V, Larralde-Corona C. 2016. Ethanol tolerance is decreased by fructose in *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. *Food Sci Technol.* 67:1-7. doi: 10.1016/j.lwt.2015.11.024
- De León-Rodríguez, A., Escalante-Minakata, P., Barba de la Rosa, A., Blaschek, H. 2008a. Optimization of fermentation conditions for the production of the mezcal from *Agave salmiana* using response surface methodology. *Chem. Eng. Process.* 47: 76-82.
- De León-Rodríguez, A., Escalante-Minakata, P., Jiménez-García, L., Ordoñez-Acevedo, L., Flores, J., Barba de la Rosa, A. 2008b. Characterization of volatile compounds from ethnic agave alcoholic beverages by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Technol. Biotechnol.* 46(4):448-455.
- De León-Rodríguez, A., González-Hernández, L., Barba de la Rosa, A., Escalante-Minakata, P., López, M. 2006. Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave salmiana*. *J. Agric. Food Chem.* 54:1337-1341.

- Díaz-Montaño, D., 2013. Continuous agave juices fermentation for producing bioethanol. In: Darko, M. Biomass now- sustainable growth and use. InTech. Chapter 8. p. 209.
- Díaz-Montaño, D., Délia, M., Estarrón-Espinosa, M., Strehaiano, P. 2008. Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from *Agave tequilana* Weber juice. *Enz. Micro. Tech.* Vol 42 (7):608-616.
- Díaz-Montaño, D., Favela-Torres, E., Córdova, J. 2010. Improvement of growth, fermentative efficiency and ethanol tolerance of *Kloeckera africana* during the fermentation of *Agave tequilana* juice by addition of yeast extract. *J. Sci. Food Agric.* 90: 321-328.
- Dong, S., Yi, C, Li, H. 2015. Changes of *Saccharomyces cerevisiae* cell membrane components and promotion to ethanol tolerance during bioethanol fermentation. *Cell Biol.* 69:196-203.
- du Plessis, H., Dicks, L., Pretorius, I., Labrechts, M., du Toit, M. 2004. Identification of lactic acid bacteria isolated from South African brandy base wine. *Int. J. Food. Microbiol.* 91: 19-29.
- du Plessis, H., Steger, C., du Toit, M., Lambrechts, M. 2002. The occurrence of malolactic fermentation in brandy base wine and its influence on brandy quality. *J. Appl. Microbiol.* 92: 1005-1013.
- Duarte, W., de Sousa, M., Dias, D., Schwan, R. 2011. Effect of co-inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus fermentum* on the quality of distilled sugar cane beverage Cachaca. *J. Food Sci.* 76(9): 1307-1318.
- Ercolini D., Moschetti, G., Blaiotta, G., Coppola, S. 2001. The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses. *Syst. Appl. Microbiol.* 24: 610-617.
- Escalante-Minakata, P., Blaschek, H., Barba de la Rosa, A., Santos, L., De León-Rodríguez, A. 2008. Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of *Agave salmiana*. *Lett. Appl. Microbiol.* 46:626-630.
- Fernández-Espinar, M., Martorell, P., de Llanos, R., Querol, A. 2006. Molecular methods to identify and characterize yeasts in foods and beverages. In: *Yeasts in food and beverages*. Querol, A., Fleet, G. (Eds.). Springer. Berlin, Germany.
- Ferreira, W., Cunha, J., Freitas, R., 2013. The effects of co-culturing non-*Saccharomyces* yeasts with *S. cerevisiae* on the sugar cane spirit (cachaça) fermentation process. *Antonie van Leeuwenhoek.* 103: 175-194.
- Fink, G., Ann, C., 1972. Curing of a *Killer* factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69: 2846-2849.
- Fiore, C., Arrizón, J., Gschaedler, A., Flores, J., Romano, P. 2005. Comparison between yeast from grape and agave musts for traits of technological interest. *World J. Microbiol. Biotech.* 21: 1141-1147.
- Fisher, M., Triplett, E. 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 65(10): 4630.
- Fleet, G. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol.* 86 (1-2):11-22.
- Freire, A., Ramos, C., Schwan, R. 2015. Microbiological and chemical parameters during cassava based-substrate fermentation using potential starter cultures of lactic acid bacteria and yeast. *Food Res. Int.* 79(3): 787-795.
- Fugelsang, K. and Edwards, C. 2007. *Wine microbiology: practical applications and procedures*. Second edition. Ed. Springer Science+Bussines, LLC. USA.
- Fusco, V., Quero, G., Gyu-Sung, C., Kabish, J., Meske, D., Neve, H., Bockelmann, W., Franz, C. 2015. The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Front Microbiol.* 6: 155.
- Gentry, T., Wickham, G., Shadt, C., He, Z., Zhou, J. 2006. Microarray applications in microbial ecology research. *Microbial. Ecol.* 52:159-175.
- Gerritsen, P., Rosales, J., Moreno, A, Martínez, L. 2010. *Agave azul y el desarrollo sustentable en la cuenca baja del río Ayuquila, costa sur de Jalisco (1994-2004)*. *Región y sociedad.* 23(51): 162-192.
- Gil-Vega, K., Díaz, C., Nava-Cedillo, A., Simpson, J. 2006. AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties. *Plant Science.* 170 (4): 904-909.
- Giraffa, G., Carminati, D. 2008. Molecular techniques in food fermentation: principles and application. In: *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods*. Cocolin, L., Ercolini, D. (Eds.). Springer. NY, USA.
- Gomes, F., Silva, C., Vianna, C., Inayara, C., Lacerda, A., Borelli, B., Nunes, Á., Franco, G., Mourao, M., Rosa, C. Identification of lactic acid bacteria associated with traditional cachaca fermentations. *Braz. J. Microbiol.* 41(2). DOI: 10.1590/S1517-83822010000200031
- González-Hernández, J., Pérez, E., Damián, R., Chávez-Parga, M. 2012. Isolation, molecular and fermentative characterization of a yeast used in ethanol production during mezcal elaboration. *Rev. Mex. Ing. Quim.* 11(3):389-400.

- Grace, K. 2010. 16S rRNA-based tag pyrosequencing of complex food and wastewater environments: microbial diversity and dynamics. M.S. dissertation. Texas A&M Univ., College Station.
- Hasnip, S., Crews, C., Potter, N., Christy, J., Chan, D., Condu, T., Matthews, W., Walters, B., Patel, K. 2007. Survey of ethyl carbamate in fermented food old in the United Kingdom in 2004. *Agricultural and Food Chemistry*. 55:250-259.
- Henríquez-Aedo, K., Durán, D., García, A., Hengst, M., Aranda, M. 2016. Identification of biogenic amine-producing lactic acid bacteria isolated from spontaneous malolactic fermentation of Chilean red wines. *Food Sci. Tech*. 68: 183-189.
- Hernández-Cortés, G., Córdova-López, J., Herrera-López, E., Morán-Marroquín, G., Valle-Rodríguez, J., Díaz-Montaño, D. 2010. Effect of pH, aeration and feeding non-sterilized agave juice in a continuous agave juice fermentation. *J. Sci. Food Agric*. 90:1423-1428.
- Huhe, Jiang C., Wu, Y., Cheng, Y. 2017. Bacterial and fungal communities and contribution of physicochemical factors during cattle farm waste composition. *Microbiol Open*. 6(6). doi:10.1002/mbo3.518
- Innocente, N., Biasutti, M., Rita, F., Bricchese, R., Comi, G., Iacumin, L. 2016. Effect of indigenous *Lactobacillus rhamnosus* isolated from bovine milk on microbiological characteristics and aromatic profile of traditional yogurt. *Food. Sci. Tech*. 66: 158-164.
- Jussier, D., Dubé, A., Mira de Orduña, R. 2006. Effect of simultaneous inoculation with yeast and bacteria on fermentation kinetics and key wine parameters of cool-climate Chardonnay. *Appl Environ Microbiol*. 72: 221-227.
- Kagkli, D., Vancanneyt, M., Hill, C., Vandamme, P., Cogan, T. 2007. *Enterococcus* and *Lactobacillus* contamination of raw milk in a farm dairy environment. *Int. J. Food Microbiol*. 114(2): 243-251.
- König, H. and Fröhlich, J. 2009 Lactic acid bacteria. In: *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (Eds.). Springer. Berlin. Germany.
- Lachance, M. 1995. Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*. 68:151-160.
- Lachenmeier, D., Sohnius, E., Attig, R., López, M., 2006. Quantification of selected volatile constituents and anions in Mexican *Agave* spirits (Tequila, Mezcal, Sotol, Bacanora). *J. Agric. Food. Chem*. 54: 3911-3915.
- Lachenmeier, D., Kanteres, F., Kubulla, T., López, M., Rehm, J. 2009. Ethyl carbamate in alcoholic beverages from Mexico (Tequila, Mezcal, Bacanora, Sotol) and Guatemala (Cuxa): market survey and risk assessment. *Int J Environ Res Public Health*. 6(1): 349-360.
- Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizón-Gaviño, J., Herrera-Suaréz, T., García-Mendoza, A., Gschaedler-Mathis, A. 2008. Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled *Agave* beverages. *FEMS Yeast Res*. 8(7): 1037-1052.
- Lefeber, T., Janssens, M., Moens, F., Gobert, W., De Vuyst, L. 2011. Interesting starter culture strains for controlled cocoa bean fermentation revealed by simulated cocoa pulp fermentation of cocoa-specific lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*. 77(18): 6694-6698.
- Leis, S., Spindler, J., Reiter, J., Breinig, F., Schmitt, M. 2005. *Microbial protein toxins*. Schmitt, M., Schaffrath, R. (Eds.). Springer. Berlin, Germany.
- Leroy, F., De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food. Sci. Tech*. 15: 67-78.
- Ley de-Coss, A., Arce-Espino, C., Cobos-Peralta, M., Hernández-Sánchez, D., Pinto-Ruiz, R. 2013. Estudio comparativo entre la cepa de *Pediococcus acidilactici* aislada del rumen de borregos y un consorcio de bacterias ruminales. *Agrociencia*. 47: 567-578.
- Lino, T., Suzuki, R., Kosako, Y., Ohkuma, M., Komagata, K., Uchimura, T. 2012. *Acetobacter okinawensis* sp. nov., *Acetobacter papayae* sp. nov., and *Acetobacter persicus* sp. nov.; novel acetic acid bacteria isolated from stems of sugarcane, fruits, and a flower in Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol*. 58(3): 235-243.
- López-Álvarez, A., Díaz-Pérez, A., Sosa-Aguirre, C., Macías-Rodríguez, L., Campos-García, J. 2012. Ethanol yield and volatile compound content in fermentation of agave must by *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 comparing with *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast used in tequila production. *J. Biosci. Bioeng*. 113(5):614-618.
- Lozupone, C., Hamady, M., Kelley, S., Knight, R. 2007. Quantitative and qualitative β diversity measures lead to differentiate insights into factors that structure microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 73(5): 1576-1585.
- Macías, A. 2001. El clúster en la industria del tequila en Jalisco, México. *Agroalimentaria*. 7(13): 57-72.
- Mamlouk, D., Gullo, M. 2013. Acetic acid bacteria: Physiology and carbon sources oxidation. *Indian J Microbiol*. 53 (4): 377-384.

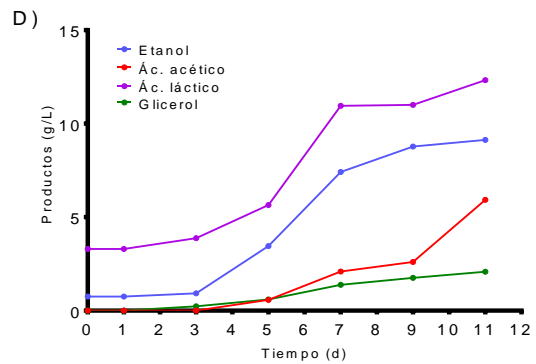
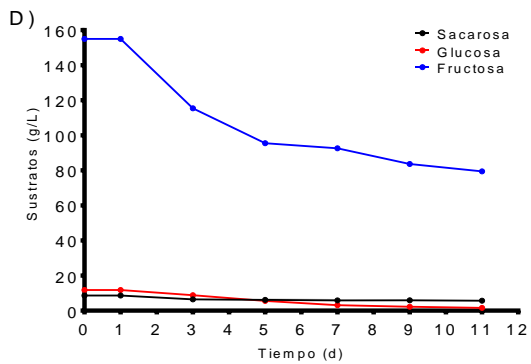
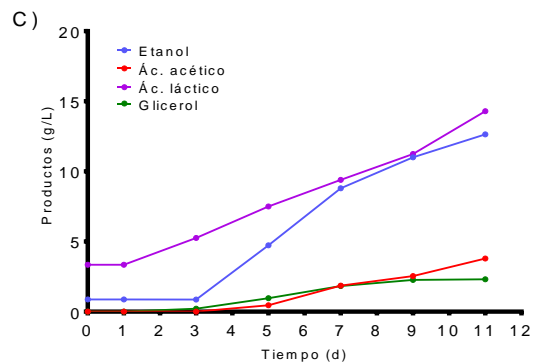
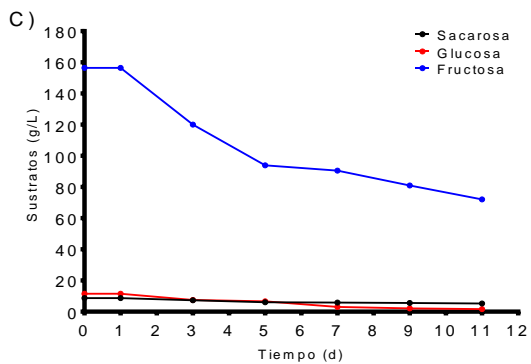
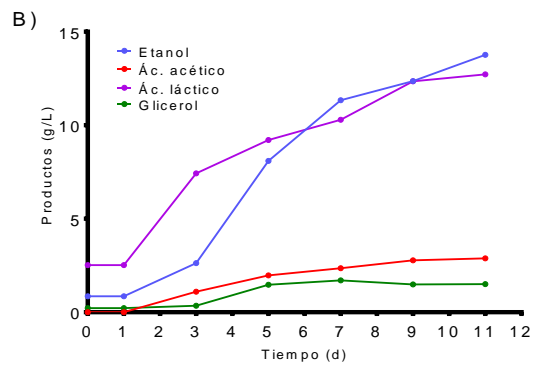
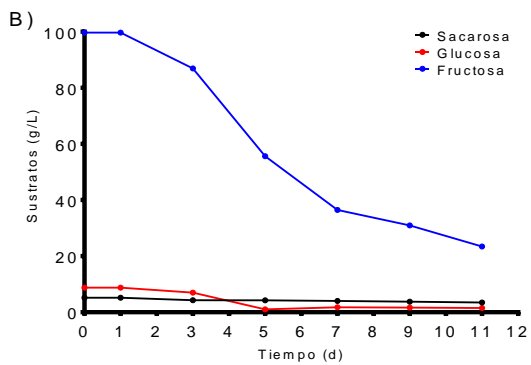
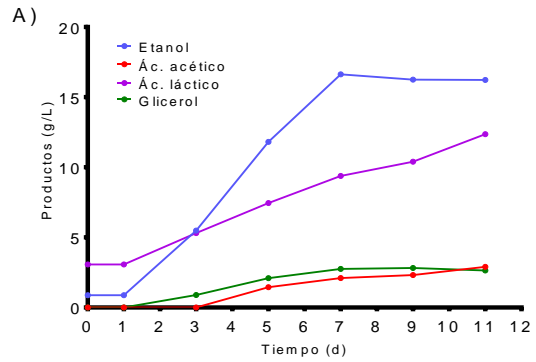
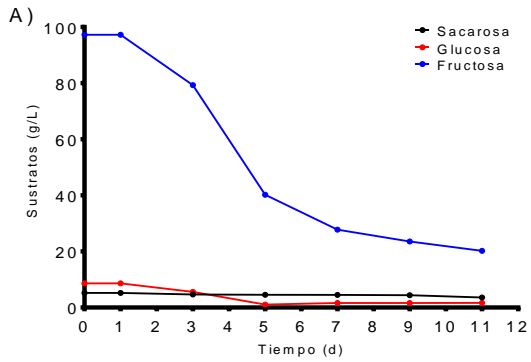
- Mancilla-Margalli, N., López, M. 2002. Generation of Maillard compounds from inulin during the thermal processing of *Agave tequilana* Weber val. Azul. *J Agri Food Chem.* 50:806-812.
- Martínez-Gándara, A. 2008. Tequila, mezcal and beer: from México to the world. *Agric soc desarro.* 5(2): 143-150.
- Mchiouer, M., Bennani, S., Meziane, M. 2017. Microbial interactions between *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus Thermophilus* in milk. *J Mat Environ Sci.* 8(4): 1460-1468.
- Meersman, E., Steensels, J., Paulus, T., Struyf, N., Saels, V., Mathawan, M., Koffi, J., Vrancken, G., Verstrepen, K. 2015. Breeding strategy to generate robust yeast starter cultures for cocoa pulp fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 81 (18): 6166-6176.
- Mills, D., Johannsen, E., Cocolin, L. 2002. Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(10): 4884-4893.
- Mills, D., Phister, T., Neeley, E., Johannsen, E. 2008. Wine fermentation. In: *Molecular techniques in microbial ecology of fermented foods.* Cocolin, L., Ercolini, D. (Eds.). Springer. NY, USA.
- Molina, A., Swiegers, J., Varela, C., Pretorius, I., Agosin, E. 2007. Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Appl. Environ. Biotech.* 77: 675-687.
- Morán-Marroquín, G., Córdova, J., Valle-Rodríguez, J., Estarrón-Espinosa, M., Díaz-Montañón, D. 2011. Effect of dilution rate and nutrients addition on the fermentative capability and synthesis of aromatic compounds of two indigenous strains of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous cultures fed with *Agave tequilana* juice. *Int. J. Food Microbiol.* 151:87-92.
- Moroni, A., Arendt, E., Dal Bello, F. 2011. Biodiversity of lactic acid bacteria and yeasts in spontaneously-fermented buckwheat and teff sourdoughs. *Food Microbiol.* 28(3): 497-502.
- Muñoz, D., Wrobel, K., Wrobel, K. 2005. Determination of aldehydes in tequila by high-performance liquid chromatography with 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization. *Eur. Food Res. Technol.* 221: 798-802.
- Muthaiyan, A., Limayem, A., Ricke, S. 2011. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. *Progress in Energy and Combustion science.* 37: 351-370.
- Muyzer, G., Dewaal, E., Uitterlinden A. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S ribosomal RNA. *Appl Environ Microbiol.* 59: 695-700.
- Narendranath, N., Thomas, K., Ingledew, W. 2001. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *J Ind. Microbiol. Biotech.* 26: 171-177.
- Narváez-Zapata, J., Rojas-Herrera, R., Rodríguez-Luna, I., Larralde-Corona, C. 2010. Culture-independent analysis of lactic acid bacteria diversity associated with mezcal fermentation. *Curr. Microbiol.* 61: 444-450.
- Navarrete-Bolaños, J. 2012. Improving traditional fermented beverages: How to evolve from spontaneous to direct fermentation. *Eng. Life Sci.* 12(4):410.
- Oliva, A., Taillandier, P., Reséndez, D., Narváez, J., Larralde, C. 2013. The effect of hexose ratios on metabolite production in *Saccharomyces cerevisiae* strains obtained from the spontaneous fermentation of mezcal. *Antonie van Leeuwenhoek.* 103:833-843.
- Omar, N., Ampe, F. 2000. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Appl. Environ, Microbiol.* 66(9): 3664-3673.
- Ough, C., Huang, Z., Stevens, D. 1991. Amino acid uptake by four commercial yeasts at two different temperatures of growth and fermentation: effects on urea excretion and reabsorption. *American J Enol Viticult.* 42 (1): 26-40.
- Ouoba, L., Jando, C., Parkouda, C., Sawadogo-Lingani, H., Diawara, B., Sutherland, J. 2012. The microbiology of Bandji, palm wine of Borassus afeassi from Burkina Faso: identification and genotypic diversity of yeasts, lactic acid and acetic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 113(6): 1428-1441.
- Peixoto, R., Da Costa, H., Rumjanek, N., Macrae, A., Rosado A. 2002. Use of rpoB and 16S rRNA genes to analyse bacteria diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Lett Appl. Microbiol.* 35(4): 316-320.
- Peña-Álvarez, A., Capella, S., Juárez, R., Labastida, C. 2006. Determination of terpenes in tequila by solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatography A.* 1134: 291-297.
- Pieczynska, M., Arja, J., de Visser, G., Korona, R., 2013. Incidence of symbiotic dsRNA 'killer' viruses in wild and domesticated yeast. *FEMS yeast research.* Vol. 13 (8): 856-859.
- Pinal, L., Cedeño, M., Gutiérrez, H., Alvarez-Jacobs, J. 1997. Fermentation parameters influencing higher alcohol production in the tequila process. *Biotechn. Lett.* 19(1):45-47.
- Pinal, L., Cornejo, E., Arellano, M., Herrera, E., Nuñez, L., Arrizón, J., Gschaedler, A. 2009. Effect of *Agave tequilana* age, cultivation field location and yeast strain on tequila fermentation process. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* 36:655-661.

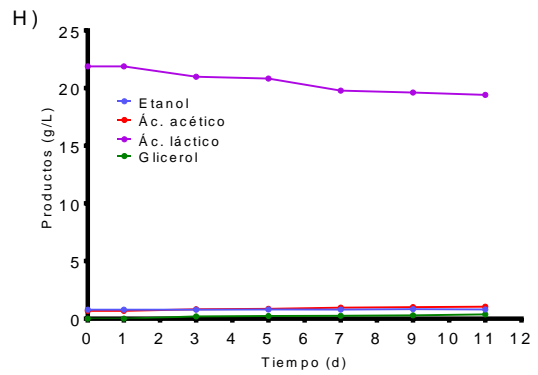
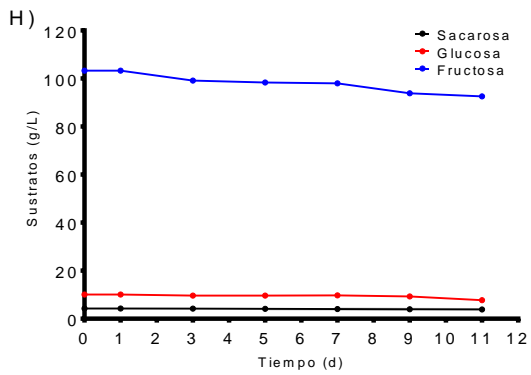
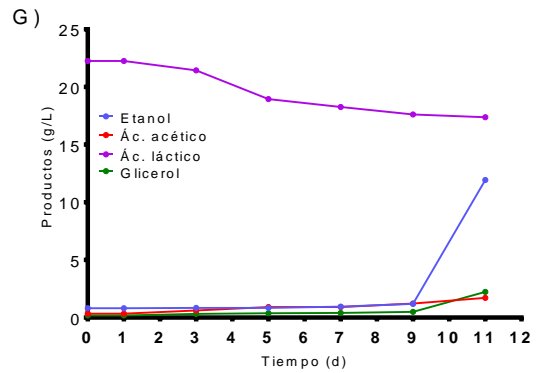
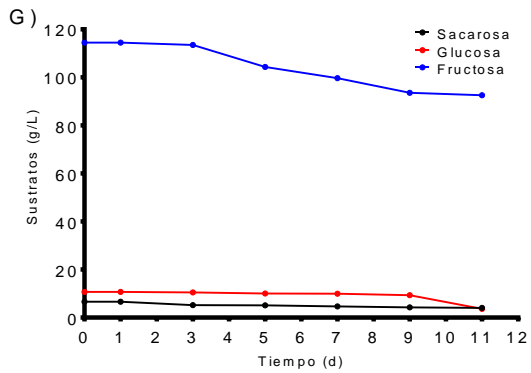
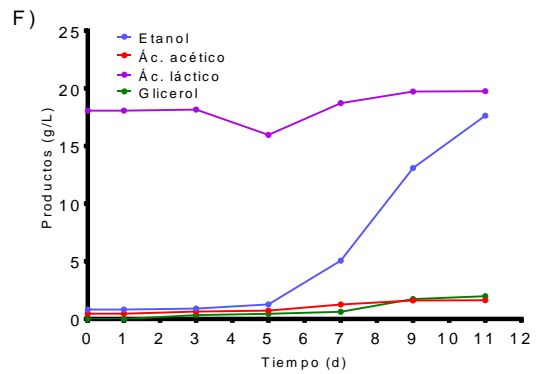
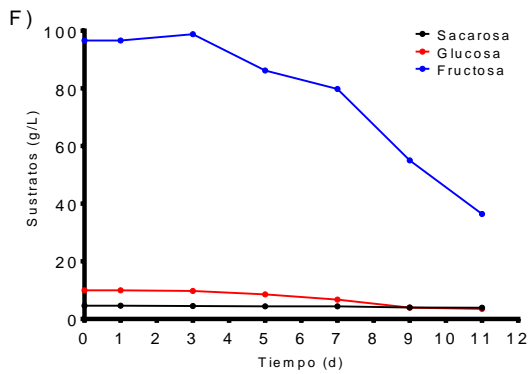
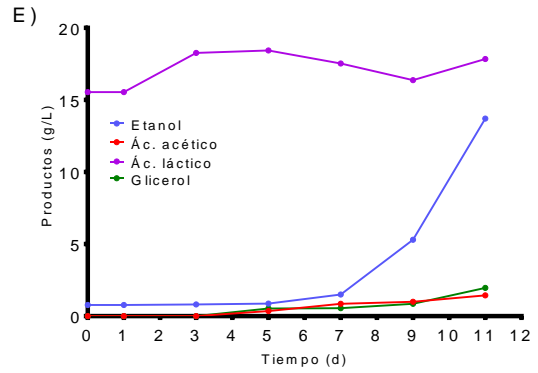
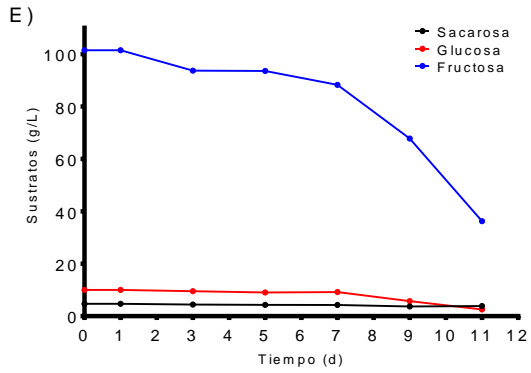
- Plessas, S., Bosnea, L., Psarianos, C., Koutinas, A., Marchant, R., Banat, I., 2008. Lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. *Biores. Tech.* 99(13): 5951-5955.
- Pratt, P., Bryce, J., Stewart, G. 2012. The effects of osmotic pressure and ethanol on yeast viability and morphology. *J Ins Brew.* 109(3): 218-228.
- Pretorius, I. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast.* 16:675-729.
- Pretorius, I. 2003. The genetic analysis and tailoring of wine yeasts. In: *Functional genetics of industrial yeasts.* De Wiende., J. Topics in current genetics. Ed. 2. 99-130.
- Rainieri, S., Pretorius, I. 2000. Selection and improvement of wine yeasts. *Annals of Microbiology.* 50:15-31.
- Randazzo, C., Heilig, H., Restuccia, C., Fiudici, P., Caggia, C. 2005. Bacterial population in traditional sourdough evaluated by molecular methods. *J. Appl. Microbiol.* 99(2): 251-258.
- Reichenbach, H. 2015. *Cystobacter*. In: *Bergey's Manual of systemics of Archea and Bacteria.* John Wiley & Sons. DOI: 10.1002/9781118960608.gbm01046
- Reid, S. and Abratt, V. 2005. Sucrose utilisation in bacteria: genetic organisation and regulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 312-321.
- Rezaei, M., Dornez, E., Jacobs, P., Parsi, A., Verstrepen, K., Courtin, C. 2014. Harvesting yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) at different physiological phases significantly affects its functionality in bread dough fermentation. *Food Microbiol.* 39: 108-115.
- Roos, S., Karner, F., Axelsson, L., Jonsson, H. 2000. *Lactobacillus mucosae* sp. nov., a new species with in vitro mucus-binding activity isolated from pig intestine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 251-258.
- Sakamoto, N., Tanaka, S., Sonomoto, K., Nakayama, J. 2011. 16S rRNA pyrosequencing-based investigation of the bacterial community in nukadoko, a pickling bed of fermented rice bran. *Int. J. Food. Microbiol.* 144(3): 352-359.
- Santiago-Urbina, J., Arias-García, J., Ruiz-Terán, F. 2015. Yeast species associated with spontaneous fermentation of taberna, a traditional palm wine from the southeast of Mexico. *Ann. Microbiol.* 65(1): 287-296.
- Schmitt, M., São-José, C., Santos, M. 2009. Phages of yeast and bacteria. In: *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine.* König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (Eds.). Springer. Berlin, Germany.
- Schütte, U., Abdo, Z., Bent, S., Shyu, C., Williams, C., Pierson, J., Forney, L. 2008. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Appl Microbiol Biotechnol.* 80:365-380.
- SECOFI. 2012. NOM-006. Bebidas alcohólicas. Tequila. Especificaciones. Diario Oficial de la Federación. 24 de mayo de 2012. México.
- Shale, K., Mukamugema, J., Lest, R., Venter, P., De Smidt, O. 2012. Microbiota associated with commercially produced traditional banana beer in Rwanda. *Sci. Res. Essays*
- Sharma, A., Nath, P., Sawant, S. 2011. Evaluation of fermentation efficiency of yeast strains and their effect on quality of young wines. *Indian J. Microbiol.* 52(3): 495-499.
- Sogin, M., Morrison, H., Huber, J., Welch, D., Huse, S., Neal, P., Arrieta, J., Herndl, G. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(2): 12115-12120.
- Soto-García, E., Rutiaga-Quñones, M., López-Miranda, J., Montoya-Ayón, L., Soto-Cruz, O. 2009. Effect of fermentation temperatura and must processing on process productivity and product quality in mescal fermentation. *Food control.* 20: 307-309.
- Soto-Muñoz, L., Teixidó, N., Usall, J., Viñas, I., Torres, R. 2014. Detection and quantification by PCR assay of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 on apples. *Int. J. Food Microbiol.* 175: 45-52.
- Souza, E., Bolini, H., Marquez, E., Rocha, E., Serra, G., 2005. The influence of different yeasts on the fermentation composition and sensory quality of cachaça. *World J Microbiol Biotech.* 21: 707-715.
- Terán, S. U., Santiago, R. L., Vera, G.A.M., Bautista, P.B., López, P. M., & Santiago, G. P. 2002. Estudio Comparativo de la fermentación natural e inducida del mosto de agave (*A. angustifolia* Haw) en la elaboración tradicional del mezcal. II Foro de la Agroindustria del mezcal, Xoxocotlán Oax., México.
- Tofalo, R., Chaves-López, C., Di Fabio, F., Schirone, M., Felis, G., Torriani, S., Paparella, A., Suzzi, G. 2009. Molecular identification and osmotoleran profile of wine yeast that ferment a high sugar grape must. *Int J Food Microbiol.* 130: 179-187.
- Tzun-Wen, G., Pao, Y., Wang, D. 2016. MetaMis: a metagenomics microbial interaction simulator based on microbial community profiles. *BMC Bioinformatics.* 17:488.
- Uthurry, C., Suárez, J., Lombardero, J., García, J. 2006. Ethyl carbamate production by selected yeasts and lactic acid bacteria in red wine. *Food Chemistry.* 94:262-270.

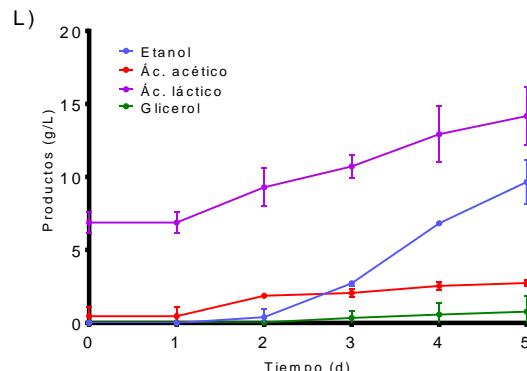
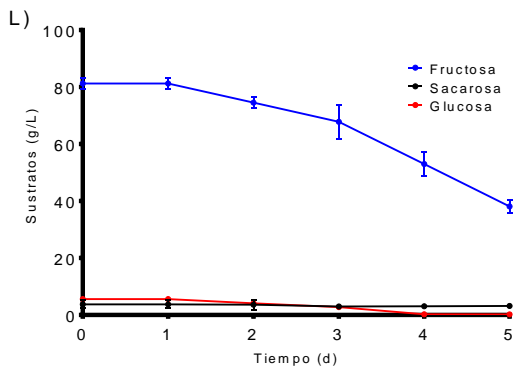
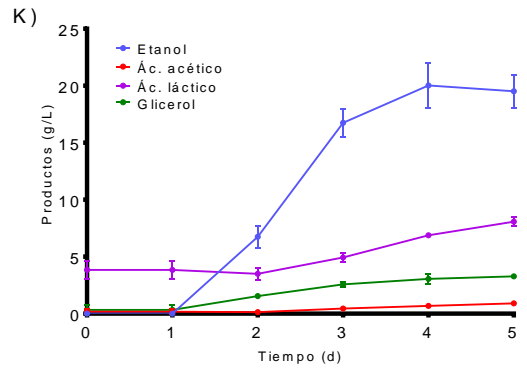
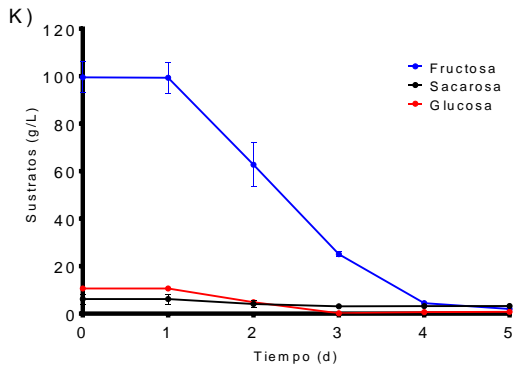
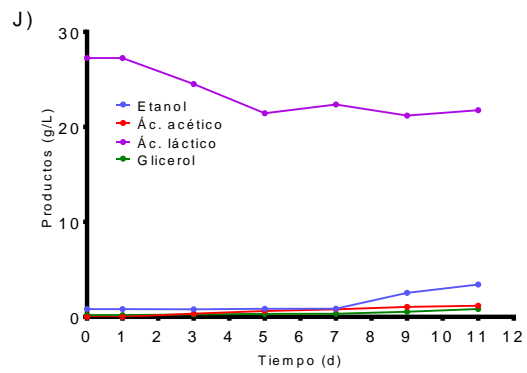
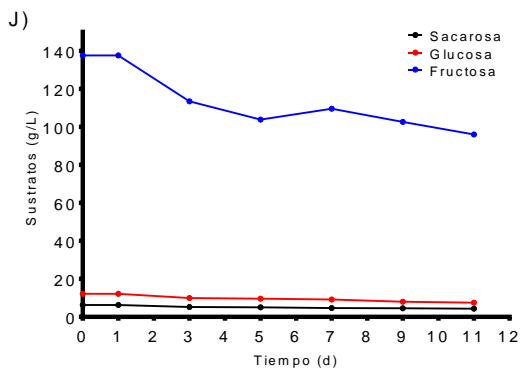
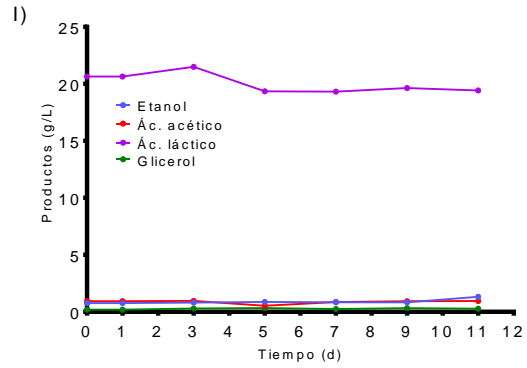
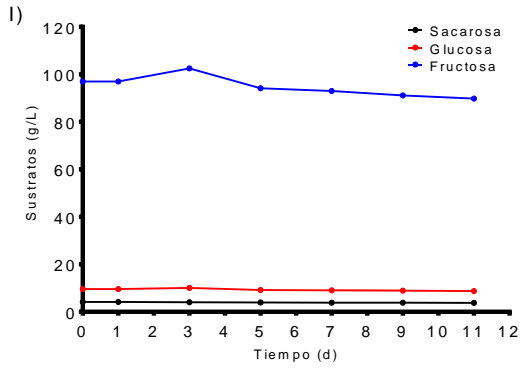
- Van Beek, S. and Priest, F. 2002. Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whiskey fermentation: a polyphasic study. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(1): 297-305.
- Verdugo, A., Segura, L., Kirchmayr, M., Ramírez, P., González, A., Coria, R., Gschaedler, A. 2011. Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from *Agave salmiana*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 100: 497-506.
- Waleckx, E., Gschaedler, A., Colonna-Ceccaldi, B., Monsan, P. 2008. Hydrolysis of fructanos from *Agave tequilana* Weber var. azul during the cooking step in a traditional tequila elaboration process. *Food Chem.* 108:40-48.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., White, T., editores. *PCR protocols: a guide to methods and applications.* New York, USA. Academic Press Inc. pp315-322.
- Xia, Q., Yang, C., Wu, C., Zhou, R., Li, Y. 2018. Quantitative strategies for detecting different levels of ethyl carbamate (EC) in various fermented food matrices: An overview. *Food Control.* 84. 499-512.
- Ye, N., Lü, F., Shao, L., Godon, J., He, P. 2007. Bacterial community dynamics and product distribution during pH-adjusted fermentation of vegetable wastes. *J. Appl. Microbiol.* 103(4): 1055-1065.
- Yetiman, A., Kesmen, Z., 2015. Identification of acetic acid bacteria in traditionally produced vinegar and mother of vinegar by using different molecular techniques. *Int. J. Food. Microbiol.* 204(2): 9-16.
- Yuliana, N., Garcia, V. 2009. Influence of *Pediococcus acidilactici* as a starter on the flavour of tempoyak (fermented durian). *Indian J Biotech.* 8: 304-310.
- Zacharof, M., Lovitt, R. 2012. Bactericins produced by lactic acid bacteria a Review article. *APCBEE Procedia.* 2: 50-56.
- Zhao, X., Du, G., Zou, H., Fu, J., Zhou, J., Chen, J. 2013. Progress in preventing the accumulation of ethyl carbamate in alcoholic beverages. *Trends Food Sci Technol.* 32: 97-107.
- Zoecklein, B., Fugelsang, K., Gump, B., Nury, F. 1999. Volatile acidity. En: Zoecklein, B., Fugelsang, K., Gump, B., Nury, F. *Wine analysis and production.* Springer science+Business media. New York. pp 192-198.

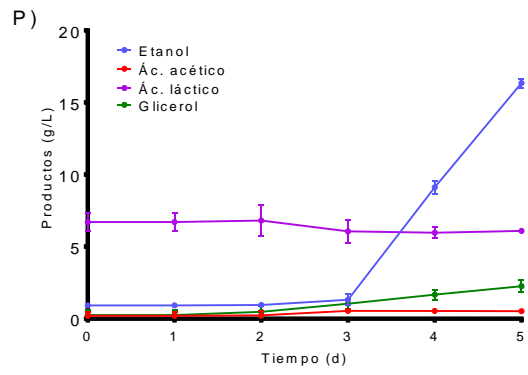
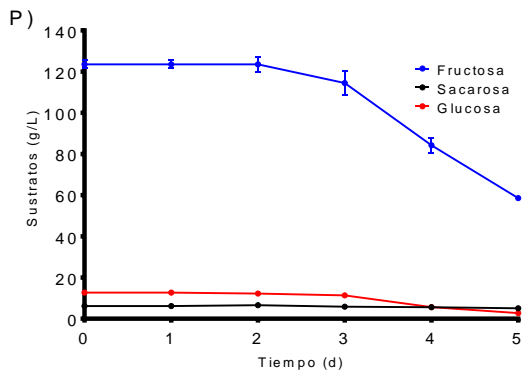
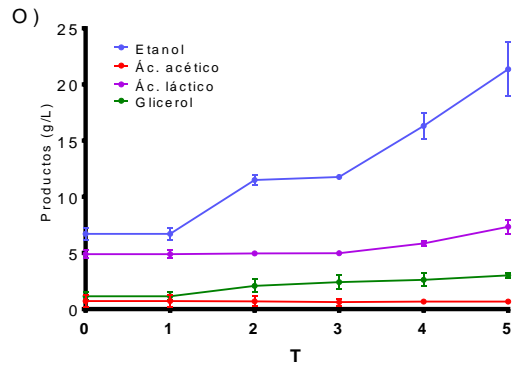
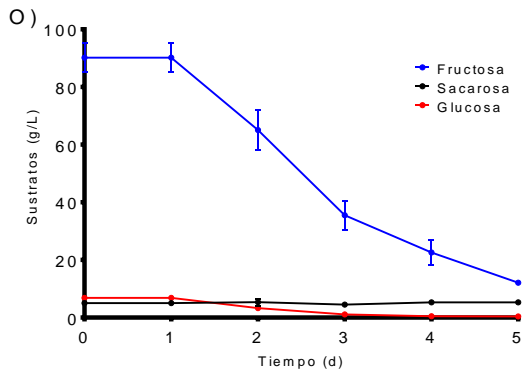
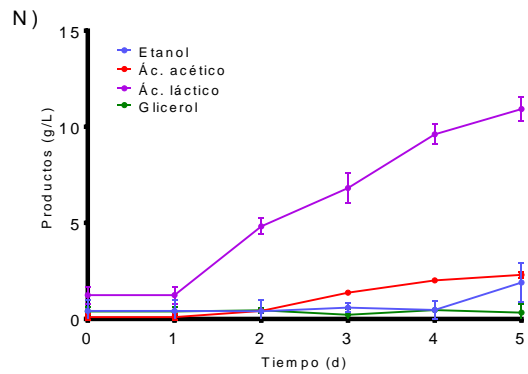
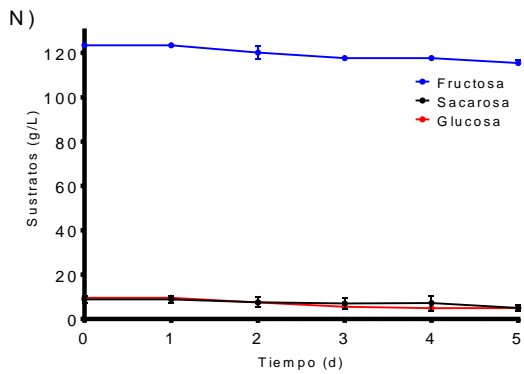
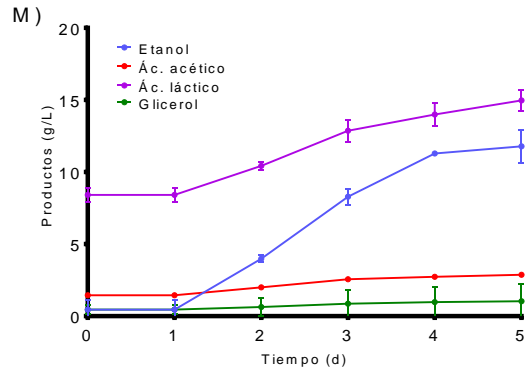
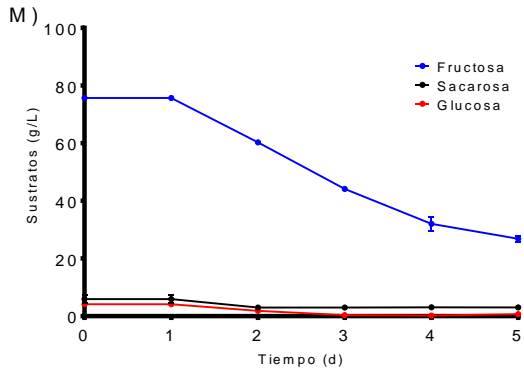
VII. ANEXOS

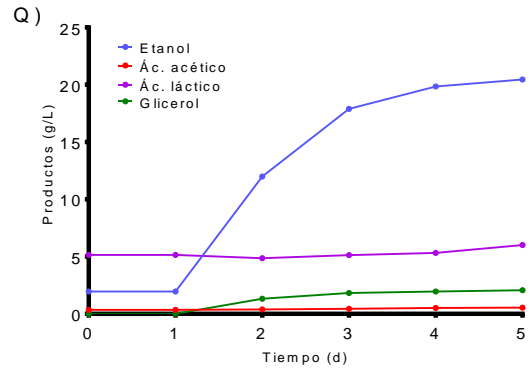
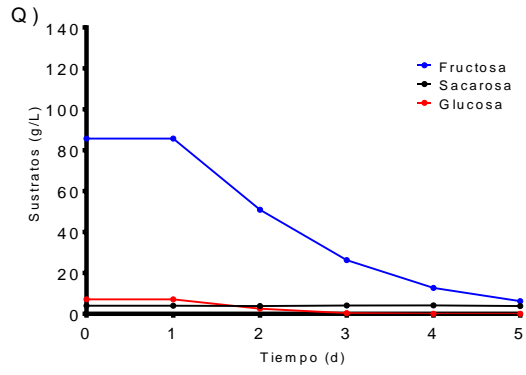
Anexo 1. Dinámica de metabolitos durante las fermentaciones de jugo de agave.



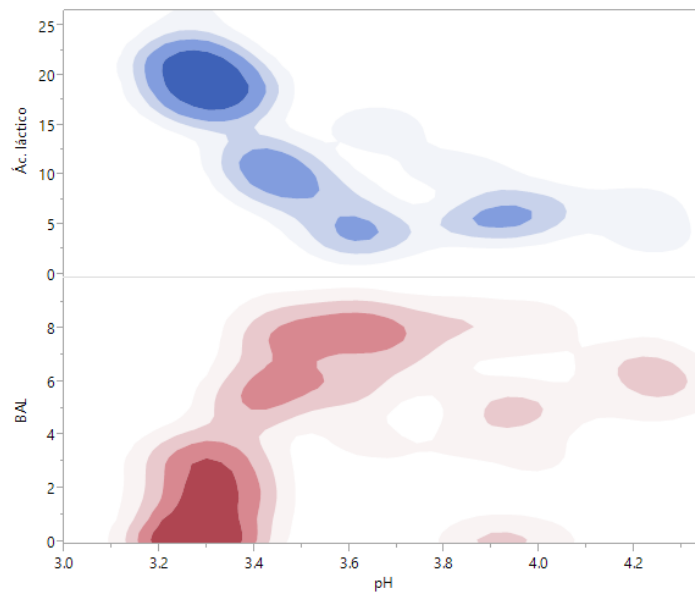








Anexo 2. Regiones de densidad de datos de los recuentos de BAL y concentración de ácido láctico respecto al pH.



Anexo 3. Número de aislamientos de las especies de levaduras durante la fermentación de jugo de agave.

Fermentación	<i>S. cerevisiae</i>	<i>K. marxianus</i>	<i>P. kudriavzevii</i>
A	11		
B	6		
C	33		
D	8		
E	28		
F	21		
G	22		
H	25		
I	31		
J	25		
K	19	10	1
L	28	4	1
M	34	9	2
N	15		7
O	13		13
P	28		7
Q	13		

Anexo 4. Número de cepas tolerantes a pruebas fenotípicas por especie

Especies	Tolerancia		
	Fructosa 20%	Etanol 10%	Ambas
<i>K. marxianus</i>	20	5	5
<i>P. kudriavzevii</i>	30	4	4
<i>S. cerevisiae</i>	354	80	80