

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



**LEVADURAS FRUCTOFÍLICAS DEL MEZCAL: APLICACIÓN COMO
CULTIVO INICIADOR PARA EL USO EN LA INDUSTRIA DE BEBIDAS
ALCOHÓLICAS**

TESIS DE
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA
QUE PRESENTA:

FRANCISCO JAVIER DE LA TORRE GONZÁLEZ

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



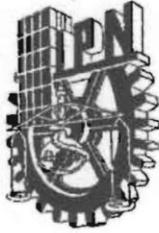
**LEVADURAS FRUCTOFÍLICAS DEL MEZCAL: APLICACIÓN COMO
CULTIVO INICIADOR PARA EL USO EN LA INDUSTRIA DE BEBIDAS
ALCOHÓLICAS**

TESIS DE
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA
QUE PRESENTA:

FRANCISCO JAVIER DE LA TORRE GONZÁLEZ

Reynosa, Tamaulipas

Diciembre del 2015



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

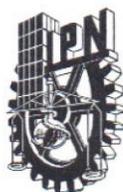
CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Reynosa, Tamaulipas el día 24 del mes de Noviembre del año 2015, el que suscribe **Francisco Javier De la Torre González** alumno del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología con número de registro A110586, adscrito al Centro de Biotecnología Genómica, manifiesto que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Claudia Patricia Larralde Corona y el Dr. Víctor Eric López y López y cede los derechos del trabajo titulado **LEVADURAS FRUCTOFÍLICAS DEL MEZCAL: APLICACIÓN COMO CULTIVO INICIADOR PARA EL USO EN LA INDUSTRIA DE BEBIDAS ALCOHOLICAS**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del (de la) autor(a) y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **plarralde@ipn.mx**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Francisco Javier De la Torre González

Nombre y firma del alumno



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. siendo las 12:00 horas del día 01 del mes de Diciembre del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CBG para examinar la tesis titulada:

"Levaduras fructoflícas del mezcal: Aplicación como cultivo iniciador para el uso en la industria de bebidas alcohólicas".

Presentada por el alumno:

De la Torre
Apellido paterno

González
Apellido materno

Francisco Javier
Nombre(s)

Con registro:

A	1	1	0	5	8	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

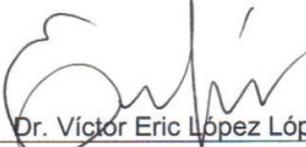
Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


Dra. Claudia Patricia Larralde Corona


Dr. Víctor Eric López López


Dr. José Alberto Narváez Zapata


Dra. Ana María Sifuentes Rincón


Dr. Raymundo Rosas Quijano

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Miguel Ángel Reyes López



El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Industrial del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de los doctores Claudia Patricia Larralde Corona (CBG) y Víctor Eric López y López (CIBA) en el marco de la Red de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional, y a través de una estancia internacional en el Laboratoire de Genie Chimique (ENSIACET, INP-Toulouse, Francia) bajo la asesoría de la Dra. Patricia Taillander. El trabajo experimental y estancia fue financiado por los proyectos SIP2015-1149 Instituto Politécnico Nacional y proyecto CONACy Ciencia Básica 2013-01-221289.

AGRADECIMIENTOS

Inicialmente a Dios por darme el tiempo y licencia de alcanzar este logro y con ello dar cumplimiento a una más de mis metas profesionales. A mi familia entera quien aun en la distancia me ha sabido comprender y apoyar para mantenerme fuerte y recio en esta etapa de mi vida estudiantil o profesional.

Es también de agradecer a la Dra. Patricia Larralde Corona quien creyó en mí y por estar al pendiente de la realización de cada etapa durante la elaboración de este trabajo que de esta manera concluye. De igual forma al Dr. Victor Eric Lopez y Lopez por sus consejos y criticas constructivas durante todo el proceso de este trabajo de tesis.

A mi comité revisor de tesis la Dra. Ana María Sifuentes, el Dr. José Alberto Narváez Zapata, y Dr. Raymundo Rosas Quijano por sus críticas constructivas, apoyo, e ideas que hicieron posible la culminación de este trabajo.

Al Dr. Pedro Vazquez Landaverde por la ayuda, apoyo así como sus explicaciones para la comprensión de datos durante mi estancia y procesado de muestras en el laboratorio a su cargo en el CICATA-Queretaro. A mi laboratorio de Biotecnología Industrial por su amistad, compañía y disponibilidad de tiempo de una manera tan amable que siempre tuve durante mi estancia en el CBG.

A mis compañeros de generaciones anteriores Saul y Erika por su amistad y apoyo durante el tiempo que coincidimos, consejos y por esa ultima advertencia "Quien toma un doctorado tiene de dos, o te vuelves loco o alcohólico...Tu decides".

Un agradecimiento al Laboratorio de Servicios especialmente al Dr. Víctor Moreno por facilitarme el HPLC y el secuenciador, con los que se logró obtener algunos de los resultados de mi trabajo, pero sobre todo por esa amistad y apoyo brindado. Y a cada una de las personas miembros de este plantel así como personal académico, administrativo y manual que me atendieron amablemente durante mi estancia en este plantel y que con ello permitieron una estancia más amena.

Se agradece el apoyo de Corning Science de México S.A. de C.V. a través de la M. en C. Laura P. Cholula Cordero por facilitarme la realización de las pruebas de fermentación en su sistema de minibioreactores de 50 mL con tapa perforada con membrana hidrofóbica.

Agradezco el apoyo económico de CONACyT tanto por la Beca de Estudios nacionales (CVU271981), como por la beca mixta otorgada para poder realizar una estancia con la Dra. Patricia Taillandier en el Laboratoire de Genie Chimique (ENSIACET, INP-Toulouse, Francia).

Agradezco finalmente el apoyo complementario PIFI (BEIFI) asociado a los proyectos SIP en los cuales participé en el Instituto Politécnico Nacional.

DEDICATORIA

A mis padres que siempre han estado conmigo en las buenas y en las malas por saber ser pacientes, responsables con mi persona y darme un buen ejemplo en su trayectoria profesional como en la vida misma, pero sobre todo por darme la vida, su amor así como su apoyo incondicional por eso y todo es que quiero agradecerles todo lo que me han dado con mis logros profesionales.

Dedico también este logro alcanzado a mi abuelo quien siempre creyó que nunca pararía hasta alcanzar lo que en la vida me he propuesto aunque con ello consiguiera el volverme loco. Aprovecho para dedicar también a mi abuela que se que desde donde se encuentre no ha dejado de cuidar de mi y toda la familia.

Gracias.

INDICE

INDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE CUADROS	V
RESUMEN	IX
ABSTRACT	X
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 La fermentación alcohólica	3
II.2 Mecanismos fisiológicos y moleculares de las levaduras en la fermentación alcohólica	7
<i>II.2.1 Respuesta fisiológica y molecular al estrés en levaduras</i>	<i>7</i>
<i>II.2.2 El estrés por altas concentraciones de etanol</i>	<i>11</i>
<i>II.2.3 El estrés osmótico</i>	<i>12</i>
<i>II.2.4 El estrés oxidativo</i>	<i>13</i>
<i>II.2.5 El estrés por las fuentes de carbono</i>	<i>15</i>
II.3 Producción de bebidas alcohólicas	19
<i>II.3.1 Bebidas elaboradas con jugos de frutas y de tallos</i>	<i>19</i>
II.3.1.1 La uva como sustrato del vino y el coñac.....	20
II.3.1.2 El coñac	22
II.3.1.3 La manzana como sustrato del calvados.....	24
<i>II.3.2 Bebidas elaboradas con caña de azúcar</i>	<i>25</i>
II.3.2.1 La melaza como sustrato del ron.....	26
II.3.2.2 El jugo de caña como sustrato de la cachaça.....	27
<i>II.3.3 El Agave spp como sustrato del pulque, mezcal, bacanora, raicilla y tequila</i>	<i>28</i>
II.3.3.1 El pulque	28
II.3.3.2 El mezcal	29
II.3.3.3 El bacanora y la raicilla.....	33
II.3.3.4 El tequila	34
II.4 Compuestos volátiles en bebidas alcohólicas fermentadas	35
<i>II.4.1 Alcoholes superiores</i>	<i>37</i>
<i>II.4.2 Ésteres</i>	<i>37</i>
<i>II.4.3 Acetaldehído</i>	<i>38</i>
<i>II.4.4 Metanol</i>	<i>38</i>
<i>II.4.5 Terpenos</i>	<i>39</i>
<i>II.4.6 Furanos</i>	<i>39</i>

II.5	La microbiología de las bebidas alcohólicas	49
II.5.1	<i>Sucesión poblacional microbiana durante la fermentación alcohólica.....</i>	<i>57</i>
II.6	Metodologías de estudio de las sucesiones microbianas	59
II.6.1	<i>Técnicas clásicas para el estudio de poblaciones microbianas.....</i>	<i>59</i>
II.6.2	<i>Técnicas moleculares para el estudio de poblaciones microbianas</i>	<i>60</i>
II.7	Inóculos (starter) en los procesos fermentativos de las bebidas alcohólicas	61
II.7.1	<i>Aplicación de levaduras como cultivo iniciador</i>	<i>64</i>
III.	JUSTIFICACIÓN.....	67
IV.	HIPÓTESIS	69
V.	OBJETIVOS.....	69
V.1	Objetivo general	69
V.2	Objetivos particulares.....	69
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	70
VI.1	Levaduras de estudio	70
VI.2	Identificación molecular	70
VI.2.1	<i>Extracción de ADN.....</i>	<i>70</i>
VI.2.2	<i>Amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 por PCR</i>	<i>71</i>
VI.2.3	<i>Amplificación de la región 26S por PCR.....</i>	<i>71</i>
VI.2.4	<i>Electroforesis en gel de agarosa.....</i>	<i>72</i>
VI.2.5	<i>Secuenciación de la región ITS y 26S.</i>	<i>73</i>
VI.3	Cuantificación de la viabilidad en microgotas	75
VI.4	Tolerancia al etanol	75
VI.5	Tolerancia a la fructosa	76
VI.6	Fermentaciones	76
VI.6.1	<i>Medios de cultivo.....</i>	<i>76</i>
VI.6.2	<i>Determinación de la productividad de levaduras por HPLC.</i>	<i>77</i>
VI.6.3	<i>Cuantificación de CO₂</i>	<i>78</i>
VI.6.4	<i>Cuantificación de biomasa de las levaduras.....</i>	<i>78</i>
VI.6.4.1	<i>Cuenta celular</i>	<i>78</i>
VI.6.4.2	<i>Diferenciación de especies en cultivo mixto.....</i>	<i>79</i>
VI.6.4.3	<i>Espectrometría.....</i>	<i>79</i>
VI.6.4.4	<i>Peso seco.....</i>	<i>79</i>
VI.6.5	<i>Determinación de nitrógeno</i>	<i>80</i>
VI.6.6	<i>Determinación de amonio</i>	<i>80</i>
VI.6.7	<i>Determinación de compuestos volátiles por GC.....</i>	<i>80</i>
VI.7	Análisis estadístico	80

VI.7.1	Análisis de varianza.....	80
VI.7.2	Análisis de Componentes Principales (ACP).....	81
VII.	RESULTADOS.....	82
VII.1	Identificación molecular de las levaduras	82
VII.2	Puesta a punto de la técnica de viabilidad en microgota	84
VII.3	Tolerancia al etanol	85
VII.3.1	Tolerancia al etanol en medio YPD.....	85
VII.3.2	Tolerancia al etanol en medio YPF	93
VII.4	Tolerancia al etanol de acuerdo a la hexosa presente	102
VII.5	Tolerancia al etanol en medio YPDF	104
VII.5.1	Tolerancia en medio YP con etanol como única fuente de carbono.....	104
VII.6	Tolerancia a altas concentraciones de fructosa	107
VII.7	Análisis global de la tolerancia al estrés para las cepas de <i>S. cerevisiae</i>	111
VII.8	Caracterización de las levaduras en medio sintético M3 y en jugo de uva	113
VII.8.1	Producción de metabolitos en medio sintético tipo uva (M3).....	113
VII.8.2	Caracterización de los compuestos volátiles en medio tipo uva M3.....	116
VII.8.3	Caracterización de metabolitos en jugo de uva	123
VII.8.4	Caracterización de las mezclas de levaduras en jugo de uva	129
VII.8.5	Caracterización de los compuestos volátiles en jugo de uva.....	136
VII.9	Caracterización de las levaduras en medio sintético de mosto (M2) y en mosto de Agave tequilana.....	143
VII.9.1	Caracterización de los compuestos volátiles en medio sintético tipo agave (M2).....	146
VII.9.2	Caracterización de las levaduras en mosto de agave	151
VII.9.3	Caracterización de los cultivos mixtos en mosto de agave.....	154
VII.9.4	Caracterización de los compuestos volátiles en mosto de agave	160
VIII.	DISCUSIÓN.....	167
VIII.1	Tolerancia al etanol	167
VIII.2	Tolerancia a la fructosa	168
VIII.3	Análisis global de la tolerancia al estrés en levaduras	169
VIII.4	Minifermentaciones.....	169
VIII.5	Caracterización de las levaduras en medio sintético tipo uva (M3)	170
VIII.5.1	Caracterización de los compuestos volátiles en medio sintético tipo uva (M3).....	170
VIII.6	Caracterización de las levaduras en jugo de uva	171
VIII.6.1	Caracterización de los compuestos volátiles en jugo de uva.....	172
VIII.7	Caracterización de las levaduras en medio sintético tipo agave (M2)	173
VIII.7.1	Caracterización de los compuestos volátiles en medio sintético tipo agave (M2).....	174

VIII.8	Caracterización de las levaduras en mosto de agave	174
<i>VIII.8.1</i>	<i>Caracterización de los compuestos volátiles en mosto de agave</i>	<i>176</i>
VIII.9	Propuesta de una metodología para la selección de un inculo (starter)	178
IX.	CONCLUSIONES	181
X.	PERSPECTIVAS	182
XI.	BIBLIOGRAFÍA	183
XII.	APÉNDICES	193
XII.1	APENDICE 1. Análisis estadísticos de la tolerancia al estrés por etanol y por fructosa del cepario de levaduras LBI-CBG	193
XII.2	APENDICE 2. Análisis estadísticos de la producción de metabolitos en el medio M3 y en jugo de uva	198
XII.3	APENDICE 3. Análisis estadísticos de la producción de metabolitos en el medio M2 y mosto de Agave tequilana	209
XIII.	PRODUCTIVIDAD	219
XIII.1	Estancias realizadas	219
XIII.2	Presentaciones en Congresos	219
XIII.3	Artículos publicados	220
XIII.4	Artículos en preparación	220

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Balance estequiométrico de la fermentación alcohólica.....	3
Figura 2. Esquema de las vías metabólicas del catabolismo de la glucosa, mostrando en ella las diferentes etapas que llevan a la producción de etanol, glicerol y biomasa como metabolitos primarios y en las elipses los metabolitos secundarios.	4
Figura 3. Esquema de la vía metabólica del piruvato que lleva a la producción de etanol.	6
Figura 4 Tinajas de fermentación de mostos de agave	31
Figura 5. Principio del proceso de interacción materia prima- microorganismo- compuesto volátil.	36
Figura 6. Principio del proceso de interacción materia prima- cultivo estándar- nuevo producto.	61
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de la extracción de ADN de las levaduras de estudio. En el carril 1 el marcador de 100 pb y en los carriles del 2 al 16 el ADN de las levaduras re-aisladas, en los carriles 17 y 18 los controles (-) y (+).	73
Figura 8. Amplificación de las regiones 26S e ITS de las levaduras de estudio. Marcador de peso molecular, muestras de levaduras, (+) control positivo, (-) control negativo.	74
Figura 9. Evaluación de la técnica gota en placa: A) volumen y la dilución necesaria para cuantificar con exactitud el número de unidades formadoras de colonias en una muestra conocida de cepa control Fermichamp crecida en medio YPD durante 18 h; B) Ejemplo del crecimiento de las colonias a las 72 h de incubación por algunos representantes de las 10 especies de levaduras diferentes aisladas de mezcal, creciendo en YPD y 8% v/v de etanol a una dilución 10^{-3} . Tomado de De la Torre-González et al. (2016)	84
Figura 10. Correlación lineal del conteo de células de la cepa de control de <i>S. cerevisiae</i> Fermichamp obtenido en el conteo diferencial de la placa completa y el conteo de gota en placa (circulo negro, línea continua, $R^2 = 0,945$) y el conteo en cámara de Neubauer (circulo blanco, línea punteada, $R^2 = 0.899$). Las desviaciones estándar se calcularon a partir de tres experimentos independientes. Tomado de De la Torre-González et al. (2016).....	85
Figura 11. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPD de todas las cepas <i>S. cerevisiae</i> del cepario de LBI-CBG.	87
Figura 12. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPD de las cepas <i>K. marxianus</i> del cepario de LBI-CBG.	88
Figura 13. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPD de las cepas <i>T. delbrueckii</i> del cepario de LBI-CBG.....	89
Figura 14. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPD de las cepas <i>Z. bailli</i> del cepario de LBI-CBG.....	89
Figura 15. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPD de las cepas <i>P. guillermondii</i> del cepario de LBI-CBG.	90

Figura 16. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPD de las cepas de la especie <i>P. kluyveri</i> (arriba), y <i>P. mexicana</i> (abajo) del cepario de LBI-CBG.....	91
Figura 17. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPD de la cepa <i>R. mucilaginosa</i> del cepario de LBI-CBG.....	91
Figura 18. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPD de las cepas de la especie <i>C. lusitaniae</i> (A) y <i>Candida</i> (B) del cepario de LBI-CBG.....	92
Figura 19. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPF de las cepas <i>S. cerevisiae</i> del cepario de LBI-CBG.....	95
Figura 20. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPF de las cepas <i>K. marxianus</i> del cepario de LBI-CBG.	96
Figura 21. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPF de las cepas <i>T. delbrueckii</i> del cepario de LBI-CBG.	97
Figura 22. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPF de la cepa <i>Z. bailli</i> del cepario de LBI-CBG.....	97
Figura 23. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPF de las cepas <i>P. guillermondii</i> del cepario de LBI-CBG.....	98
Figura 24. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPF de las cepas de la especie <i>P. kluyveri</i> (A), y <i>P. mexicana</i> (B) del cepario de LBI-CBG.....	99
Figura 25. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPF de la cepa <i>R. mucilaginosa</i> del cepario de LBI-CBG.	100
Figura 26. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPF de las cepas de la especie <i>C. lusitaniae</i> (A) y <i>Candida</i> (B) del cepario de LBI-CBG.....	101
Figura 27. Tolerancia a concentraciones crecientes de etanol mostrados por las cepas representativas de cada una de las especies encontradas en mezcal que crecen en la presencia de A) glucosa, o B) fructosa, ambos a una concentración de 20 g/L. Hubo una caída en la resistencia (subrayado por la flecha de puntos) para todas las especies cuando el etanol estaba por encima de 8% v/v y la fructosa era la fuente de carbono. Tomado de De la Torre-González et al. (2016).....	103
Figura 28. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YP (ausencia de hexosas) de las cepas <i>S. cerevisiae</i> del cepario de LBI-CBG.....	106
Figura 29. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de fructosa en YP de las cepas <i>S. cerevisiae</i> del cepario de LBI-CBG.....	108
Figura 30. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de fructosa en YP de las cepas de las diversas especies del cepario de LBI-CBG.	110
Figura 31. Análisis global tipo box plot de la tolerancia de las cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> del mezcal que comparan el crecimiento promedio alcanzado en medios sólidos en las siguientes condiciones: YPD normal (estrellas negras), YPD más etanol al 12% (puntos blancos), YPF, más 9% de etanol (puntos grises), YP más	

8% de etanol (puntos rayas) y YP más 500 g/L de fructosa sin etanol (puntos negros). Los valores que describen la distribución de cada grupo de tolerancia y el caso único se presentan en la parte superior derecha de la figura. Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces, se presentan valores promedio y la desviación estándar fue siempre menor que 10%. Tomado de De la Torre-González et al. (2016)	112
Figura 32. Cinética de la fermentación en mosto de vino sintético (M3) en minibiorreactores de 50 mL de 3 cepas de <i>Saccharomyces</i> : A) Fermichamp, B) Sc 3Y4 y C) Sc 3Y8, D) Sistema físico utilizado para las minifermentaciones mostrando el detalle de la tapa con los orificios de aireación.....	114
Figura 33. Analisis de los componentes principales (ACP) de la fermentación en medio M3 en mini biorreactores de 50 mL de las distintas cepas de <i>S. cerevisiae</i> analizadas.	122
Figura 34. Analisis de los componentes principales (ACP) de la fermentación en medio M3 en mini biorreactores de 50 mL de las distintas cepas de no- <i>Saccharomyces</i> analizadas. Los colores representan las diferentes especies analizadas.....	122
Figura 35. Cinética de la fermentación en jugo de uva roja en mini biorreactores de 50 mL de 4 cepas de <i>Saccharomyces</i> : A) Fermichamp, B) Sc3Y4, C) Sc3Y8 y D) Sc3Y3.....	124
Figura 36. Cinética de la fermentación en jugo de uva roja en mini biorreactores de 50 mL de 3 cepas de no- <i>Saccharomyces</i> : A) Km1Y9, B) Td1AN9 y C) Zb3Y1.....	126
Figura 37. Cinética de la fermentación en jugo de uva roja en mini biorreactores de 50 mL de las 3 mezclas: A) Sc3Y4-Td1AN9, B) Sc3Y8-Td1AN9 y C) Fermichamp-Td1AN9.	132
Figura 38. Viabilidad de la cinética de la fermentación en jugo de uva roja en mini biorreactores de 50 mL de las 3 mezclas: A) Sc3Y4-Td1AN9, B) Sc3Y8-Td1AN9 y C) Fermichamp-Td1AN9.	135
Figura 39. Analisis de los componentes principales (ACP) de la fermentación en jugo de uva roja en minibiorreactores de 50 mL de las distintas cepas de analizadas de manera individual. Los colores representan las diferentes especies analizadas.....	139
Figura 40. Analisis de los componentes principales (ACP) de la fermentación en jugo de uva rojo en minibiorreactores de 50 mL de las distintas mezclas de cepas de analizadas.....	142
Figura 41. Cinética de la fermentación en mosto de Agave sintético (medio M2) en minibiorreactores de 50 mL de 3 cepas de <i>Saccharomyces</i> : A) Sc3Y4, B) Sc3Y8 y C) Fermichamp.	144
Figura 42. Analisis de los componentes principales (ACP) de la fermentación en medio M2 en mini biorreactores de 50 mL de las distintas cepas de <i>S. cerevisiae</i> analizadas.	150
Figura 43. Analisis de los componentes principales (ACP) de la fermentación en medio M2 en mini biorreactores de 50 mL de las distintas cepas de no- <i>Saccharomyces</i> analizadas.....	151
Figura 44. Cinética de la fermentación en mosto de agave en minibiorreactores de 50 mL de las 3 mezclas: a) 3Y3-1AN9, b) 3Y4-1AN9 y c) 3Y8-1AN9. En línea punteada están aquellas mediciones para el eje secundario.....	157
Figura 45. Viabilidad de la cinética de la fermentación en mosto de agave en minibiorreactores de 50 mL de las 3 mezclas analizadas: A) Sc3Y3-Td1AN9, B) Sc3Y4-Td1AN9 y C) Sc3Y8 -Td1AN9.....	159

Figura 46. Analisis de los componentes principales (ACP) de la fermentación en mosto de agave en minibiorreactores de 50 mL de las distintas cepas analizadas.	162
Figura 47. Analisis de los componentes principales (ACP) de la fermentación en mosto de agave en minibiorreactores de 50 mL de las distintas mezclas de levaduras analizadas.....	166
Figura 48. Metodología de selección de levaduras para su empleo en la formulación de un inoculante para la elaboración de bebidas alcohólicas.	179

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro 1 Compuestos volátiles analizados en diversas bebidas alcoholicas.....	41
Cuadro 2 Producción máxima de etanol en el medio de mosto a las 60 horas de las especies: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Sc), <i>Kluyveromyces marxianus</i> (K.m), y <i>Torulaspora delbrueckii</i> (Td) del cepario de levaduras del mezcal LBI.....	52
Cuadro 3. Microorganismos encontrados en las diversas bebidas alcoholicas.	54
Cuadro 4. Criterio de selección para cepas de levaduras de uso comercial.....	65
Cuadro 5. Mezcla de reacción utilizada para la amplificación de la región ITS.....	71
Cuadro 6. Mezcla de reacción utilizada para la amplificación de la región 26S.....	72
Cuadro 7. Componentes de la reacción para la secuenciación de los fragmentos amplificados mediante el kit ABI PRISM® Big Dye® Terminator v3.1.....	74
Cuadro 8. Composición de medios de cultivo semi-definidos (g/L).....	77
Cuadro 9. Composición de jugos de uva pasteurizados y del mosto de agave (g/L).....	77
Cuadro 10. Levaduras de los mostos de mezcal añadidas al cepario LBI-CBG, identificadas por secuenciación de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 y 26S.....	83
Cuadro 11. Consumo de azúcares y producción de metabolitos primarios de todas las cepas a las 96 h de fermentación en medio M3, 200 g/L de azúcares iniciales (G/F=1:1).	115
Cuadro 12. Compuestos volátiles identificados en cepas nativas e industriales en el medio M3.....	118
Cuadro 13. Perfil de compuestos volátiles de todas las cepas a las 96 h de fermentación en medio M3, 200 g/L de azúcares iniciales (G/F=1:1).	119
Cuadro 14. Consumo de azúcares y producción de metabolitos primarios de todas las cepas a las 144 h de fermentación en jugo de uva roja, 248 g/L de azúcares iniciales (G/F=1:1).....	128
Cuadro 15. Rendimientos de las diferentes cepas analizadas a las 144 h de fermentación en jugo de uva roja, 248 g/L de azúcares iniciales (G/F=1:1).	128
Cuadro 16. Consumo de azúcares y producción de metabolitos primarios de todas las mezclas a las 144 h de fermentación en jugo de uva roja, 200 g/L de azúcares iniciales (G/F=1:1).....	131
Cuadro 17. Perfil de compuestos volátiles de las cepas seleccionadas a las 144 h de fermentación en jugo de uva roja.	137
Cuadro 18. Perfil de compuestos volátiles de las mezclas a las 144 h de fermentación en jugo de uva roja.	140
Cuadro 19. Perfil de compuestos volátiles de las mezclas de levaduras a las 144 h de fermentación en jugo de uva roja.	141
Cuadro 20. Consumo de azúcares y producción de metabolitos primarios de todas las cepas a las 48 h de fermentación en medio M2, 100 g/L de azúcares iniciales (G/F=1:9).	145

Cuadro 21. Perfil de compuestos volátiles de todas las cepas a las 96 h de fermentación en medio M2, 100 g/L de azúcares iniciales (G/F=1:9).....	148
Cuadro 22. Consumo de azúcares y producción de metabolitos primarios de todas las cepas a las 96 h de fermentación en mosto de <i>Agave tequilana</i> , 107 g/L de azúcares iniciales (G/F=1:9).....	153
Cuadro 23. Rendimientos de las diferentes cepas analizadas a las 96 h de fermentación en mosto de <i>Agave tequilana</i> , 107 g/L de azúcares iniciales (G/F=1:9).....	153
Cuadro 24. Consumo de azúcares y producción de metabolitos primarios de todas las mezclas a las 96 h de fermentación en mosto de <i>Agave tequilana</i> , 107 g/L de azúcares iniciales (G/F=1:1).....	156
Cuadro 25. Perfil de compuestos volátiles de las cepas seleccionadas a las 96 h de fermentación en mosto de agave.	161
Cuadro 26. Perfil de compuestos volátiles de las mezclas de levaduras a las 96 h de fermentación en mosto de agave.	163
Cuadro 27. Perfil de compuestos volátiles en mosto de agave durante las cinéticas de crecimiento de las mezclas de levaduras seleccionadas.	164
Cuadro 28. Análisis de varianza del crecimiento (en unidades logarítmicas) alcanzado por las cepas de <i>S. cerevisiae</i> (mas la cepa control Fermichamp) en medio agar YPD suplementado con 5, 8 o 15% de EtOH v/v.....	193
Cuadro 29. Análisis de varianza del crecimiento (en unidades logarítmicas) alcanzado por las cepas <i>S. cerevisiae</i> (mas la cepa control Fermichamp) en medio agar YPF suplementado con 5, 8 o 9% de EtOH v/v.....	194
Cuadro 30. Análisis de varianza del crecimiento (en unidades logarítmicas) alcanzado por las cepas <i>S. cerevisiae</i> (mas la cepa control Fermichamp) en medio agar YP suplementado con 5, 8 o 9% de EtOH v/v.....	195
Cuadro 31. Análisis de varianza del crecimiento en unidades logarítmicas alcanzado por las cepas <i>S. cerevisiae</i> (mas la cepa control Fermichamp) en medio agar YP suplementado con 100, 200, 500 o 700 g/L de fructosa.	196
Cuadro 32. Análisis de varianza para la producción de ácido acético en las diversas especies (izquierda) y por cepa de levadura (derecha) evaluadas en M3 evaluado a las 96 h.	198
Cuadro 33. Análisis de varianza para la producción de etanol en las diversas especies (izquierda) y cepa de levadura (derecha) evaluadas en M3 a las 96 h.....	199
Cuadro 34. Análisis de varianza para la producción de glicerol en las diversas especies (izquierda) y cepas de levadura (derecha) evaluadas en M3 a las 96 h.....	200
Cuadro 35. Análisis de varianza en el consumo de glucosa en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en M3 a las 96 h.....	201
Cuadro 36. Análisis de varianza en el consumo de fructosa en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en M3 a las 96 h.....	202
Cuadro 37. Análisis de varianza en el CO ₂ liberado en las diversas especies (izquierda) y cepa de levadura (derecha) evaluadas en M3 a las 96 h.	203

Cuadro 38. Análisis de varianza para la producción de etanol en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en jugo de uva rojo a las 144 h.....	204
Cuadro 39. Analisis de varianza para la producción de glicerol en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en jugo de uva rojo a las 144 h.....	204
Cuadro 40. Analisis de varianza para la producción de acido acetico en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en jugo de uva rojo a las 144 h.....	204
Cuadro 41. Analisis de varianza para el consumo de glucosa en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en jugo de uva rojo a las 144 h.....	205
Cuadro 42. Analisis de varianza para el consumo de fructosa en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en jugo de uva rojo a las 144 h.....	205
Cuadro 43. Analisis de varianza para el CO ₂ liberado en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en jugo de uva rojo a las 144 h.....	205
Cuadro 44. Analisis de varianza para la producción de etanol en las diversas mezclas analizadas en jugo de uva rojo a las 144 h.....	206
Cuadro 45. Analisis de varianza para la producción de glicerol en las diversas mezclas analizadas en jugo de uva rojo a las 144 h.....	206
Cuadro 46. Analisis de varianza para la producción de acido acetico en las diversas mezclas analizadas en jugo de uva rojo a las 144 h.....	207
Cuadro 47. Analisis de varianza para el consumo de glucosa en las diversas mezclas analizadas en jugo de uva rojo a las 144 h.....	207
Cuadro 48. Analisis de varianza para el consumo de fructosa en las diversas mezclas analizadas en jugo de uva rojo a las 144 h.....	208
Cuadro 49. Analisis de varianza para el CO ₂ liberado en las diversas mezclas analizadas en jugo de uva rojo a las 144 h.....	208
Cuadro 50. Analisis de varianza para la producción de acido acético en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en M2 a las 48 h.....	209
Cuadro 51. Analisis de varianza para la producción de etanol en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en M2 a las 48 h.....	210
Cuadro 52. Analisis de varianza para la producción de glicerol en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en M2 a las 48 h.....	211
Cuadro 53. Analisis de varianza en el consumo de glucosa en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en M2 a las 48 h.....	212
Cuadro 54. Analisis de varianza en el consumo de fructosa en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en M2 a las 48 h.....	213
Cuadro 55. Analisis de varianza en el CO ₂ liberado en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en M2 a las 48 h.....	214
Cuadro 56. Analisis de varianza para la producción de ácido acetico en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en mosto de <i>Agave tequilana</i> a las 96 h.....	215

Cuadro 57. Analisis de varianza para la producción de etanol en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en mosto de <i>Agave tequilana</i> a las 96 h.	215
Cuadro 58. Analisis de varianza para la producción de glicerol en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en mosto de <i>Agave tequilana</i> a las 96 h.	215
Cuadro 59. Analisis de varianza para la producción de consumo de glucosa en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en mosto de <i>Agave tequilana</i> a las 96 h.	215
Cuadro 60. Analisis de varianza para la producción de consumo de fructosa en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en mosto de <i>Agave tequilana</i> a las 96 h.	216
Cuadro 61. Analisis de varianza para la producción de liberación de CO ₂ en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en mosto de <i>Agave tequilana</i> a las 96 h.	216
Cuadro 62. Analisis de varianza para la producción de etanol en las diversas mezclas analizadas en mosto de <i>Agave tequilana</i> a las 96 h.	216
Cuadro 63. Analisis de varianza para la producción de glicerol en las diversas mezclas analizadas en mostos de <i>Agave tequilana</i> a las 96 h.	216
Cuadro 64. Analisis de varianza para la producción de acido acetico en las diversas mezclas analizadas en mosto de <i>Agave tequilana</i> a las 96 h.	217
Cuadro 65. Analisis de varianza para el consumo de glucosa en las diversas mezclas analizadas en mosto de <i>Agave tequilana</i> a las 96 h.	217
Cuadro 66. Analisis de varianza para el consumo de fructosa en las diversas mezclas analizadas en mosto de <i>Agave tequilana</i> a las 96 h.	217
Cuadro 67. Analisis de varianza para el CO ₂ liberado en las diversas mezclas analizadas en mosto de <i>Agave tequilana</i> a las 96h.	218

RESUMEN

En diferentes partes del mundo, las bebidas alcohólicas tienen un papel importante en la vida diaria. El consumo moderado en un entorno social es visto como una práctica benéfica para el cuerpo y el alma. Diversos microorganismos realizan la transformación de los azúcares a etanol, aunque su producción es normalmente atribuida a *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, la microbiota nativa de bacterias y levaduras le confieren rasgos organolépticos producidos por alcoholes superiores, enzimas extracelulares, precursores de aromas y compuestos de alto peso molecular que constituyen o participan en el aroma característico de las bebidas de cada región confiriendo el sabor único y específico de cada bebida.

En este trabajo en primer lugar se puso a punto una técnica microbiológica rápida para cuantificar la tolerancia de las levaduras a diferentes tipos de estrés en un medio de agar, y la cual fue probada con todo el cepario de levaduras del mezcal LBI-CBG, para seleccionar aquellas con la mayor tolerancia global como candidatas para el diseño de inoculantes para bebidas alcohólicas específicas, tomándose como modelos el vino y el tequila por ser bebidas contrastantes en cuanto a la concentración inicial de hexosas totales y en su relación inicial de glucosa y fructosa en sus mostos, además de contar, en el caso del mosto de *Agave tequilana*, con la presencia de compuestos altamente inhibidores como el furfural.

Con aquellas cepas seleccionadas por su grado de tolerancia al estrés (e incluyendo al menos una representante de las 10 especies diferentes del cepario) se caracterizó cinéticamente, en un sistema modelo de microfermentación de tubos de 50 ml tipo falcon con tapa de rosca con 4 orificios cubiertos por una membrana hidrofóbica estéril, usando inóculos de manera individual y en mezclas, cuantificando el uso azúcares en distintos tipos: sintético tipo mosto de uva (M3), mosto de uva real, sintético tipo mosto de agave (M2) y mosto real de *Agave tequilana*, donde se analizaron las cinéticas de metabolitos primarios y secundarios, así como la viabilidad y dinámica celular de los cultivos mixtos de aislamientos nativos de *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, y *Torulaspota delbrueckii*, que fueron las especies más productivas y con los mejores perfiles aromáticos. Se observó que en las primeras horas de cultivo el crecimiento de las 3 especies es similar, sin embargo, después de 24 h de fermentación, las cepas de *S. cerevisiae* comienzan a predominar, mientras que las otras 2 especies permanecen viables aunque en baja concentración hasta el final de la fermentación. Este trabajo constituye uno de los primeros reportes de caracterización de la tolerancia al estrés y su relación en los perfiles de producción de compuestos primarios y volátiles y su uso para evaluar el desempeño de cultivos mixtos en mostos reales (uva y agave) de las tres principales especies levaduras aisladas de la elaboración del mezcal tamaulipeco, con potencial de ser utilizadas en inóculos de uso industrial en la producción de bebidas alcohólicas, para lo cual se propone una metodología de selección de las levaduras a utilizar en el inóculo (*starter*).

ABSTRACT

In many regions of the World, alcohol has an important role in daily life. Moderate consumption in a social environment is seen as a beneficial practice for the body and soul. There have been many marriage proposals, formation of business partnerships and fruitful scientific discussions which have arisen through the centuries with more than one or two drinks at a bar or after a dinner at home. Many microorganisms can perform the transformation of sugars into ethanol, but its production is usually attributed to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. However, it is now well known that native microbiota of bacteria and yeasts can offer many interesting organoleptic notes to the fermented product, resulting from the presence of higher alcohols, extracellular enzymes, flavor precursors and compounds of high molecular weight that form or participate in the characteristic aroma of alcoholic beverages for each region, giving a taste unique and specific to each drink.

In this work the first task was to set up a rapid microbiological technique to quantify the tolerance of yeasts to different types of stress in an agar medium, and which was tested with all the LBI-CBG strain collection of mezcal yeast, to select those with the largest global tolerance as candidates for the design of starters for specific alcoholic beverages, taking as models the wine and tequila for being contrasting in terms of the initial concentration of total hexoses and their initial ratio of glucose and fructose, as well as having, in the case of *Agave tequilana* must, the presence of highly inhibitory compounds such as furfural

With those strains selected for their high level of tolerance to stress (and including at least one representative of 10 different species of the strain collection) strains were characterized kinetically in a model system of microfermentation, consisting on a 50 ml Falcon type tube with screw cap having 4 holes covered by a sterile hydrophobic membrane. Fermentation were carried out with individual and mixed inocula, quantifying the use of sugar in different media: synthetic grape-type must (M3), real grape juice, synthetic agave -type must (M2) and *Agave tequilana* must, and where the kinetics of primary and secondary metabolites were analysed, and the viability and cellular dynamics of mixed cultures of native isolates of *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* and *Torulaspora delbrueckii*, where characterized as they were the most productive species and had the best aromatic profiles. It was observed that in the first hours of culture growth of the 3 species is similar, but after 24 h of fermentation, strains of *S. cerevisiae* begin to predominate, whereas the other 2 species remain viable at low concentrations until the end of fermentation. This work is one of the first reports of characterisation of stress tolerance and its relationship to the primary production profiles and volatile compounds and their use to evaluate the performance of mixed cultures in real musts (grape and agave) of the three main yeast species isolated from the Tamaulipas' mezcal fermentation, with potential to be used as inocula for industrial use in the production of alcoholic beverages, for which a general methodology is proposed to select specific yeasts to be used as starters.

I. INTRODUCCIÓN

En diferentes partes del mundo, las bebidas alcohólicas tienen un papel importante en la vida diaria. El consumo moderado en su entorno social es visto como una bendición para el cuerpo y alma. Muchas son las propuestas de matrimonio, formación de asociaciones de negocios y fructíferas discusiones científicas las que se han presentado a través de los siglos con más de una o dos copas en un bar o después de una cena en casa.

El mercado en la actualidad muestra una fantástica variedad de diferentes tipos de bebidas alcohólicas que difieren en términos de contenido de alcohol, en la forma de elaboración como en la materia prima utilizada para su fabricación o en su proceso de fermentación. El centro de dichas bebidas es la fermentación, particularmente la fermentación alcohólica, donde los azúcares son transformados en etanol y muchos otros compuestos minoritarios. Son muchos los microorganismos los que realizan la transformación de los azúcares en etanol, los cuales mientras al hacerlo estampan sus personalidades en la bebida por la producción de perfiles de sabor característicos, contribuyendo con ello a la rica variedad de las bebidas alcohólicas.

Aparte de la multitud de reacciones bioquímicas que ocurren durante la fermentación, importantes procesos bioquímicos, químicos y físicos ocurren en otras etapas de la elaboración de las bebidas alcohólicas. Dentro de los que podemos encontrar el procesos de ebullición en la elaboración de la cerveza, los distintos tiempos de maduración del vino, el cual puede ser corto que implica días y el largo que puede durar meses o incluso años; procesos de clarificación, pasteurización, mezclado y empaçado. Algunas bebidas alcohólicas son preparadas específicamente para la destilación, lo que las convierte en bebidas alcohólicas destiladas. Estas son elaboradas con diversas técnicas de destilado y diversos tipos de alambiques.

Las bebidas alcohólicas provenientes del maguey así como del mosto de frutas, como el caso del vino, son el resultado de la conjugación de las antiguas técnicas indígenas de aprovechamiento de la planta y la tecnología europea del destilado. En los últimos diez años bebidas tales como el mezcal han alcanzado un reconocimiento nacional e internacional, siendo así la segunda bebida alcohólica más consumida en nuestro país después del tequila. El mezcal es producido en varios estados de la Republica Mexicana, en los cuales la materia prima, el *Agave spp*, crece en forma silvestre, por ejemplo *Agave angustifolia*, *A. potatorum* y *A. salmiana*, entre otras especies. Entre los estados productores más importantes se destacan: Oaxaca, Jalisco, Chihuahua, San Luis Potosí, Zacatecas, Guerrero, Durango y Tamaulipas. El proceso central para la elaboración del mezcal es la fermentación alcohólica para la cual, la fuente principal de carbono está compuesta principalmente de azúcares fermentables, como lo son la glucosa y fructosa, en una relación de 3 molécula de glucosa por 7 moléculas de fructosa, *a priori* se

puede pensar que las levaduras predominantes durante el proceso de elaboración del mezcal tendrán una tendencia fructofílica (alta capacidad de asimilación de la fructosa). Sin embargo, la especie de Agave que se utilice en el proceso determina el tipo y contenido de azúcares, que generalmente son más bajas que el estimado teórico, debido a deficiencias en la etapa de cocción, extracción de azúcares, de la fermentación y de la destilación, dado el poco control que se tiene en cada etapa por lo artesanal del proceso. Además es conocido que el mosto contiene una baja concentración de nitrógeno asimilable para los microorganismos que puedan estar presentes.

Aunque la producción de etanol es atribuida a *S. cerevisiae*, la gran microbiota nativa de bacterias y levaduras le confieren rasgos organolépticos producidos por alcoholes superiores, enzimas extracelulares, precursores de aromas y compuestos de alto peso molecular que constituyen o participan en el aroma característico del mezcal o la bebida de cada región.

Dentro de la amplia gama de carbohidratos presentes en la naturaleza, y que son asimilables en el metabolismo, las hexosas ocupan un lugar predominante de importancia, y entre ellas, la glucosa es la más importante. Los estudios de la utilización de hexosas por *S. cerevisiae* se han concentrado casi exclusivamente en la glucosa, y no se ha observado que los transportadores discriminen entre la glucosa y la fructosa. El que una levadura posea una naturaleza fructofílica, es decir, que consuma a mayor velocidad la fructosa que la glucosa a altas concentraciones, le confiere una mayor capacidad de utilizar una fuente de carbono que la mayoría de los microorganismos no utilizan como primera opción.

Sin embargo, hasta la fecha no se conoce en detalle en cuanto al papel de estos microorganismos en la elaboración de esta y otras bebidas alcohólicas, así como tampoco se ha caracterizado cinéticamente el aprovechamiento de azúcares, que son la materia prima fundamental del proceso de obtención de mezcal. Es por estos motivos, que surge la importancia del conocimiento a nivel científico de las levaduras nativas del mezcal, así como su grado de tolerancia al estrés y actividades bioquímicas en este sistema de fermentación, que suelen ser de gran importancia, y en particular, en lo que se refiere a la utilización de la fructosa, que es el azúcar principal de los mostos, y sus posibles consecuencias a nivel de la caracterización y mejoramiento de la producción del mezcal y el resto de la bebidas alcohólicas para la elaboración de un inóculo capaz de aprovechar los carbohidratos presentes en los mostos de manera que se logre una fermentación total y eficiente.

II. ANTECEDENTES

II.1 La fermentación alcohólica

El proceso mediante el cual el azúcar de un jugo de uva era descompuesto por células vivas de levaduras en alcohol y dióxido de carbono, fue descrito inicialmente por el francés Louis Pasteur, quien observó que el azúcar era descompuesto en ausencia de oxígeno, que en el jugo se caracterizaba por un comportamiento “de ebullición” (*fervere* en latín) causado por la liberación de dióxido de carbono por las levaduras presentes en el mosto azucarado, mientras que la células de levaduras se mantenían con vida e incluso comenzaban a propagarse, proceso mejor conocido actualmente como fermentación alcohólica.

La fermentación en su sentido más amplio es la desasimilación anaeróbica de compuestos orgánicos llevada a cabo por un complejo grupo de microorganismos nativos o autóctonos u otras células que interactúan entre sí a lo largo del proceso; además de ser considerada como un grupo de reacciones bioquímicas mediante las cuales una sustancia orgánica es transformada en otras por acción de ciertos organismos, principalmente levaduras (Sánchez *et al.*, 2005) que llegan a producir un desprendimiento gaseoso y un efecto calorífico (Fig. 1). Son conocidas centenares de levaduras, bacterias y mohos que producen alcohol, sin embargo solo algunas especies de levaduras son utilizadas de manera industrial siendo éstas elegidas por la velocidad de fermentación que pueden proporcionar y su tolerancia a las concentraciones de azúcar y alcohol que existen durante dicho proceso. La levadura *S. cerevisiae* tiene un rol central dentro de este proceso; generalmente se obtiene una bebida alcohólica con características particulares de los insumos usados, la mano de obra que lo procesa y las condiciones climáticas y geográficas de la región; atribuyéndole una gran variabilidad organoléptica y química entre una fermentación y otra.

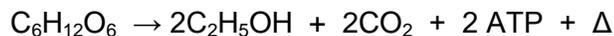


Figura 1. Balance estequiométrico de la fermentación alcohólica

Es *Saccharomyces cerevisiae* la levadura que ha sido empleada por más de 8000 años dentro de la producción de bebidas alcohólicas empezando con la cerveza, y posteriormente el vino, por su habilidad de fermentar rápida y eficientemente los mostos de uva los cuales contienen altas concentraciones de azúcar, por su resistencia a altas concentraciones de etanol y al dióxido de sulfuro y la capacidad de supervivencia a elevadas temperaturas durante las fermentaciones produciendo así fermentaciones controladas mejorando la calidad y composición química de dicha bebida (Fleet *et al.*, 1984; Puig *et al.*, 2000; Querol *et al.*, 2001; Serra *et al.*, 2006). En vino, *S. cerevisiae* produce, durante la fermentación

además de etanol, ciertos compuestos de bajo peso molecular como ácidos orgánicos y ésteres entre muchos otros, que tienen gran impacto en la calidad del producto, así mismo es posible llegar a observar la formación de alcoholes aromáticos o alifáticos que de igual manera que los compuestos de bajo peso molecular antes mencionados, proporcionan cualidades organolépticas únicas en cada producto final de la fermentación (Hazelwood *et al.*, 2008).

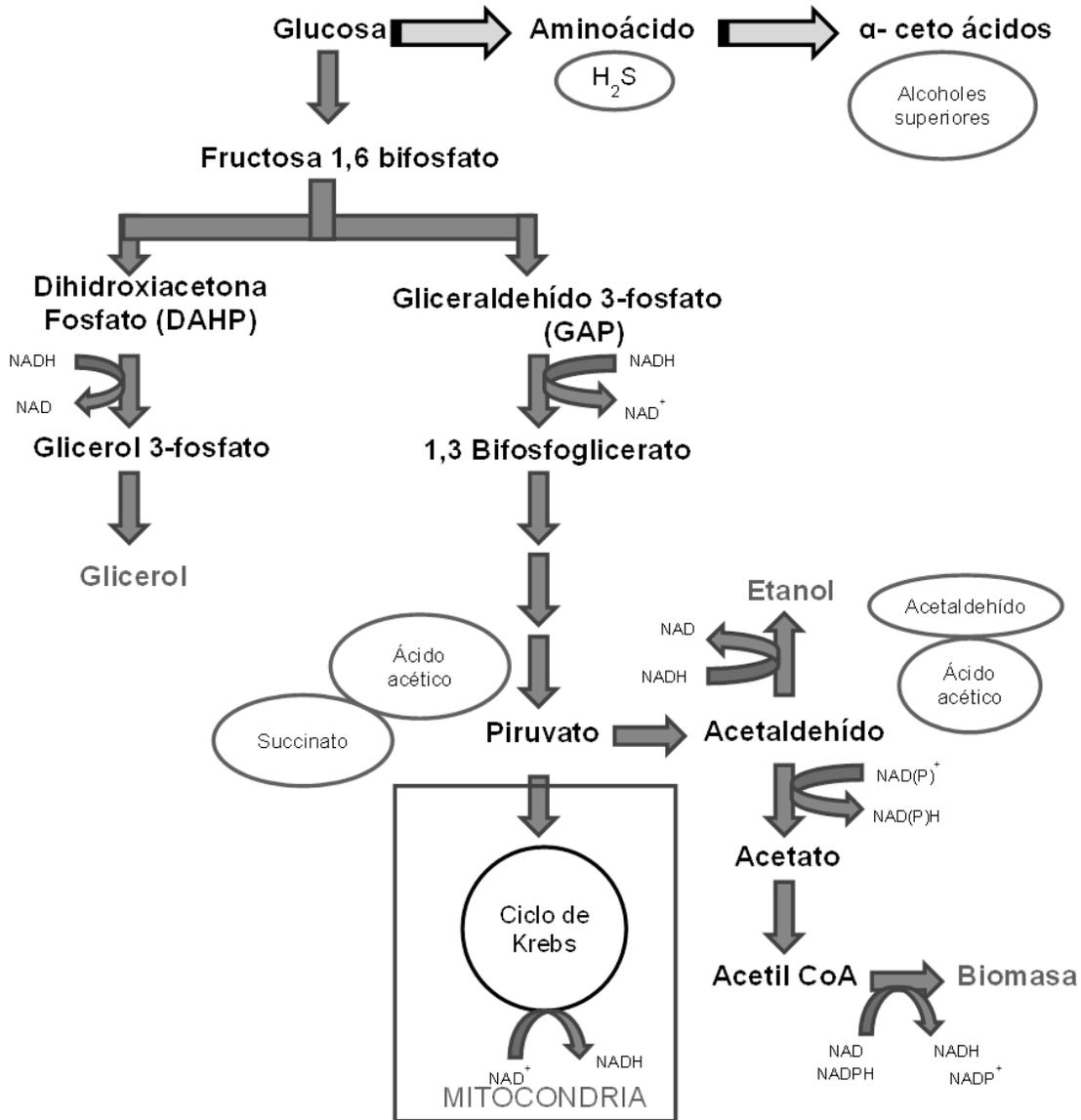


Figura 2. Esquema de las vías metabólicas del catabolismo de la glucosa, mostrando en ella las diferentes etapas que llevan a la producción de etanol, glicerol y biomasa como metabolitos primarios y en las elipses los metabolitos secundarios.

En el proceso de reacciones bioquímicas globales que conducen a la producción de etanol (fig. 2) existe competencia cinética entre las reacciones de producción de etanol y glicerol dado que estas tienen sustrato común, la fructosa 1,6 bifosfato, proveniente del metabolismo central de carbono vía glucólisis.

Así, aunque el etanol es el principal producto obtenido durante la fermentación, es posible también la obtención, aunque en menor cantidad, de otros productos como tales como glicerol, succinato y acetato, sujetos tanto a las condiciones de la fermentación como a las enzimas específicas involucradas en cada caso.

El sitio de control más importante en la ruta del flujo de carbono durante la glucólisis es el transporte del azúcar dentro de la célula. Si se presentan problemas que limiten la vía glicolítica, la tasa de absorción se ajusta para que coincida con la tasa máxima de flujo a través de toda la vía. Esto manifiesta una respuesta global a la limitación de las condiciones metabólicas. Los controles internos también ajustan la tasa de flujo entre la glucólisis inferior y superior. Tres enzimas clave, hexoquinasa, fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa están reguladas por pequeñas moléculas efectoras. Estas enzimas catalizan reacciones importantes en la vía, teniendo que la hexoquinasa es la responsable de la fosforilación de la glucosa y fructosa, mientras que la fosfofructoquinasa se encarga de convertir fructosa-6-fosfato en fructosa 1,6 difosfato.

Se ha observado que el flujo glucolítico es bastante elevado en las levaduras que crecen de manera exponencial en glucosa con velocidades de glucólisis de 200 a 300 μmol de glucosa/min g. Sin embargo, de donde es proveniente el etanol ha sido la cuestión todo el tiempo, si los productos finales de la glucólisis son piruvato y dos moléculas de la reducción del co-factor de NADH. Además de considerar que las células de levaduras regeneran el NAD⁺ mediante la transferencia de la molécula de hidrogeno propiciando una molécula orgánica: acetaldehído.

En la fermentación alcohólica el punto de ramificación de piruvato es considerado limitante, ya que puede ser metabolizado por dos enzimas (Biosca *et al.*, 2002): la piruvato deshidrogenasa que convierte el piruvato en CO₂ y acetil CoA , metabolizado posteriormente en el ciclo del ácido cítrico, y por otra parte la piruvato descarboxilasa, que como su nombre lo indica, descarboxila el piruvato generando CO₂ y acetaldehído, el cual posteriormente es reducido por la alcohol deshidrogenasa para dar como resultado la producción de etanol (figura 3).

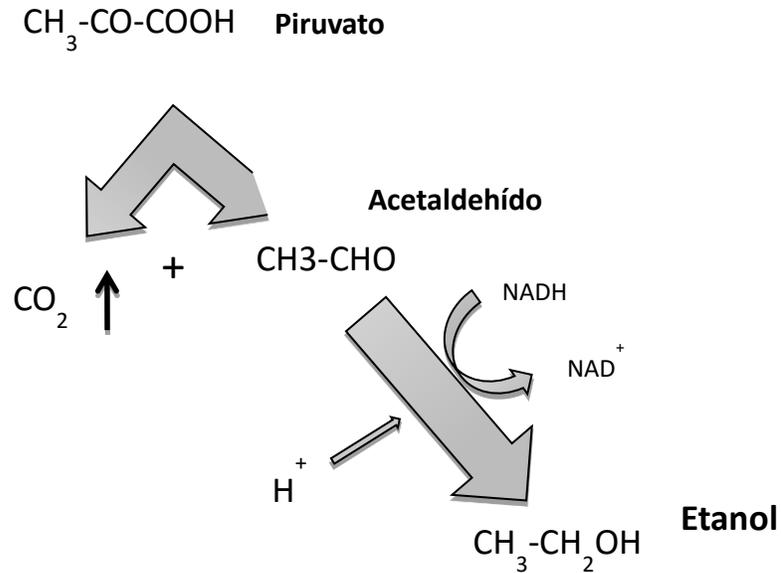


Figura 3. Esquema de la vía metabólica del piruvato que lleva a la producción de etanol.

De esta manera bajo condiciones de fermentación y niveles altos de piruvato se induce la piruvato descarboxilasa la cual descarboxila al acetaldehído que se reduce a etanol con la formación de NADH (Biosca *et al.*, 2002). Mostrando también el dióxido de carbono como un producto final del metabolismo glicolítico. También ha sido observado que la adición de una fuente de nitrógeno incrementa la eficiencia y velocidad de reacción en la producción del tequila, debido a la activación del transportador del azúcar de la levadura (Arrizon y Gschaedler, 2002). Las levaduras presentan la tendencia a utilizar iones de amonio como única fuente de nitrógeno por lo que el amoniaco y sales amónicas, parecen ser las fuentes más adecuadas de nitrógeno por su fácil disponibilidad y bajo precio (Prescott *et al.*, 1962). El $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es la fuente más favorable ya que provee un beneficio nutricional adicional, como una fuente de azufre en la producción de vino (Pinal *et al.*, 1997; Taillander *et al.*, 2006). En el caso de bebidas de agave, Sánchez-Marroquín *et al.*, (1953) recomendaron el uso de sulfato de amonio como una fuente de nitrógeno, en la fermentación del agave para la producción de tequila para favorecer la producción de alcohol. En otro estudio se observo el efecto de la concentración del ion amonio en la producción de alcohol, y encontraron que la producción de etanol fue alta cuando el sulfato de amonio estuvo presente a concentraciones equivalentes de 750 a 1000 mg N/L (Terán *et al.*, 2002). En agaves o magueyes el contenido de nitrógeno es bajo, con promedio de 0.02% a 0.03%, en el caso del *A. tequilana* Weber variedad azul (Sánchez-Marroquín, *et al.*, 1953), y mayor de 0.37% en el caso del *A. angustifolia* Haw (Sánchez, 1985), por lo cual, los niveles de nitrógeno pueden ser críticos durante la fermentación, provocando fermentaciones lentas (Casey *et al.*, 1984).

Es común observar que las reacciones de fermentación utilizan como sustrato glucosa, sin embargo también pueden ser empleados otros azúcares como la xilosa, la lactosa, entre otros, mediante el uso de

levaduras en compañía de otros microorganismos. El empleo de sustratos diferentes a la glucosa en la mayoría de los casos es debido a que estos llegan a ser considerados como desecho o se encuentran presentes en la naturaleza en una gran cantidad. Sin embargo, uno de los factores de mayor impacto en una fermentación espontánea es la alta variabilidad en las poblaciones de *S. cerevisiae* (Martínez *et al.*, 1989; Esteve *et al.*, 2001; Suarez-Valles *et al.*, 2006), ya que los resultados genéticos sugieren que las diferentes cepas derivan unas de otras por mutación, como lo son los rearrreglos cromosomales adquiridos por las numerosas divisiones mitóticas (Naumov *et al.*, 1996; Polsinelli *et al.*, 1996; Puig *et al.*, 2000; Fleet *et al.*, 2003); todo esto tiene lugar debido al proceso gradual de adaptación a las condiciones de vinificación.

II.2 Mecanismos fisiológicos y moleculares de las levaduras en la fermentación alcohólica

Las habilidades de las células para detectar y responder a las condiciones ambientales de estrés son importantes ya que estas afectan directamente la viabilidad de la misma célula, los mecanismos de respuesta al estrés responden a moléculas sensoras y señales en las rutas de transducción (Bauer y Pretorius, 2000; Estruch, 2000; Gasch *et al.*, 2000; Hohmann, 2003) las cuales determinan cambios en los niveles de mRNA para cerca de 900 genes.

En la actualidad debido a los cambios climáticos que se han presentado, se han observado incrementos en la proporción de fructosa con respecto a glucosa en las uvas (Tronchoni *et al.*, 2009). Dichos cambios pueden presentarse en el conjunto de moléculas asociadas al ADN, compuestos y metabolitos que dirigen o tienen influencia en la función y comportamiento de expresión de los genes que constituyen un “epigenoma”. El epigenoma está conformado por la cromatina (ADN+histonas y otras proteínas), las modificaciones en el ADN conseguidas por ejemplo por metilación y por los ARN no codificantes (ncARN). Las combinaciones de todos ellos son muy variadas y permiten la construcción de muchos posibles programas de expresión o de desarrollo que podemos ver en el nivel fenotípico como distintos tipos celulares adaptados a etapas del crecimiento y entornos específicos. Los organismos requieren ajustarse a las fluctuaciones ambientales así como a las fuerzas de selección que se presentan y actúan dentro del medio ambiente que inducen cambios durante su desarrollo, proceso el cual ha sido esencial para la especiación. Las marcas epigenéticas tales como la metilación del ADN, modificación en histonas, entre otros, representan una manera eficiente de modular la actividad genética en respuesta a los estímulos internos y externos (Theres Hauser *et al.*, 2011).

II.2.1 Respuesta fisiológica y molecular al estrés en levaduras

El concepto de epigenética ha derivado en la observación de diversos modelos de estudio partiendo de hongos unicelulares hasta mamíferos. El sistema eucariote más utilizado para estudiar la estructura de la cromatina es la levadura *S. cerevisiae*. Los cromosomas de la levadura en sí, como los de los eucariotas más complejos, forman complejos con las histonas dentro de un núcleo y se replica desde múltiples orígenes durante la fase S.

La gran mayoría de los genes de las levaduras se encuentran en un estado de cromatina abierta, lo que significa que son activamente transcritos o pueden ser inducidos muy rápidamente. Esto, junto con una cantidad muy limitada de repeticiones simples de ADN, hace que la detección de la heterocromatina por técnicas citológicas sea muy difícil en estos organismos.

Sin embargo, usando técnicas moleculares se ha determinado que las levaduras presentan distintas heterocromatinas como las regiones adyacentes a los telómeros en los 16 cromosomas y en dos loci de apareamiento silenciado en el cromosoma III. La represión de la transcripción de estos dos últimos lugares es esencial para el mantenimiento de un apareamiento competente en estado haploide. Tanto las subregiones teloméricas como los loci de apareamiento mantienen integrados a los genes reporteros en una posición dependiente, de manera epigenética se replican a finales de la fase S y se encuentran presentes en la periferia nuclear (Heun *et al.*, 2001). Es por ello que para los científicos, que investigan la cromatina, las levaduras presentan y combinan las ventajas de un genoma pequeño, y las herramientas tanto genéticas como bioquímicas disponibles en los microorganismos, con importantes aspectos de la complejidad cromosómica de los organismos superiores.

Por otra parte la acetilación y desacetilación de histonas de la levadura *S. cerevisiae* está dada por las enzimas acetiltransferasas (HATs) y desacetilasa (HDACs) que modifican a los genes promotores, en una forma no selectiva y global, que afecta la mayoría de los nucleosomas. Recientemente, se han encontrado nuevos roles en la acetilación de histonas, no solo en la transcripción, sino también en la replicación del ADN, la reparación y formación de la heterocromatina, mientras que la desacetilación de histonas no solo es represiva sino que también puede ser necesaria para la actividad de genes (Kurdistani y Grunstein, 2003). No obstante, conocida esta relación que se presenta en el interior de la célula, la relación entre el genotipo y fenotipo sigue siendo una preocupación central de muchos campos, desde la biología, de la genética hasta la biología evolutiva. Aunque esta relación no se comprende totalmente debido al escaso conocimiento de en qué medida la variación epigenética dentro de y entre las diversas especies esta dado por la variación en la expresión de genes individuales y la transcripción y no por la evolución de las secuencias de aminoácidos o proteínas, algunas propiedades generales son compartidas a través de sistemas tales como la variación fenotípica y el medio ambiente. Es decir, las especies pueden mantener la variación fenotípica en entornos diversos y experimentar una amplia gama de condiciones ambientales que pueden o no ser extremas como adversas, sin tener que depender necesaria o directamente de cambios en su genotipo (Landry *et al.*, 2006; Angers *et al.*, 2010).

Una perturbación genética o ambiental que deteriore la robustez del sistema pondrá de manifiesto una mayor diversidad fenotípica. Una sobreexpresión de los genes que controlan la organización de los cromosomas, la integridad del ADN, la elongación del ARN, la modificación de las proteínas, el ciclo celular y la respuesta a diversos estímulos como los diferentes estrés es lo que permite observar la manifestación de la diversidad en los cambios fenotípicos que pueden presentarse. Dichos genes mantienen un gran número de interacciones sintéticas letales, sin embargo, el objetivo de estos no es causar daños severos o causar un bajo rendimiento en la célula causando con ello un daño o que este afecte directamente al organismo.

Cada variación en el fenotipo que se presenta se puede clasificar en función de si es o no codificada por un gen paralogo en el genoma. Aquellos con un duplicado son altamente conectados en la red de interacción proteína-proteína y muestran divergencia considerable en la expresión de sus paralogos. En contraste, aquellos codificados por genes simples son parte de grupos de proteínas altamente interconectados cuyos miembros también tienden a afectar la variabilidad fenotípica. Esto sugiere que la variación generalizada es causada por la redundancia funcional incompleta en varios niveles de la arquitectura genética. No obstante la pregunta sigue siendo como se apartan y adaptan a través del tiempo evolutivo (Levy y Siegal, 2008).

Debido a las intensas condiciones de competencia durante el crecimiento en procesos tales como el fermentativo, *S. cerevisiae* se ve obligada a adaptarse para sobrevivir y dominar estos ambientes mediante modificaciones en su sistema (Landry *et al.*, 2006). Es esa habilidad distintiva fisiológica de rápida adaptación o eficiencia en su crecimiento bajo el estrés proporcionado por el ambiente lo que muestra con alta calidad descriptiva el rol celular de un gen en el organismo el cual, como mecanismo de defensa puede ser bloqueado o eliminado bajo un estrés tal como altas concentraciones salinas, distinguiéndose los efectos de la supresión en los diferentes aspectos fisiológicos celulares, desencadenando la producción y acumulación de glicerol así como una eficiente permeabilidad de los iones de sodio como clave osmoreguladora de estos eventos (Warringer *et al.*, 2003).

Las levaduras que exhiben una heterogeneidad fenotípica son las que generan poblaciones que llevan en su genoma la maquinaria necesaria para sobrevivir en condiciones adversas o nuevos ambientes. Las ventajas potenciales se acentuarán en los hábitats con una diversidad genética limitada como en fermentaciones industriales, cultivos de laboratorio, alimentos fermentados, etc. De acuerdo con la idea de que la heterogeneidad confiere ventajas, esto predice que la población heterogénea podrá superar a las poblaciones homogéneas durante el crecimiento en ciertas condiciones fluctuantes, tomando en cuenta que dicha variabilidad es una característica capaz de evolucionar (Bishop *et al.*, 2007).

En el plano de la expresión génica, a nivel de fenotipo de las células, la variación estocástica en los niveles de producto génico, el estado epigenético de la molécula de ADN y el estado fisiológico de la célula (etapa del ciclo celular, edad de la célula, etc.) están identificados como los principales impulsores de la heterogeneidad de los fenotipos (Bishop *et al.*, 2007). Sin embargo, tales disposiciones experimentales no nos dan una perspectiva de cómo las poblaciones celulares logran adaptarse de forma dinámica a las condiciones ambientales cambiantes. Por lo tanto, el éxito evolutivo de un organismo unicelular como las levaduras depende de su enfoque de un solo propósito de adaptarse a las nuevas condiciones en el nivel de la población y no a nivel célula (Bhat e Iyer, 2009).

La levadura *S. cerevisiae* responde a la galactosa mediante la activación de la transcripción coordinada de una familia de genes llamada GAL. La glucosa reprime la transcripción de los genes GAL a través de múltiples mecanismos, mientras que fuentes de carbono como la rafinosa y glicerol no inducen ni reprimen la capacidad de la galactosa para activar los genes GAL. La interacción entre las proteínas codificadas por GAL3, GAL80 y GAL4 determina el estado ON/OFF del interruptor GAL. Gal4p se une a la activación de las secuencias de agua arriba de los genes GAL (UASg), pero no es capaz de activar la transcripción en ausencia de galactosa. Esto se debe a que Galp80p, una proteína de transporte citoplasmática nuclear, se une al sitio de activación transcripcional de Gal4p. La interacción con la galactosa Gal3p secuestra a Gal80p en el citoplasma, dejando así a Gal4p para activar la transcripción (Traven *et al.*, 2006).

El significado evolutivo de transductores de señales redundantes del citoplasma puede ser apreciado en el contexto del cambio genético de GAL de *Kluyveromyces lactis*, un pariente cercano de *S. cerevisiae* (Rubio-Texera, 2006). En *K. lactis*, el ortólogo GAL3 está ausente, en cambio el gen codifica GAL1 el cual realiza la transducción de señales, así como la función cinasa. En consecuencia, el GAL1 de *K. lactis* difiere del que presenta *S. cerevisiae* en dos aspectos. Primeramente GAL1 de *K. lactis* tiene una expresión basal en ausencia de galactosa y en segunda parte es moderadamente inducida por galactosa.

Recientemente, mediante un ensayo directo altamente sensible, Hittinger y Carrol (2007) analizaron la divergencia evolutiva de GAL1 y GAL3 de un ancestro bifuncional, demostrando que los genes con dos funciones pueden presentar conflictos adaptativos puesto que la optimización de una función puede comprometer o afectar negativamente la otra función. Al complementar a *S. cerevisiae* con GAL3 y GAL1 (las versiones duplicadas del gen ancestral GAL1 bi-funcional) GAL3 perdió la actividad cinasa por completo, pero logro conservar la función de transducción de señales. Por otro lado, GAL1 mantuvo parcialmente la función de transducción de señales junto con la totalidad de la actividad galactocinasa, por lo que la función en *K. lactis* fue mejorada con la sustitución del promotor GAL1, mientras que en *S. cerevisiae* se redujo cuando el promotor GAL1 fue sustituido por el de *K. lactis*. Estos resultados indican que la sub-funcionalización que tuvo lugar en *S. cerevisiae* dada entre GAL3 y GAL1 no fue fortuita, sino

que tiene un propósito evolutivo (Bhat e Iyer, 2009). Si bien los mecanismos moleculares precisos de cómo se adapta a nivel genoma una población de levaduras a cambios en el ambiente todavía no ha sido elucidados completamente, sí se tiene información a nivel de rutas metabólicas específicas y los cambios fenotípicos que se observan en las levaduras en un ambiente de fermentación alcohólica. A continuación se analizan los factores de estrés principales durante el proceso, y las respuestas fenotípicas y genéticas que se presentan en las levaduras, particularmente por *S. cerevisiae*.

II.2.2 El estrés por altas concentraciones de etanol

Una de las características típicas de un medio en donde se lleva a cabo la fermentación alcohólica es el estrés que impone el etanol sobre el crecimiento y sobrevivencia de la microflora. En presencia de etanol las células de *S. cerevisiae* y algunas otras especies de levaduras pierden la integridad de la membrana y presentan disminución en la estabilidad del sistema del transporte de solutos, ocurriendo con ello una fuga de compuestos como aminoácidos, nucleótidos, iones metálicos y vitaminas que pueden persistir hasta el final de la fermentación y producir efectos desagradables en el producto. Sin embargo, al iniciar el proceso con un inóculo de 1×10^4 cel/mL se aumenta el número de células metabólicamente activas, que pueden producir una mayor concentración de etanol en menos tiempo, y de esta manera se disminuye la concentración de compuestos liberados al medio, evitando así efectos negativos en la calidad del producto (Salgueiro *et al.*, 1988). La adición de ergosterol y ácido oléico bajo condiciones anaeróbicas, y su subsecuente incorporación a los lípidos de la membrana celular, incrementa la tolerancia a las altas concentraciones de etanol en algunas levaduras tales como *S. cerevisiae* y *Hanseniaspora guilliermondii*, mas no en todas la levaduras estudiadas (Pina *et al.*, 2004c). Por otra parte, los medios donde se llevan a cabo la producción de bebidas alcohólicas se caracterizan por tener una alta concentración de azúcares, lo que provoca un estrés osmótico para la sobrevivencia y el crecimiento de las levaduras presentes, pueden considerarse el estrés osmótico debido a las altas concentraciones de glucosa y fructosa en los mostos, en el caso de vino, que varía entre 125 y 250 g/L al inicio de una fermentación (Carrasco *et al.*, 2001), un pH bajo (3.5 a 3), y de acuerdo al progreso de la fermentación la acumulación en las concentraciones de alcohol y acetaldehídos, la temperatura alta o baja (Beloch, 2008; Cardona *et al.*, 2007; Salvado *et al.*, 2008), así como la limitación de nutrientes, y el estrés oxidativo debido al metabolismo respiratorio.

Con respecto a lo anterior se ha observado que *S. cerevisiae* se adapta al estrés aumentando la producción de glicerol intracelular como el principal soluto compatible, para generar un balance en la presión osmótica. Este proceso requiere un incremento equimolar de formación de NADH citoplasmático, donde la formación de acetato juega un papel importante por mantener el balance redox en el organismo (Erasmus *et al.*, 2003). El contar con ciclos fútiles (formación de glicerol, glucógeno y trehalosa, Fig. 2) le permite a la levadura resistir la muerte celular acelerada por sustrato, que es una consecuencia de la

incorporación de azúcar y la forforilación subsecuente, ya que estos ciclos crean una demanda temporal de ATP, convirtiéndose en válvulas de escape metabólico. Es autores descartan la especulación acerca de que la formación de ácido acético es debido a contaminantes bacterianos, y se afirma que es debido a la sobreexpresión o decremento de los diferentes genes en *S. cerevisiae* bajo las condiciones de estrés osmótico. Es por ello que la identificación de genes importantes así como el aislamiento de estos microorganismos permite y confiere el uso de los mismos a la industria para su utilización para la elaboración de los diferentes tipos de bebidas, y durante los últimos años, ha estado reportado haciendo uso de microarreglos, en bebidas como vino y sake, para el mejor entendimiento de la expresión y regulación de genes identificada durante estudios conducidos a bajas temperaturas, altas concentraciones de azúcar, altas concentraciones de etanol, etc.

Hirasawa y colaboradores (2010) haciendo un análisis del transcriptoma de las levaduras empleadas en la producción de bebidas a escala industrial mediante el uso de microarreglos encontraron que bajo altas concentraciones de etanol la expresión de los genes que codifican las enzimas implicadas en la biosíntesis de glicerol, como las proteínas involucradas en el flujo de iones de sodio en las cepas empleadas en la elaboración de sake presentan una sobreexpresión, lo que confiere la tolerancia al estrés osmótico de las células de *S. cerevisiae*. Por lo tanto en las fermentaciones espontaneas aquellas levaduras que participan y presentan un patrón progresivo de crecimiento aún cuando los niveles de etanol son mayores a 3-4%, como concentraciones altas de azúcares (Fleet *et al.*, 1993) son dominados por especies de levaduras alcohol y osmotolerantes como la *S. cerevisiae* (Campbell, 2003; Zuzuarregui *et al.*, 2004).

II.2.3 El estrés osmótico

Como en otras situaciones de estrés, el incremento brusco de la presión osmótica, provoca un arresto inmediato del crecimiento de *S. cerevisiae*. En consecuencia, numerosos genes implicados en proliferación celular, transporte y anabolismo de aminoácidos (Norbeck y Blomberg, 1998), biosíntesis de nucleótidos, DNA y proteínas (Rep *et al.*, 2000; Posas *et al.*, 2000; Yale y Bohnert, 2001), en particular de proteínas ribosomales, reducen su nivel de expresión. El metabolismo energético es también regulado a la baja con el fin de ajustar la producción de ATP a las menores necesidades de biosíntesis, al igual que el metabolismo redox, ya que la generación de biomasa es la principal fuente de NADPH. Así, un gran número de genes que codifican enzimas de la ruta glicolítica, incluyendo diferentes isoenzimas, así como enzimas de rutas conexas, aparecen regulados al alza o a la baja en condiciones de estrés osmótico (Rep *et al.*, 2000; Posas *et al.*, 2000; Yale y Bohnert, 2001). La transcripción de una buena parte de estos genes es regulada por otras condiciones de estrés, así como por la disponibilidad, tipo y concentración de nutrientes en el medio, a través de un mecanismo de respuesta general a estrés (Estruch, 2000).

Cuando las células de levadura son expuestas a condiciones de alta osmolaridad se produce de forma prácticamente instantánea una pérdida de agua, debido al gradiente osmótico formado a ambos lados de la membrana (Hohmann, 1997). Esta deshidratación produce una pérdida de turgencia y un cese inmediato del crecimiento. Como consecuencia, *S. cerevisiae* pone en marcha dos tipos de respuestas: una respuesta inmediata, tendente a recuperar agua, turgencia y evitar la muerte celular, y una respuesta secundaria, que permite reanudar el crecimiento en las nuevas condiciones ambientales. En la primera se movilizan diversos mecanismos de rescate, que incluyen la formación de vacuolas y la acumulación de glicerol, para después dar paso a una respuesta secundaria, que implica la activación a medio-largo plazo de mecanismos de rescate y adaptación. En ella, se detecta un reajuste de la expresión de cientos de genes y la síntesis *de novo* de numerosas proteínas (Hohmann, 2002). Alrededor de 250 a 400 genes, implicados en una gran variedad de funciones fisiológicas, son regulados al alza en diferentes condiciones de estrés osmótico (Gasch *et al.*, 2000; Rep *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001; Posas *et al.*, 2000; Yale y Bohnert, 2001). La mayoría de estos genes parece implicado en la síntesis de osmoprotectores, en particular glicerol, y en el ajuste del metabolismo energético y del equilibrio iónico de la célula a las nuevas condiciones ambientales (Hohmann, 2002). Así, *S. cerevisiae* pone en marcha mecanismos de protección y modula su actividad metabólica para reanudar el crecimiento en un medio hostil.

La regulación de la expresión de genes es controlada por mecanismos de señalización que detectan cambios o perturbaciones en la composición o condiciones medioambientales y los transmiten a rutas de transducción de la señal y finalmente a la maquinaria de transcripción. Varias rutas de transducción de la señal han sido caracterizadas como implicadas en la adaptación a estrés osmótico en *Saccharomyces*. De ellas, dos rutas, la ruta HOG y la ruta de la calcineurina juegan un papel clave en la respuesta a estrés hiper-osmótico y a estrés iónico, respectivamente.

II.2.4 El estrés oxidativo

El dioxígeno (O_2) es uno de los gases más importantes y utilizado por casi todos los organismos para la respiración y obtención de energía. Sin embargo, a partir de esta molécula, se producen moléculas más reactivas conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS de las siglas en inglés Reactive Oxygen Species) tales como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH) (Halliwell y Gutteridge, 1999). Estas especies reactivas son producidas endógenamente en las células durante la respiración, no solo cuando el oxígeno presenta un estado de reducción incompleto a agua, sino también en diversos procesos metabólicos como la β -oxidación de los ácidos grasos, o cuando las células son sometidas a fuentes de radiación ionizante, a químicos de reciclaje redox o a metales pesados. Las ROS son capaces de regular varios procesos celulares pero también son capaces de

producir condiciones nocivas para los organismos. A pesar de las condiciones pro oxidantes que se presentan en la vía aeróbica y de las diversas condiciones ambientales, los organismos pueden mantener un ambiente redox intracelular reducido. Sin embargo, si la concentración de las ROS sobre pasa la capacidad celular para eliminarlos, se produce con ello un desequilibrio celular del nivel de antioxidantes lo cual produce un estrés oxidativo.

Dichas especies reactivas suelen atacar aquellas moléculas que contienen anillos aromáticos tales como bases de purina o pirimidina, los lípidos, las proteínas que contienen metales o aminoácidos como la cisteína y la metionina. Sin embargo, la concentración necesaria para producir un estrés oxidativo podrá variar de acuerdo a la célula como de las diversas especies reactivas tal como se observo en el estudio realizado por Toledano y colaboradores (2003) quienes hicieron uso de peróxidos en diversas concentraciones toxicas (0.05 mM – 5 mM) para la evaluación de la respuesta a dicho estrés en la levadura *S. cerevisiae*. No obstante, de igual forma el H_2O_2 ha sido utilizado para observar la respuesta al estrés oxidativo en levaduras.

Los organismos constantemente son capaces de detectar y adaptarse a casi cualquier perturbación mediante una extensa gama de defensa antioxidante formada por diversos sistemas enzimáticos y no enzimáticos, esto con el fin de contender contra el estrés oxidativo y así proteger los componentes celulares mediante un adecuado ambiente redox.

Los sistemas no enzimáticos se conforman de moléculas pequeñas que son solubles en agua y en algunos casos pueden serlo en ambientes lipídicos. En general dichas moléculas suelen actuar como atrapadores de algunos de los diversos ROS. Dentro de estas pequeñas moléculas podemos encontrar el glutatión (GSH) el cual tiene función de atrapador de intermediarios reactivos de oxígeno y es posiblemente el más abundante en la célula, las poliaminas que actúan como antioxidantes al atrapar distintos ROS y en especial el radical superóxido, el ácido eritroascórbico el cual actúa como agente reductor al reaccionar con el radical hidroxilo (OH), con el superóxido (O_2^-) y con el H_2O_2 . Las metalotioneínas las cuales son proteínas pequeñas ricas en cisteína y tienen capacidad de unir iones metálicos, logrando con ello un almacenamiento de los metales de forma no tóxica impidiendo el acceso a estos para la producción de otras ROS. Las glutarredoxinas que son proteínas pequeñas con un sitio activo que contiene dos cisteínas sensibles al cambio redox (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

Los sistemas de defensa enzimáticos se conforman por varias enzimas las cuales presentan la capacidad de remover diversos ROS, dentro de estas encontramos las siguientes: la catalasa la cual en el caso de *S. cerevisiae* es la encargada de remover el H_2O_2 que se produce durante la β -oxidación de los ácidos grasos. Dicha levadura de igual forma posee dos superóxido dismutasas (SOD) las cuales remueven el O_2^- del citoplasma y muy posiblemente también del peroxisoma, así como la protección a la mitocondria del O_2^- generado durante la respiración y la exposición al etanol. Las enzimas de la ruta de

las pentosas como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (ZWF1), la transcetolasa (TKL1) y la ribulosa-5-fosfato epimerasa (RPE1) las cuales mantienen un papel importante en la producción de poder reductor celular en la forma de NADPH.

La glutatión reductasa la cual desarrolla un papel en la reducción de la glutatión oxidado (GSSG), así como el mantenimiento de la proporción del mismo. La glutatión peroxidasa la cual cataliza la reducción de hidroperóxidos. De igual forma se encuentran la thiorredoxina peroxidasa (Tsa) la cual se encuentra de manera abundante en las levaduras en las cuales mantiene la función de reducir el H_2O_2 y a hidroperóxidos de alquilo en conjunto con la thiorredoxina reductasa y el NADPH. Finalmente tenemos a las peroxirredoxinas (Prxs) o también conocidas como thiorredoxina peroxidases (Tpx) o alquilo hidroperóxido reductasas las cuales son una súper familia de proteínas antioxidantes que necesitan un grupo tiol para su funcionamiento. Dichas enzimas protegen contra el H_2O_2 , hidroperóxidos orgánicos o peroxinitritos (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

Diversas evidencias han logrado demostrar que la regulación de la respuesta antioxidante que se presenta en *S. cerevisiae* suele presentarse a nivel transcripcional, además de mostrar una superposición considerable entre las respuestas desencadenadas por una condición de estrés oxidativo y aquellas dadas bajo distintas condiciones de estrés como las que se presentan por la falta de nutrientes, por el calor, por choque osmótico y la resistencia a metales pesados.

El estrés oxidativo desencadena la inducción de los genes que codifican los sistemas de defensa, así como otros genes que codifican la producción de proteínas de choque térmico, la biosíntesis de trehalosa y las enzimas de la vía de la pentosas los cuales son importantes en la generación del poder reductor (Gash *et al.*, 2000). El factor de transcripción, activado específicamente por los oxidantes en las levaduras, es Yap1. El estrés provoca una acumulación en el núcleo de dicho factor de transcripción, dado por la inhibición de la exportación nuclear rápida en lugar de la estimulación de sus importaciones. La forma en la cual dicho factor de transcripción interactúa está dado por la unión del mismo a su sitio de reconocimiento, YRE, el cual se encuentra presente en los promotores de los genes de la biosíntesis de los antioxidantes. Sin embargo, aunque se piensa que Yap1 es un sensor redox como tal, todavía no está bien elucidado que peróxidos lo oxidan directamente, así como se ha observado como diferentes oxidantes afectan directamente a dicho factor de transcripción de diversas maneras y como suele estar asociado con otros factores de transcripción que de igual forma regulan el estrés y las respuestas metabólicas (Kuge *et al.*, 2001; Toledano *et al.*, 2003).

II.2.5 El estrés por las fuentes de carbono

La levadura *S. cerevisiae* prefiere como fuente de carbono la utilización de monosacáridos fácilmente fermentables, entre ellos glucosa, fructosa o manosa. La presencia de estos azúcares hace que la

síntesis de enzimas necesarias para la utilización de otras fuentes de carbono, como maltosa, galactosa, glicerol o etanol, sea muy baja o inexistente. A este fenómeno se le denomina represión catabólica o represión por glucosa. La ruta de represión por glucosa controla además la expresión de genes implicados en la gluconeogénesis (p.e. *PYC1*, *FBP1*, *PCK1*, *CAT8*), la respiración, el ciclo del glicoxalato, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y la β -oxidación de ácidos grasos (Gancedo, 1998).

La disminución en la velocidad de consumo de azúcares está correlacionada con la disminución en la capacidad de la levadura de tomarla del medio, a pesar de que el resto de la vía glicolítica se mantiene intacta y activa. La capacidad de transporte a través de la membrana plasmática y no el nivel de enzimas internas determinan la velocidad de producción de CO_2 . La levadura equilibra la velocidad de ingreso de azúcar con la velocidad del catabolismo. La velocidad de flujo de glucosa a través de la glicólisis es equivalente a la velocidad de flujo a través de los transportadores. Los procesos de transporte son exquisitamente regulados a fin de igualar, pero no exceder, las necesidades metabólicas de la célula.

La manifestación fundamental de la capacidad de adaptabilidad, es la habilidad de las células a usar diferentes fuentes de carbono. Esto como consecuencia de un complejo grupo de sensores y rutas de señalización que lideran la expresión de transporte y enzimas metabólicas. La principal reacción durante la fermentación alcohólica es la conversión de las hexosas, la glucosa y la fructosa, en etanol y CO_2 por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual posee diversos transportadores de hexosas, que las translocan por difusión facilitada (Luyten *et al.*, 2002; Perez *et al.*, 2005). Dichos transportadores son miembros de la superfamilia de los principales facilitadores conocidos como HXT, y que codifican para las proteínas que facilitan la difusión de glucosa, fructosa y otros azúcares a través de la membrana (Yin *et al.*, 2003; Flick *et al.*, 2003). Estas proteínas poseen una estructura común: un núcleo central hidrofóbico de 10-12 μm que atraviesa la membrana en dominios flanqueados por dominios hidrofílicos, los cuales catalizan el transporte de azúcares a través de la membrana por difusión facilitada por un gradiente de concentración, o mediante el acoplamiento con entrada o salida de un protón operativo en contra de un gradiente de concentración (Baruffini *et al.*, 2006). Por otro lado se ha observado que mediante la secuencia y los análisis bioquímicos de diversas MFS (Major Facilitator Superfamily) sugieren que están compuestos de seis hélices que están localizadas fuera de la membrana citoplasmática y 6 hélices dentro, formando un canal que facilita el transporte bidireccional del sustrato (Hirai *et al.*, 2002).

Las proteínas HXT son similares en su secuencia amino terminal y trabajan independientemente, facilitando los mecanismos de difusión y exhibiendo diferentes afinidades por los diferentes sustratos (glucosa, fructosa, manosa y/o galactosa), por lo que son capaces de transportar pequeñas cantidades de solutos a través gradientes quimiostáticos, asimismo de equilibrar los sustratos a través de la membrana en ambas direcciones (Nelissen *et al.*, 1997; Saier *et al.*, 2000; Bannam *et al.*, 2004). La modulación de la afinidad de los transportadores de hexosas HXT por una u otra fuente de carbono y a

interacción entre ellos puede contribuir a la habilidad de adaptación a las diferentes concentraciones del azúcar por las células de levadura (Saloheimo *et al.*, 2007). En *S. cerevisiae* la expresión de los genes HXT se regula a través del balance de dos rutas opuestas, represión e inducción las cuales son reguladas o inhibidas respectivamente por glucosa. Existen veinte genes que codifican para proteínas transportadoras de hexosas HXT1 a HXT17, GAL2, SNF3 y RGT2 (Ozcan *et al.*, 1999; Rolland *et al.*, 2001; Ferrer *et al.*, 2004). En *S. cerevisiae* hay dos sistemas de transporte, uno constitutivo que es un sistema de baja afinidad (K_m 15 a 20 mM) y uno represivo de glucosa que es un sistema de alta afinidad (K_m de 1 a 2 mM).

Los estudios de la utilización de hexosas por *S. cerevisiae* se han concentrado casi exclusivamente en la glucosa, y no se ha observado que los transportadores discriminen entre la glucosa y la fructosa. Sin embargo, también se encuentra reportado que su afinidad por la glucosa es de cinco a diez veces mayor que para la fructosa, por lo cual la primera es consumida preferencialmente (Reifenberger *et al.*, 1997). El que una levadura posea una naturaleza fructofílica, es decir, que consuma a mayor velocidad la fructosa que la glucosa a altas concentraciones, le confiere una mayor capacidad de utilizar una fuente de carbono que la mayoría de los microorganismos no utilizan como primera opción. Se ha observado, por ejemplo, que la traslocación específica de la fructosa requiere, al menos en *Zygosaccharomyces bailii*, un tipo especial de transportador (Fz1) que tiene una baja homología con la familia hxt (Pina *et al.*, 2004a).

La tasa de transporte de hexosa está determinada por la actividad y el número de transportadores de hexosas en la membrana plasmática, así como la necesidad de nitrógeno o la detención de la biosíntesis de proteínas permeasas. Esta inactivación se cree que es debido a la estimulación de la renovación de las proteínas sobre los requerimientos de nitrógeno y los resultados de la degradación de las proteínas en la vacuola después de internalización (Luyten *et al.*, 2002). Por lo tanto, el agotamiento del nitrógeno en las condiciones enológicas se cree que lleva acabo la internalización y degradación de los transportadores de hexosas. Los blancos principales de la toxicidad del etanol son los lípidos de la membrana plasmática. Al cambiar el entorno de los lípidos de la membrana, el etanol inhibe indirectamente la actividad de diversos sistemas de transporte.

Se ha observado que en los mostos de uva se encuentran cantidades muy parecidas de glucosa y fructosa, teniendo una relación cercana al 50% de dichos azúcares. *Saccharomyces cerevisiae* es conocido por mostrar una preferencia por la glucosa. Sin embargo durante la fermentación las células de levadura se enfrentan a condiciones ambientales específicas: las concentraciones de glucosa y fructosa pueden cambiar dos órdenes de magnitud (de más de 200 g/L, a menos de 2 g/L), la limitación de nitrógeno, aumentando los niveles de etanol, pH bajo y anaerobiosis. En estas condiciones, el desarrollo y crecimiento de la levadura suele ser detenido, debido principalmente a la carencia de nitrógeno. En esta etapa el medio todavía puede presentar grandes cantidades de azúcares. Por lo tanto, la

fermentación en gran parte suele llevarse a cabo por las células que han cesado de gemar. Sin embargo, la actividad de fermentación que presentan estas células disminuye gradualmente teniendo como consecuencia una disminución progresiva de la tasa fermentativa durante la fase estacionaria (Luyten *et al.*, 2002). Esta disminución en la actividad de fermentación durante la fermentación alcohólica no parece deberse a los cambios en las actividades de las enzimas glucolíticas. Por el contrario, Serrano y Delafuente (1974); Leão y van Uuden (1985) encontraron que durante la tasa de fermentación anaeróbica en reposo, las células de *S. cerevisiae* suelen encontrarse limitadas por la velocidad de transporte de azúcar al interior de la célula. En efecto, en virtud de condiciones enológicas, la actividad del sistema de transporte de baja afinidad de hexosas comienza a disminuir cuando las células se encuentran en la fase estacionaria temprana de la fermentación, ya que el transporte se convierte en la etapa limitante.

A pesar de que la fructosa se usa inicialmente de forma equimolar con la glucosa, esta última se agota primero del medio, lo que da lugar a una discrepancia entre la cantidad de glucosa y fructosa consumido durante la fermentación puesto que los productores de vino han encontrado altos niveles residuales de fructosa (>2 g/L) lo que representa una fermentación indeseable. Altos niveles residuales representan menor producción de etanol y un alto riesgo de contaminación microbiana en la bebida terminada. Por lo que el paro o lentitud de una fermentación está caracterizada por una inusual alta relación de fructosa-glucosa (Berthels *et al.*, 2004).

Incluso para la producción de vino, como de otras bebidas alcohólicas, pocos estudios han abordado el tema de la utilización de la fructosa de manera específica. Muchos medios sintéticos que imitan el contenido del medio fermentativo a menudo ni siquiera contienen fructosa. Por otra parte, el análisis sistemático o cuantificación de la preferencia de la glucosa de las cepas de levadura de vino que se ha llevado a cabo ha mostrado una mejor y completa perspectiva de este fenómeno, sin embargo, sigue siendo insuficiente para la clara comprensión de este comportamiento. Aunque otras especies de levaduras, como *Candida stellata* y *Zygosaccharomyces bailii*, tienen una clara preferencia por la fructosa (Berthels *et al.*, 2004). Es debido al escaso conocimiento acerca del tema y el efecto de las condiciones ambientales sobre la preferencia de estos azúcares, por lo que no se puede afirmar si el etanol acumulado, la falta de disponibilidad de nutrientes u otras condiciones de estreses se ven afectados de manera diferente con la utilización de glucosa o fructosa.

Recientemente, Berthels y colaboradores (2008) observaron, mediante el seguimiento cinético de algunas cepas de *Saccharomyces*, que las discrepancias que suelen presentarse en el consumo y asimilación de glucosa o fructosa muestra una relación con las diversas propiedades de la hexoquinasa. Mientras que Guillaume y colaboradores (2007) encontraron una cepa de *S. cerevisiae* que presenta una alta capacidad de consumo de fructosa. Encontrando de igual forma que el consumo de fructosa coexiste con el sistema de difusión facilitada para hexosas en especies como *S. bayanus* y *S. pastorianus*. Esto

indica que el uso de diversas especies de *Saccharomyces* puede ser de gran utilidad para evitar grandes concentraciones residuales de fructosa al término del proceso fermentativo. Además que en un estudio realizado por Tronchoni y colaboradores (2009) se observó que, a pesar de que la mayoría de las cepas estudiadas en dicha investigación mantienen una clara preferencia por glucosa, a bajas temperaturas algunas levaduras *Saccharomyces* presentan un carácter fructofílico al inicio del proceso fermentativo. Mostrando con ello que la temperatura es un factor importante a considerar en cuanto a la influencia de consumo de fructosa o glucosa que puedan estar presentes en el medio.

Pasando a otro modelo de fermentación real, la fuente principal de carbono en los mostos de *Agave* spp está compuesta principalmente de azúcares fermentables (glucosa y fructosa) en una relación que, si bien varía de acuerdo a la especie de agave, pueden ser desde 7 moléculas de fructosa por 3 moléculas de glucosa hasta 11 moléculas de fructosa por cada molécula de glucosa.

Dentro del proceso de producción de mezcal la etapa de cocción es muy importante, ya los productos fotosintéticos que la planta produce en el tejido vascular se acumulan a manera de polisacáridos de fructosa y glucosa, denominados fructanos, oligosacáridos o comúnmente, inulina (Nandra *et al.*, 1980; Wang *et al.*, 1998) aunque por su estructura han sido recientemente reclasificados como agavinas ((Mancilla-Margali y López, 2006). Además de dichos oligosacáridos, los mostos también contienen ligninas, celulosas o hemicelulosas, por lo que debe presentarse una etapa de hidrólisis previa a la conversión de los azúcares en alcohol, y las levaduras y otros microorganismos del mosto deben presentar la capacidad de degradar estos compuestos. Por supuesto, la parte fundamental del proceso es el transporte de azúcares y su conversión a alcohol.

En los últimos años han aparecido reportes en cuanto al análisis de la expresión de genes de respuesta al estrés y al metabolismo de carbohidratos, en cepas de importancia en la producción del vino. Sin embargo, cada sistema de producción es particular y único, y en el caso de las fermentaciones que utilizan mostos de *Agave* spp, solamente se encuentran reportados algunos trabajos, en cuanto a la caracterización clásica de la microbiológica de mostos (Durán Hernández *et al.*, 2004) y a la suplementación del mosto con nitrógeno para aumentar la eficiencia de conversión a alcohol en el tequila (Arrizon *et al.*, 2002), y el de la utilización de la fructosa en un medio sintético como modelo de mosto de agave (Oliva-Hernández *et al.*, 2013).

II.3 Producción de bebidas alcohólicas

II.3.1 Bebidas elaboradas con jugos de frutas y de tallos

En el mundo, el uso integral de frutas como lo son la uva, manzana, etc. así como de los tallos de algunas plantas tales como la caña de azúcar y el de *Agave* como fuentes de azúcares fermentables han

marcado un punto de importancia en la sobrevivencia y desarrollo cultural de las civilizaciones. Dentro de las bebidas a base de frutas, el vino es sin duda el más relevante, mientras que de tallos el ron y la cachaza obtenidos de la caña de azúcar ocupan un lugar preponderante, y el tequila y mezcal destacan en las fermentaciones a base de mostos de agave. Todas ellas tienen un amplio reconocimiento internacional, y es por ellos que en la siguiente sección se analizan los detalles más importantes del proceso de fermentación clasificados de acuerdo a la fuente del substrato utilizado.

II.3.1.1 La uva como substrato del vino y el coñac

Se da el nombre de «vino» únicamente al líquido resultante de la fermentación alcohólica, total o parcial, del zumo de uvas, sin adición de ninguna sustancia. En muchas legislaciones se considera sólo como vino a la bebida fermentada obtenida de *Vitis vinifera*, pese a que se obtienen bebidas semejantes de otras variedades como la *V. labrusca*, *V. rupestris*, etc.

Para la elaboración del vino, las uvas son prensadas, anteriormente realizado en recipientes perforados en el fondo, para obtener el mosto o jugo el cual se compone principalmente de agua y azúcares, así como ácidos (málico y tartárico), además otros componentes químicos en menor cantidad que suelen ser los responsables del aroma en la composición final del vino. En la actualidad se emplean prensas neumáticas herméticamente cerradas en las que la delicadeza del prensado permite una menor extracción de sustancias indeseadas y el máximo respeto por las cualidades intrínsecas de la uva. Se suele pasar por un proceso previo de limpieza quitando la vegetación y los *raspones* (tallos de los racimos). Es de vital importancia que la mayor parte de ellas salgan *intactas* para que no pongan en contacto con la atmósfera su zumo interior.

Los principales carbohidratos presentes en el mosto son la glucosa y la fructosa, otros carbohidratos se encuentran en la uva pero en proporciones insignificantes. La concentración de azúcares es crítica para el desarrollo de las levaduras durante la fermentación, la principal levadura del vino (*Saccharomyces cerevisiae*) se alimenta principalmente de glucosa y fructosa (Fleet *et al.*, 2003). Una vez que se tiene el mosto, las levaduras que se encuentran en el ambiente de manera natural o la adición de levaduras específicas provocan y llevan a cabo la fermentación alcohólica, la cual es el proceso en el cual se transformará gran parte de los azúcares del mosto en alcohol etílico y dióxido de carbono, pero de igual forma deja otros compuestos interesantes como el glicerol. Algunos de estos compuestos, que están presentes en menos medida suelen propiciar un cierto carácter a la cata de vino, tal y como es la presencia de taninos, los cuales se encuentran en las pieles de las uvas y son considerados como un conservante natural que permite a los vinos envejecer por más de cinco años sin la adición de algún tipo de conservador artificial.

La fermentación es la parte principal del proceso de elaboración del vino y se produce por la acción metabólica de levaduras que transforman los azúcares del fruto en alcohol etílico y gas en forma de dióxido de carbono (Fleet *et al.*, 2003). El azúcar y los ácidos que posee la fruta *Vitis vinifera* hace que sean suficientes para el desarrollo de la fermentación. No obstante, el vino es una suma de un conjunto de factores ambientales: clima, latitud, altitud, horas de luz, etc. Dicha fermentación para por cuatro fases:

Fase lag - En la que las levaduras se aclimatan a las condiciones del mosto, a las altas concentraciones de azúcares, bajo valor de pH (acidez), temperatura y SO₂. Suele ocupar un período entre dos y tres días.

Crecimiento exponencial - las levaduras ya acondicionadas al entorno, empiezan a multiplicarse en crecimiento exponencial, alcanzando el máximo de su densidad de población, que suele estar en torno a los 100 millones de levaduras por centímetro cúbico. Debido al consumo que hacen las levaduras del azúcar presente en el mosto, las concentraciones del mismo declinan rápidamente. Es en esta fase donde la presencia del ion fosfato es de gran importancia puesto que es esencial en los procesos de transferencia de energía celular y crecimiento de las levaduras. La duración de esta fase es de aproximadamente cuatro días.

Fase estacionaria - En el cual la población de levaduras que ha llegado a su máximo valor admisible, lo que hace que se alcance un valor estacionario y que la fermentación se mantenga a una velocidad constante. El calor formado por la fermentación hace que temperatura de la cuba durante esta fase sea igualmente constante.

Fase de muerte - En esta fase la carencia de azúcares o la elevada concentración de etanol que empieza a matar las levaduras y la población disminuye, con ello la velocidad de fermentación, marcando así el paro del proceso de fermentación.

Los azúcares no consumidos tras la fermentación suelen ser pentosas como la arabinosa, la ramnosa y la xilosa. La concentración de estos azúcares residuales puede aumentar durante la maduración en madera debido a la escisión de moléculas de glucósidos presentes en la madera. El azúcar residual es importante en la tonalidad dulce de un vino, mientras que la presencia de azúcares no residuales afecta sólo a la fermentación. La presencia de azúcares residuales en los vinos da lugar a una clasificación entre *vinos secos* y *vinos dulces*. Durante el madurado algunos azúcares sufren un cambio estructural y acaban dando pigmentos oscuros al vino, este es el caso de la melanoidina detectada en vinos generosos como el jerez, madeiras, etc. Se trata de una variante de la reacción de Maillard.

Al término de la fermentación la bebida es sometida a un proceso de maduración. La maduración, realizada en barricas, es una especie de lenta oxidación del vino. Dos de las reacciones más habituales en la maduración son la *oxidación fenólica* y la polimerización de las antocianinas con otros flavonoides para formar pigmentos y sabores. En la actualidad el vino se almacena en barricas de roble procedente de América (*quercus alba*, *quercus bicolor*, *uercus macrocarpa*) y de Francia (principalmente *uercus robur* y *uercus sessillis*), la elección de uno de estos materiales impacta en el precio final del vino. Finalmente una vez terminado el proceso de maduración dicha bebida es sometida al proceso de embotellado para el acondicionamiento final del vino con el objeto de realizar su expedición y venta final al consumidor.

II.3.1.2 El coñac

El coñac debe su nombre a la región donde se elabora (Cognac, Francia). El coñac es una clase de brandy; muchas veces se tiende a englobar erróneamente a los dos conceptos como equivalentes. Para denominarse Coñac, dicha bebida debe ser obligatoriamente elaborada en dicha región (cualidad de la denominación de origen propia), por lo que los países productores de coñac se limitan a Francia por lo que en el resto de los países, se elabora brandy, no coñac.

Respecto a su descubrimiento hay dos versiones: la primera de ellas dice que en el siglo XVIII, donde la decisión de los viticultores de transformar en aguardiente su vino (envejeciéndolo en toneles durante varios años), debido a la poca demanda existente sobre el mismo, conllevó el surgimiento de los primeros coñac con una tonalidad dorada, un olor atrayente y un sabor exquisito. Otros afirman que debido a la irrupción de marineros en la zona y su demanda en cuanto a vino, se procedió a hervir al mismo para que pudieran llevárselo en el menor espacio posible, originando de este modo a dicha bebida.

Para su elaboración suele emplearse el vino de uvas blancas, vino que suele ser muy seco (poco contenido de azúcares), ácido, no necesariamente destinado a beber, pero con propiedades excelentes para el destilado. El prensado de los racimos de las uvas blancas se lleva a cabo inmediatamente después de la cosecha introduciéndolos en prensas horizontales (prensas de plataforma tradicionales) o neumáticas. Seguidamente, el mosto obtenido se prepara en los tanques para que empiece la fermentación. En esta bebida, la adición de azúcar está prohibida. El prensado y la fermentación se llevan a cabo con suma atención ya que influyen determinadamente en la calidad final del aguardiente.

Tras una fermentación de tres semanas aproximadamente, se obtiene un vino con una graduación media del 9 % del volumen, los ácidos y algunos alcoholes presentes, están listos para ser destilados. Se introduce el vino sin filtrar dentro de la caldera y se lleva a ebullición. El vino pasa por un proceso de

doble destilación en los famosos alambiques de cobre de tipo *charentais* o à *repassé* (denominados en inglés *pot still*). Se desprenden los vapores alcohólicos, acumulándose en el capacete y penetrando en el cuello de cisne y alcanzando el serpentín. En contacto con el refrigerante, los vapores se condensan y mana el "brouillis". Con una graduación de un 28 a un 32 %, ese líquido ligeramente turbio se introduce en la caldera para una segunda destilación llamada el *bon chauffe* o conocida también como "buen caldeo". Entonces, el destilador deberá ejecutar una delicada operación conocida como "el corte": saturados de alcohol, se apartan los primeros extractos (esos jugos llamados "cabezas" sólo representan del 1 al 2 % del volumen). Luego llegan los "corazones", aguardiente transparente y límpido con el que se elaborará el coñac el cual será sometido a un proceso de envejecimiento en toneles durante algo más de dos años, aspecto que marcará la calidad final de la bebida.

El coñac envejece exclusivamente en madera de roble tipo "Tronçais" o "Limousin" (roble albar o pubescente, según su uso). Esta madera fue elegida por su dureza y su escasa porosidad así como por las cualidades de sus extractos. En efecto, la madera procedente del bosque de Tronçais, en la región del Allier, posee un grano fino y tierno, especialmente poroso para el alcohol. En cuanto a los bosques del Limousin, producen una madera de grano medio, aún más dura, fibrosa y porosa. Los taninos de la primera tienen fama de ser particularmente dulces mientras que los de la segunda son conocidos por el poderío y el equilibrio que confieren al coñac. Introducido en toneles de roble tipo "Limousin", el aguardiente puede cargarse mejor en taninos. El largo proceso de maduración, que puede durar décadas, sucede debido a la porosidad de la madera, la cual favorece un contacto indirecto entre el aguardiente y el aire. De esta forma, las sustancias que el aguardiente va sacando de la madera de roble modifican el aspecto físico del coñac, confiriéndole una coloración que abarca desde el amarillo dorado hasta el color pardo rojizo. Con el tiempo, al transferirse las características naturales del roble, se forma el "rancio" desarrollándose asimismo el *bouquet* del coñac.

El coñac sólo puede ser vendido al público y denominado realmente 'Cognac', cuando ha pasado al menos dos años envejeciendo en barricas de roble, contados siempre a partir del final del periodo de destilación. Durante el envejecimiento, el porcentaje de alcohol (y agua) en el aguardiente disminuye a causa de la evaporación que permiten las paredes de las barricas de roble. Esta fase se denomina "*part des anges*", o parte de los ángeles, una expresión que se emplea igualmente en la producción de whisky escocés. El alcohol evaporado favorece la aparición de un hongo negro, *Torula* o *Baudoinia compniacensis*, que crece en las paredes de los barriles y suele frenar la evaporación, sellando los poros de las paredes de los barriles de envejecimiento. El producto final es una mezcla con 40% de alcohol. Los productores de algunas marcas suelen añadir pequeñas proporciones de caramelo para colorear ligeramente los coñacs, por lo menos en una cantidad que no afecte al sabor final de la bebida, dado que el coñac no lleva azúcares añadidos.

De acuerdo a las denominaciones oficiales del coñac según su tiempo de crianza podemos encontrar las siguientes:

VS (Very Special) o ★★★ (3 estrellas): coñacs cuyo aguardiente más joven tiene al menos dos años de añejamiento en barricas.

VSOP (Very Superior Old Pale) o Réserve: coñacs cuyo aguardiente más joven tiene al menos cuatro años de añejamiento en barricas.

Napoléon, XO u Hors d'âge: coñacs cuyo aguardiente más joven tiene al menos seis años de añejamiento en barricas.

II.3.1.3 La manzana como substrato del calvados

El calvados procede de la destilación de la sidra obtenida a partir de la fermentación del mosto de manzana. Las variedades de calvados dependen de la combinación de las manzanas empleadas, que se clasifican en 4 categorías: dulces, dulces amargas, amargas y ácidas. Algunas variedades no son comestibles.

Es importante tomar frutos maduros para extraer el máximo de jugo. Con una tonelada de manzanas se obtienen 700 litros de mosto (jugo de manzana azucarado); el resto, la pulpa prensada, suele ser utilizado como alimento para el ganado. El mosto recién extraído se almacena en cubas. Tras unos días de reposo pasa por un pequeño proceso de limpieza para eliminar una parte de las lías espesas y permitir que la fermentación alcohólica se produzca lentamente.

La fermentación del mosto es una fermentación natural de 6 semanas, al cabo de las cuales se obtiene una sidra de 5 a 6 grados. Después de someter la sidra a un proceso de destilación simple o doble en alambique, el aguardiente resultante tiene entre 40 y 42 grados de alcohol. Dependiendo de la AOC, se emplean dos tipos de alambiques:

El alambique de columna o de columnas (llamado *column still* o *Coffey still* en inglés) permite una única destilación continuada. Se emplea también para obtener whisky de trigo o de maíz. El calvados resultante tiene un sabor a fruta limpio y fresco, y alcanza su madurez a los 12 años por lo que no se suele hacer madurar más tiempo. El alambique *à repasse* o *charentais* (llamado *pot still* en inglés). Se le llama "caliente vino" en español debido a que se calienta directamente la sidra o el vino que se va a destilar. Se emplea para la doble destilación y es utilizado tradicionalmente para el coñac de la región

francesa de Charente y para el whisky de malta irlandés y escocés. El calvados procedente de la doble destilación tiene una mayor complejidad y mayor sutileza de sabores.

Es importante efectuar la destilación en alambiques de pequeña capacidad, para permitir una mejor concentración de los vapores de alcohol. La forma de calentamiento es siempre con madera, como se hacía antiguamente, lo que proporciona un calentamiento lento y no agresivo.

La destilación se realiza en dos etapas bien diferenciadas:

Del primer calentamiento de la sidra se obtiene la “petite eau” o “pequeñas aguas”, con una graduación del 30% vol. de alcohol, después de eliminar las cabezas de destilación (inicios del calentamiento con vapores de alcohol muy volátiles y etéreos) así como las colas, con destilados pesados y oleosos de final de calentamiento.

La segunda destilación, la “Bonne Chauffe” o “Buen Calentamiento”, se lleva a cabo en las mismas condiciones y proporciona el calvados con un 70% vol. de alcohol.

Una vez destilado, el calvados es incoloro a la salida del alambique, por lo que es envejecido en barricas de roble durante un tiempo mínimo de dos años (tres años para el calvados Domfrontais), que puede prolongarse hasta 10, 20 o 25 años.

Durante el periodo de envejecimiento en barrica, el calvados va a adquirir un color ámbar que se irá oscureciendo según aumente su edad. Se distinguen distintos tipos de calvados en función del tiempo de crianza. En caso de ensamblaje de varios calvados, la legislación francesa obliga a que la edad mencionada en la etiqueta sea la del calvados más joven. Dentro de lo cual podemos encontrar distintos tipos de calvados de acuerdo al tiempo de maduración:

Fine o V.S. (*Very Special*): de al menos 2 o 3 años según la AOC.

Vieux o *Réserve* (Viejo o Reserva): de al menos 3 años.

V.O. (*Very Old*), V.S.O.P. (*Very Superior Old Pale*), *Vieille Réserve* (Vieja Reserva): de al menos 4 años.

Extra, X.O., *Napoléon*, *Hors d'âge*, *Très Vieille Réserve*, *Très Vieux* (Muy Vieja Reserva, muy Viejo): de al menos 6 años.

II.3.2 Bebidas elaboradas con caña de azúcar

II.3.2.1 La melaza como substrato del ron

Tradicionalmente asociado a piratas y bucaneros, el ron es consumido por multitud de personas, tanto sólo como mezclado con otros ingredientes en los famosos cócteles. Ejemplo de estos son el mojito (contando entre sus ingredientes con el ron, hierbabuena, limón, azúcar y agua con gas) y el daikiri (con el ron y zumo de limón entre sus ingredientes, así como también el que lleva fresa entre ellos), sin olvidarnos del ron con coca cola, la clásica “cuba libre”. Por lo tanto, cuando se mezcla con otras bebidas se suele tomar con hielo, y si se toma solo se hace a temperatura ambiente.

La mayoría del ron producido se hace a partir de melaza. En el Caribe, gran parte de esta melaza es de Brasil. Una excepción son las islas de habla francesa, donde el jugo de la caña de azúcar es el ingrediente base preferido.

Las levaduras y el agua se añaden al jugo para iniciar el proceso de fermentación. Mientras que algunos productores de ron emplean las levaduras nativas para llevar a cabo la fermentación, la mayoría de los productores emplean cepas de levaduras específicas o comerciales para ayudar a proporcionar un sabor consistente y un tiempo predecible del proceso fermentativo. Sin embargo, se ha observado que la levadura empleada determinara el perfil de aroma y sabor final de la bebida.

Al igual que con todos los demás aspectos de la producción de ron, no existe un método estándar empleado para el proceso de destilación. Mientras que algunos productores trabajan utilizando alambiques, la mayoría de la producción de ron se hace con columna de destilación. Muchos países exigen que el ron sea añejado al menos un año. Este envejecimiento se realiza en barricas de bourbon, pero también puede ser llevado a cabo en tanques de acero inoxidable u otro tipo de barricas de madera.

El proceso de envejecimiento determina la coloración del ron. Ron que se envejece en barricas de roble se vuelve oscuro, mientras que el ron que se envejece en cubas de acero inoxidable se mantiene incoloro. Sin embargo, en algunas ocasiones para proporcionar un ron mas oscuro se puede añadir caramelo para ajustar el color del producto final. Debido al clima tropical común en la mayoría de las áreas productoras de ron, este madura a un ritmo más rápido que el Whisky o Coñac.

La siguiente clasificación de variedades de ron se establecen según su tiempo de envejecimiento:

Blanco: este ron prácticamente no se envejece, o como máximo lo hace durante 12 meses. De entre todos es el más económico y el más adecuado para su mezcla con otras bebidas.

Dorado: al cual se le suele añadir determinados colorantes, y se elabora con un envejecimiento superior a su congénere el blanco, alrededor de los tres años.

Negro: colorado para obtener su tonalidad, es un ron con un envejecimiento importante, superando los tres años.

Con especias: o también con determinadas frutas, para dotarles de su sabor característico.

II.3.2.2 El jugo de caña como substrato de la cachaça

La cachaça (cachaza en español) es la bebida más popular en Brasil, siendo originaria de dicho país. Ligado a la colonización portuguesa, su descubrimiento fue posible tras la introducción en el país de la caña de azúcar que llevaron los portugueses. Característica inicialmente de los esclavos (quienes obtenían los beneficios del azúcar, dándoles fuerza y vigor para continuar con el trabajo impuesto), y fabricada por primera vez a finales del siglo XVI.

En Brasil la fabricación de cachaça es una combinación de tradición y tecnología moderna. Dicha bebida es hecha jugo puro de la caña de azúcar, y no a partir de productos como azúcar refinada o melaza, que es el caso del ron.

Respecto a su elaboración, no difiere del resto de la de las bebidas destiladas, encontrando en la destilación del líquido fermentado de la caña de azúcar, su proceso de elaboración; primero preparando la caña de azúcar, cortándola y limpiándola para ser exprimida después, colando el zumo obtenido, proporcionándole calor para acabar de eliminar el agua sobrante, añadiendo como paso previo a la destilación unas levaduras que faciliten el proceso fermentativo. Por último, los alambiques entran en acción para realizar la destilación final.

Hay básicamente dos tipos de fabricantes de cachaça: la tradicional, que suele ser elaborada por pequeños productores con alambiques y la industrial la cual suele utilizar columnas de destilación. Lo ideal es que el proceso de fermentación comience inmediatamente después de que la caña se corta. Por esta razón y también debido a sus orígenes históricos, las destilerías están situadas a menudo en las granjas de caña de azúcar.

Una de las diferencias entre la elaboración industrial y tradicional de esta bebida la podemos encontrar en la etapa del proceso de fermentación. Los productores industriales emplean levaduras comerciales que están acondicionadas para la fermentación. Mientras que los productores tradicionales emplean las levaduras que se encuentran naturalmente en la caña de azúcar, haciendo un pre-crecimiento de las

levaduras en medios que por lo general contienen harina de maíz, lo cual propicia las condiciones adecuadas de las levaduras para ser utilizadas como cultivo iniciador, mostrándose dichas levaduras como los agentes principales de la fermentación.

Una vez terminado el proceso de fermentación, la bebida es sometida al proceso de destilado el cual suele ser una de las características únicas de la cachaça puesto que muchas son destiladas muy lentamente hasta que el grado alcohólico final se alcanza, teniendo por ley un rango del 38% al 54% de alcohol en volumen.

Finalmente la cachaça puede ser embotellada directamente después del proceso de destilación. En este caso en ausencia de la adición de un caramelo, la bebida presentara un color blanco o incoloro. Sin embargo también encontramos aquellas que son sometidas a un proceso de añejamiento que puede ser breve o de larga duración en barriles de madera nativa. Dicha bebida una vez añejada adquiere una gama de colores como sabores, de acuerdo con el tipo de madera utilizada así como el tiempo empleado en el proceso de maduración. En la actualidad para esta bebida se emplean, para el proceso de maduración, diversos tipos de maderas nativas tales como amburana, angelim, amendoim, bálsamo, jequitibá, jatoba y en algunos casos barricas de roble.

II.3.3 El Agave spp como substrato del pulque, mezcal, bacanora, raicilla y tequila.

II.3.3.1 El pulque

El pulque es probablemente la más antigua y tradicional bebida alcohólica mexicana. Es una bebida de color blanco lechoso, viscoso, ligeramente ácido y el alcohol (<6%) es producido por la fermentación de la savia que se extrae de varias especies de agave, principalmente *Agave salmiana*, *A. atrovirens* y *A. mapisaga*. En la actualidad, el pulque persiste como bebida típicamente popular, y sólo se vende en las pulquerías. Su consumo varía con la edad y el tipo de consumidor, así como con la ocasión. Para la población de bajos ingresos, el pulque sigue siendo la bebida preferida, puesto que también constituye una parte importante de su dieta diaria, debido a su aporte de vitaminas y aminoácidos esenciales (Estrada *et al.*, 2001; Ramírez *et al.*, 2004). Hoy en día, es promovido en los restaurantes y los festivales gastronómicos en un intento de recuperar viejas tradiciones y que se está haciendo popular entre los jóvenes.

El pulque se obtiene de la dulce savia, de color amarillento ligeramente nublado extraída de de agaves maduros de 8-10 años de edad (con un contenido de agua, glucosa, fructosa, sacarosa, proteínas, gomas y sales minerales), que están a punto de producir su inflorescencia, que una vez productivos pueden presentar un total en la producción de 200-1000 L por planta.

El primer paso en la producción de pulque es la eliminación del botón floral, dejando una cavidad o cajete en el centro del tallo del agave. Posteriormente un período de envejecimiento es el que procede, lo que permite la maduración de las hojas centrales para un aumento en el contenido de azúcar en la savia (7.14% w/v). La cavidad es raspada para abrir los vasos, permitiendo que la savia fluya, para ser extraída mediante succión oral a través de una calabaza seca llamado acocote, y se lleva a los tinacales donde la fermentación se realiza en contenedores abiertos. La fermentación se produce espontáneamente, o también puede ser inducida por la adición de una pequeña porción de una savia fermentada de arranque (Lappe *et al.*, 2008).

El arranque se hace con 10-15 L de la savia de mejor calidad, por una fermentación natural. Después de varios días, dependiendo de la temperatura, los cambios estacionales y otros factores no controlados, la fermentación alcohólica y la fermentación acética comienza. Una gruesa capa flotante se forma, lo que indica que el motor de arranque está listo para una segunda fermentación. Otro lote (600-900 litros) de la savia de mejor calidad se mezcla con el motor de arranque (1.3% v/v) en un primer tanque (fermentador de la cabeza) y es fermentado hasta que el contenido de azúcar limita y controla el crecimiento microbiano. Entonces un lote de 300 a 450 litros de sobrenadante de pulque es retirado (pastel de cuba) y se vierte en un segundo tanque (fermentador de la cola), y se utiliza como inóculo (50% v/v) para fermentar un lote de savia regular (Ramírez *et al.*, 2004). Después de varios días de fermentación en el segundo fermentador, el pulque, finalmente llega a un determinado grado alcohólico y adquiere la viscosidad y las características sensoriales del producto final, en este punto, es preciso el envasado y comercializado, antes de la acidificación e inicio de la putrefacción. El pulque se considera un producto de consumo rápido y su vida útil es de 1-3 días.

II.3.3.2 El mezcal

La palabra mezcal tiene su origen en vocablos de la lengua náhuatl, algunos sostienen que deriva de “mexcalli” (“metl” o “meztl”, maguey, y de “ixcalli”, cocer), siendo entonces la traducción “maguey cocido” (Colunga *et al.*, 2007). La planta del maguey desde tiempo prehispánica era utilizada por los indígenas en todo Mesoamérica obteniendo de él aguamiel y pulque pero no fue hasta la llegada de los españoles en el siglo XVIII, quienes introdujeron por a las costas de Colima y Jalisco el proceso de destilación proveniente originalmente de los filipinos (Parsons *et al.*, 2000; Colunga *et al.*, 2007; Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2008).

El nombre mezcal ha sido utilizado como genérico para bebidas destiladas a partir de diversas especies de maguey, fabricadas a partir de variados procesos tradicionales, con una denominación de origen que emplea el nombre mezcal para agrupar, sin reconocer sus diferencias, a variadas especies, bebidas,

regiones y procesos de siete estados que son los únicos que ahora pueden usar el nombre en la comercialización de sus productos. Actualmente de acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994 (Bebidas Alcohólicas-Mezcal Especificaciones), el mezcal “es la bebida alcohólica obtenida por destilación de mostos preparados con los azúcares extraídos del tallo y base de las hojas de los agaves mencionados, sometidos previamente a fermentación alcohólica con levaduras, permitiéndose adicionar hasta un 40% de otros azúcares en la preparación de dichos mostos, siempre y cuando no se eliminen los componentes que le dan las características a este producto”.

El mezcal es pues una bebida alcohólica obtenida por la destilación y rectificación de mostos preparados con azúcares extraídos del tallo y base de las pencas (hojas) del agave, estas suelen ser cosechadas cuando la planta llega a su madurez alrededor de los 6 a 8 años, y se deja solo el corazón, conocido como la piña. Las piñas posteriormente son cocidas y prensadas obteniendo así el jugo o mosto, que es fermentado por levaduras, generalmente de forma espontánea, en contenedores o tanques especialmente acondicionados. Para la elaboración del mezcal se puede hacer uso de una variedad de agaves por ejemplo: *Agave angustifolia*, *A. americana*, *A. duranguensis*, *A. potatorum*, *Esperima jacobi* y Amarilidaceas, entre otros. Posterior a la fermentación es necesaria la destilación así como una rectificación (segunda destilación). Dicha bebida es considerada como un líquido transparente con cualidades organolépticas particulares de olor y sabor específicos de acuerdo a cada tipo de agave usado y el proceso con el que es elaborado; es incoloro o ligeramente amarillo si esta añejado ó reposado, considerando la maduración o la transformación lenta que tiene lugar durante su permanencia en barricas de roble blanco o encino.

En Tamaulipas el mezcal se elabora de manera artesanal en pequeñas fábricas en donde los campesinos elaboran la bebida para su propio consumo y para ayudar su economía familiar mediante la venta. Actualmente el gobierno de Tamaulipas impulsa la agroindustria del mezcal en el proceso de fortalecimiento en acciones dirigidas a la modernización y terminación de las fábricas de mezcal existentes, la certificación de las mismas, promoción y comercialización del mezcal para así lograr el posicionamiento nacional e internacional (COMERCAM; Gaceta parlamentaria, 2008) y considerando la ubicación geográfica, la infraestructura de las vías de comunicación, la cercanía con el mercado más grande del mundo y gran consumidor del tequila y mezcal, como lo es Estados Unidos, Tamaulipas tiene las expectativas de figurar como uno de los estados productores de mezcal más importantes y este producto mexicano puede tener una derrama económica muy importante, ya que aunque incipiente, posee amplias perspectivas con impacto social y económico para las entidades rurales comparado con otros destilados de agave, este es una bebida que conserva la tradición de fabricación en empresas pequeñas con tradición, cultura e historia fomentando el arraigo de las comunidades.

En la fermentación del mosto se usa como inóculo residuos de fermentaciones anteriores, se lleva a cabo en tinajas de madera o metálicas (figura 4) donde fermenta en forma natural y a la intemperie

durante cinco a nueve días (dependiendo de la temperatura ambiente, la cual oscila entre los 25 °C y 42 °C). Los procesadores dan por terminado el proceso cuando cesa la generación de espuma.

En la fermentación natural del mosto de agave participan e interaccionan secuencialmente un complejo grupo de microorganismos. En lo que se refiere a las levaduras, el origen de estos microorganismos puede ser la superficie de los agaves o el ambiente de las tinajas de fermentación, hasta las moscas que rondan la molienda sin ningún tipo de inoculación externa; esta situación causa que las fermentaciones no sean producto de una sola especie o cepa de levadura, sino de una biodiversidad de especies y cepas diferentes a lo largo del proceso. Se tiene la certeza de que en la etapa final invariablemente dominan las levaduras resistentes a altas concentraciones de alcohol comúnmente *Saccharomyces cerevisiae*. Es indudable que la calidad del mezcal está directamente relacionada con la microflora típica nativa del proceso fermentativo.

Este proceso implica el desdoblamiento de hidratos de carbono mediado por el uso de los microorganismos que se presentan en los materiales usados o aquellos originalmente presentes en la piña. Esta degradación de azúcares traerá consigo la producción de etanol por medio de fermentación alcohólica, conducida bajo las rutas metabólicas de las levaduras. Se destacan dos tipos de fermentaciones principales: la natural y la inducida o acelerada, siendo la primera aquella que es llevada a cabo por los organismos que están presentes de manera natural en la piña, mientras que la inducida es a la cual le son agregados fuentes de nitrógeno para acortar el tiempo de fermentación (Arrizon y Gschaedler 2002). En este punto los factores a considerar suelen ser la cepa de levadura, aireación, composición del mosto, temperatura y lo más importante el rendimiento en la producción de etanol.



Figura 4 Tinajas de fermentación de mostos de agave

Al terminar el proceso de fermentación los mostos cocidos se pasan hacia los alambiques de destilación. Para esta destilación es comúnmente usado el alambique, conformado por cuatro elementos de cobre, metal caracterizado por su alta conductividad térmica, que proporciona los márgenes de temperaturas

para la adecuada separación. Aquí la mezcla se calienta en el alambique artesanal, por medio de leña, evaporándose y condensándose lentamente a través de un serpentín que deposita su contenido en un recipiente, dicha condensación presentada una vez que el serpentín es enfriado por medio de agua; el producto de la fermentación es destilado en tres partes, la cabeza y la intermedia son generalmente redestiladas, obteniéndose así un producto con mayor porcentaje de alcohol (aproximadamente 55 % en volumen) y una tercera parte llamada “cola” es desechada. Empíricamente para conocer el grado alcohólico los productores usan un carrizo y una jícara donde vierten el mezcal, cuando se forman burbujas se entiende que el mezcal es de calidad. Este proceso ha sido muy poco estudiado, considerando que es el último paso que define la calidad de la bebida.

La Norma NOM-070-SCFI-1994 para el mezcal establece los límites máximos y mínimos de concentración permitidos en la bebida, pero en estudios anteriores se observó que existe una gran variedad de componentes volátiles en el mezcal, sin embargo, solamente algunos de ellos están bajo regulación oficial. Como es esperado, el etanol es el componente de mayor abundancia en el mezcal, ya que este compuesto es el resultado de la biotransformación del azúcar por los microorganismos durante la fermentación (Salmon, 2006; Suarez-Valles *et al.*, 2006; Arrizon *et al.*, 2006).

Análisis realizados en mezcal por micro extracción de fase sólida- cromatografía de gases- espectrometría de masas (SPME-GC-MS) mostraron la presencia de alcoholes como metanol, el cual es producido durante la fermentación alcohólica a por la biodegradación de la pectina y la lignina de la pared de las células vegetales; asimismo se encontraron etanol, metanol, *n*-propanol, 2-butanol, 2-metilpropanol y mezcla de 2/3 metil-1-butanol, producidos por el catabolismo de los amino ácidos (Lachenmeier *et al.*, 2006; De León-Rodríguez *et al* 2006; Arrizon *et al.*, 2006). Del mismo modo fueron identificado nueve clases de terpenos (α -felandreno, α -terpineno, *p*-cimeno, limoneno, α -trans-ocimeno, linalool, 4-terpineol, geraniol, and trans-nerolidol) se ha reportado que estos terpenos son liberados por las β -glucosidasas por las levaduras durante el proceso de la fermentación. Asimismo ha sido detectado furfural y 5-metilfurfuraldehído, al igual que la presencia de ésteres en su mayoría de etilo, los cuales son los responsables del aroma afrutado en bebidas alcohólicas, como el caso de hexanoato de etilo y octanoato de etilo (olor a manzana). Igualmente se observó la presencia de alcoholes aromáticos importantes como el feniletanol, que confiere un aroma floral (Escalante *et al.*, 2006; Lachenmeier, 2006, Molina *et al.*, 2007) otro compuesto que también se encuentra en los mezcales son el ácido acético, acetato de etilo y etil-2-hidroxiopropanato (León *et al.*, 2006, Vera *et al.*, 2009). La presencia de componentes minoritarios juega un papel muy importante en la bebida ya que le confiere propiedades organolépticas específicas que varían notablemente con la edad de maduración. Cabe mencionar que la concentración de metanol en conjunto con los alcoholes superiores es un indicativo de que la bebida no se encuentre diluida o adulterada (Lachenmeier, 2006).

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana sobre bebidas alcohólicas, los mezcales se clasifican en tres tipos basados en el tiempo de maduración después de la destilación. Los mezcales jóvenes son embotellados justo después de la destilación, los reposados permanecen de 2 a 6 meses en barricas para su estabilización, mientras que los añejos son sujetos a un proceso de maduración de por lo menos 1 año. Durante este tiempo el mezcal adquiere color ámbar y sabor característico.

Actualmente debido al gran avance en el uso y desarrollo tecnológico en el área de las bebidas alcohólicas, la elaboración de esta bebida no solo suele presentarse de manera artesanal, sino que puede producirse de manera tradicional y moderna.

En su sentido más amplio, una fermentación es el proceso de cambios químicos en un sustrato orgánico causados por enzimas, las cuales generalmente se encuentran en microorganismos vivos. Los conocimientos sobre dicho proceso ha sido atesorado desde la antigüedad por grandes civilizaciones, como la egipcia y la asiria quienes la emplearon para la producción de bebidas alcohólicas; o como la azteca o china quienes le dieron uso en la producción y obtención de productos alimenticios como salsas y bebidas fermentadas (Ostergaard *et al.*, 2000).

Actualmente, este proceso ha alcanzado el grado modernizado gracias a la aparición de técnicas que permiten el uso de organismos puros de células vegetales y animales, así como otros tipos de cultivos microbianos, permitiendo con ello su uso en la industria donde se destaca la panificadora, la de bebidas alcohólicas, la farmacéutica con la producción de vacunas y medicamentos, además de la industria bioquímica, la cual es encargada de producir ácidos orgánicos, aldehídos, y alcoholes.

II.3.3.3 El bacanora y la raicilla

El bacanora es otra bebida elaborada con agave, con reconocimiento oficial y la denominación de origen. Cuatro tipos de bacanora son reconocidos: blanco (plata), joven o de oro (oro), reposado, y añejo (extra edad) con la misma descripción que los tipos diferentes de tequila. Raicilla es otra bebida elaborada con agave que tiene producción en la parte occidental de Jalisco, con diferentes especies de agave (Lappe *et al.*, 2008).

Las principales características de los diferentes agaves utilizados como materia prima, en la elaboración de dichas bebidas, son la presencia de fructanos (Mancilla-Margalli y López, 2006), que se utilizan como sustancia de reserva por la planta; la presencia de algunos compuestos químicos (terpenos) que contribuyen al aroma y sabor del producto final. En algunos casos, los agaves se cultivan (Oaxaca y Zacatecas) o las plantas silvestres son cosechadas directamente (San Luis Potosí, Durango, Guerrero). Plantas de agave se cosechan entre los 8 y 12 años de edad, dependiendo de la especie y

las condiciones de cultivo. La recolección se realiza de manera artesanal: la planta completa se corta, las hojas se retiran, dejando a la madre, y las bases de las hojas, conocido como la cabeza o el pino, se transportan a la destilería y son cortadas en mitades para facilitar la manipulación y cocción uniforme.

El proceso comienza con la cocción de las piñas de Agave. En el proceso tradicional, este paso se realiza generalmente en hornos rústicos (agujero en el suelo, lleno de piedras, se calienta con madera, y cubiertas de tierra). El proceso de cocción tiene tres objetivos principales: (1) hidrólisis de fructanos en azúcares simples (fructosa, glucosa, sacarosa) de fácil fermentación por levaduras, (2) para facilitar la operación de molienda y la extracción de azúcares, y (3) la generación de algunos compuestos químicos importantes que intervienen en las características sensoriales del producto final, y algunos de estos son producidos por la caramelización y la reacción de Maillard.

El agave cocido se muele con mazos de madera o de acero, y el jugo se recoge en una "canao" un envase de la fermentación de troncos huecos. El método más común consiste en una planta rudimentaria o tahona (una piedra circular de unos 1.5 m de diámetro que giran en una fosa circular donde se coloca el agave cocido). En el proceso tradicional, dos tipos de fermentaciones se llevan a cabo: uno con jugo de agave y otro sólo con la planta completa de Agave incluyendo el jugo, la pulpa y fibra.

El proceso de fermentación se lleva a cabo de forma espontánea por la microbiota presente en el mosto (compuestos de nitrógeno, sales y el agua que se puede añadir) y dura varios días dependiendo de la temperatura, en la región, y las condiciones meteorológicas. El mosto fermentado se destila dos veces en arcilla (alambiques de barro Phillipine tipo maceta) o de metal. En los procesos tradicionales, tanto la fermentación y la destilación se realizan sin ningún control específico. Este proceso se sigue en la producción de mezcal, bacanora y la raicilla (Lappe *et al.*, 2008).

II.3.3.4 El tequila

La palabra tequila proviene del náhuatl *tequillan*, de *tequitl* = homenaje, *tequiotl* = trabajo o empleo, y *tlan* = lugar. En la actualidad, el tequila se produce exclusivamente en el territorio de la denominación de origen, y se lleva a cabo a escala industrial, con una producción anual de aproximadamente 242,6 millones de litros (Lappe *et al.*, 2008).

El tequila se obtiene exclusivamente de la fermentación y destilación del *Agave tequilana* var. Azul, se ha producido en el estado de Jalisco y algunas regiones de los estados de Michoacán, Guanajuato, Nayarit y Tamaulipas. El proceso está sujeto a la Norma Oficial Mexicana NOM-006-2005 (SECOFI, 2005), que reconoce dos categorías: "Tequila 100%, obtenidos exclusivamente a partir de azúcares de *A. tequilana*

var. Azul, y "Tequila 51%" o "Tequila", producido con 51% de azúcares de agave y 49% de las fuentes de distintos azúcares. En cada categoría, hay cinco tipos: el tequila blanco (plata) sin maduración, tequila Joven u oro (oro), que contiene aditivos y colores permitidos (color caramelo), el tequila reposado madurado por lo menos 2 meses en barricas de roble blanco, que es el tipo más popular de tequila, tequila añejo (extra edad), y el tequila extra añejo (años de edad), con una maduración 1 a 3 años, respectivamente, en barricas de roble blanco (Gschaedler Mathis *et al.*, 2004). La producción industrial de tequila incluye las cinco etapas del proceso tradicional del mezcal. Cada paso es controlado con precisión para aumentar la eficiencia del proceso y la producción. En algunas destilerías, la cocción sigue siendo llevada a cabo en hornos de ladrillos calentados por inyección de vapor, y en otras se utilizan autoclaves de acero. El Agave cocido se muele para extraer el mosto que contiene una alta concentración de fructosa y poder ser sometido a la etapa de fermentación.

La fermentación de "Tequila 100%" está formulado con mosto de Agave, con una concentración de azúcar inicial de 4-10% v/v, dependiendo de la cantidad de agua añadida durante la molienda. Para 'Tequila', se añaden otros azúcares para obtener una concentración de azúcar inicial de 8-16%, dependiendo de la tolerancia al azúcar de la cepa de levadura a utilizar. La formulación se basa en la composición de las materias primas y los requerimientos nutricionales para el crecimiento de la levadura. Se deja fermentar de forma espontánea o se utilizan cepas de levaduras seleccionadas. Algunas compañías mantienen este tipo de fermentación natural, como en el proceso tradicional, ya que la gran diversidad de microorganismos produce más compuestos que contribuyen al sabor y aroma de tequila, a pesar de la menor producción de etanol. En otras destilerías, el mosto se inocula con levaduras comerciales de panadería o levadura seca (preparado para el vino, la cerveza, o la producción de ron). Otra práctica es el uso de cepas de levaduras autóctonas aisladas de una fermentación natural (Gschaedler Mathis *et al.*, 2004; Lappe *et al.*, 2008).

Finalmente el tequila se obtiene después de dos destilaciones consecutivas diferenciales en alambiques de cobre o de acero inoxidable. Algunas destilerías utilizan columnas de rectificación para mejorar la eficiencia de este paso y para lograr un mejor control del producto final (Prado-Ramírez *et al.*, 2005). Por último, el tequila es envejecido en diferentes formas, dependiendo del tipo de tequila que se desee obtener. Antes de embotellar, el tequila se filtra a través de filtros con almohadillas de celulosa o cartuchos de polipropileno.

II.4 Compuestos volátiles en bebidas alcohólicas fermentadas

El aroma y sabor de las bebidas alcohólicas probablemente son de los más complejos que existen, debido a que son el resultado de numerosos compuestos volátiles y no-volátiles, cuya mezcla compleja define sus atributos sensoriales y la aceptación por el consumidor. La enorme variedad de aromas y

matices que se presentan en bebidas tales como el tequila y el mezcal suelen presentarse debido a las altas y bajas concentraciones de la variedad de compuestos volátiles que pueden estar contenidos en la materia prima y variar entre especies (Vera Guzmán *et al.*, 2009). Normalmente las moléculas con propiedades organolépticas más importantes se encuentran en concentraciones bajas. Se puede decir que el análisis de los compuestos del aroma de estas bebidas es una determinación de cantidades traza de compuestos orgánicos en mezclas complejas. Los compuestos aromáticos que se encuentran en las bebidas alcohólicas en un momento dado pueden haberse originado en cualquiera de las etapas de la elaboración como la fermentación alcohólica y el añejamiento.

La fracción volátil de una bebida está constituida por gran número de compuestos de familias químicas diferentes y en concentraciones muy variables. De esta gran variabilidad y de la complejidad de la matriz se puede concluir fácilmente que no existe un método de análisis válido para todos los compuestos. Las moléculas con propiedades organolépticas más importantes se encuentran en concentraciones bajas. Sin embargo sus características organolépticas pueden ser apreciables incluso en estas concentraciones. Hay que tener en cuenta que no todos los compuestos volátiles contribuyen al aroma, pues muchos de ellos no presentan ninguna sensación olfativa. También hay que considerar que entre los compuestos que contribuyen al aroma no todos lo hacen en igual extensión. La importancia sensorial de cada compuesto va a depender de su concentración y de su umbral de percepción (concentración mínima de compuesto detectable sensorialmente). El "valor de aroma", que es la relación entre la concentración de compuesto y el umbral de percepción, y que se expresa en unidades de aroma, nos da una idea del potencial aromático de cada compuesto. Sin embargo, se debe tomar en cuenta la fuente o materia prima, como se muestra en la figura 5, que dará lugar a aquellos compuestos que proporcionarían ese aroma tan específico de cada una de las bebidas.



Figura 5. Principio del proceso de interacción materia prima- microorganismo- compuesto volátil.

Existen diferentes compuestos que forman parte del aroma y sabor de las bebidas alcohólicas los cuales se pueden dividir principalmente en: alcoholes superiores, esterés, carbonilos, metanol, terpenos, furfuralés y misceláneos (ácidos grasos, fenoles, lactonas, compuestos sulfurados).

II.4.1 Alcoholes superiores

Dentro de la fracción volátil más estudiada en vino, encontramos los alcoholes siendo los más abundantes: metanol, etanol, 1-propanol, 2-metilpropanol (alcohol isobutilico), n-butanol, 1-butanol, 2-metil-butanol, 3-metil-butanol, isobutanol, cis-3-hexanol, hexanol, heptanol, alcohol isoamilico y 2-feniletanol (Romero *et al.*, 1986; Arrizon *et al.*, 2006; Molina *et al.*, 2007).

La formación de estos alcoholes suele estar estimulada por el incremento de nitrógeno en el medio, de esta forma la mayor parte de aminoácidos presentes puede ser transformada en dichos alcoholes (Arrizon *et al.*, 2001). La ruta catalítica de biosíntesis de alcoholes superiores es a partir de los aminoácidos que por reacciones de desaminación y descarboxilación se obtiene el aldehído, que será convertido en alcohol superior por medio de la enzima alcohol deshidrogenasa, aunque también se pueden formar por un proceso anabólico de azucares (Arrizon *et al.*, 2006).

La ruta anabólica de la biosíntesis de los alcoholes superiores ocurre cuando se presenta una deficiencia de aminoácidos o de nitrógeno en general, lo que disminuye la cantidad de grupos amino, por lo que los α -cetoácidos no se transaminan, sino que se descarboxilan originando aldehídos que después se convierten a alcoholes superiores.

Las concentraciones de los alcoholes dependen de un gran número de factores, entre ellos, la variedad de la uva (en el caso del vino), o del agave (en el caso de bebidas elaboradas con esta planta), las operaciones pre-fermentarias y el control de la temperatura (Romero *et al.*, 1986). Algunos alcoholes fuertemente aromáticos como el 1-propanol, 2-metil 1-propanol (isobutanol), 1-butanol, 2-metil 1-butanol y 3-metil 1-butanol (alcoholes amílicos), son frecuentemente encontrados en bebidas alcohólicas tales como tequila y mezcal.

II.4.2 Ésteres

Los ésteres se caracterizan por otorgar sabores y olores afrutados, además de que presentan umbrales de detección muy bajos. Su formación se produce en las fases finales de la fermentación, lo contrario a los alcoholes superiores que se presentan al inicio, su formación es controlada enzimáticamente por la acetil coenzima A. Su formación también dependerá de las condiciones de fermentación y de las levaduras utilizadas, siendo el más abundante en las bebidas alcohólicas el acetato de etilo.

La síntesis del acetato de etilo en *S. cerevisiae* se realiza por medio de la enzima alcohol acetil transferasa, la cual combina una molécula de acetato proveniente del acetil-coA y una molécula de etanol. La cantidad de acetato de etilo puede verse reducida por acción de las estererasas, las cuales

realizan hidrólisis de esteres alifáticos y aromáticos, además de participar en la liberación de ácidos grasos de cadena mediana a partir de lípidos.

La síntesis de estos también puede estar relacionada con la cantidad de aminoácidos, y cuando la concentración de amino-nitrógeno es alta la concentración de ácidos grasos disminuye provocando menos inhibición en la enzima alcohol-acetil-transferasa (Arrizon *et al.*, 2006).

Dentro de la elaboración del vino la formación de los ésteres depende de las levaduras empleadas, las condiciones del medio y en especial de la temperatura. Los ésteres más abundantes en vinos son: acetato de etilo, butanoato de etilo, acetato de metilo, acetato de hexilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo, succinato de dietilo, acetato de 2-feniletilo, acetato de isoamilo, lactato de etilo y laurato de etilo (Romero *et al.*, 1986; Molina *et al.*, 2007).

II.4.3 Acetaldehído

Los cetoácidos son esenciales para la síntesis de los aminoácidos, también juegan un papel importante en la formación de los alcoholes superiores. Además suelen funcionar como intermediarios cuando los aldehídos son formados por levaduras. La falta de nutrientes o cualquier elemento que disminuya la viabilidad y/o actividad de las levaduras generan un aumento en la concentración de aldehídos, ya que la reacción de fermentación queda incompleta y se detiene a nivel aldehído.

El acetaldehído es el compuesto que más se genera en la fermentación alcohólica, su biosíntesis se lleva a cabo por la enzima piruvato descarboxilasa. Sin embargo, los aldehídos no solo son generados por biosíntesis sino que además pueden ser producidos por reacciones de oxidación reducida durante el añejamiento. En este proceso ocurre una auto-oxidación ya que la presencia de ciertos minerales en las barricas propicia a catalizar la oxidación de los alcoholes para la producción de aldehídos. Durante el proceso fermentativo del vino encontramos la formación de: acetoinas, ácido acético, y acetaldehídos como los más abundantes de esta fracción de compuestos volátiles (Arrizon *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 1986).

II.4.4 Metanol

El metanol se origina principalmente en la etapa de cocimiento (en el caso del mosto de agave) por la degradación de las pectinas presentes en las piñas. En el caso del tequila es posible que algunas especies de levaduras tengan la enzima pectin-metil-esterasa y sean capaces de hidrolizar pectinas y a partir de ellas generar metanol, debido a reportes que diferentes mostos con la misma composición fermentados con distintas cepas presentaron diferentes concentraciones de metanol (Arrizon *et al.*, 2001).

II.4.5 Terpenos

Los terpenos se encuentran presentes en el agave, de forma libre o glicosidada (monoterpenos o sesquiterpenos). Esta última por medio de la enzima β -glicosidasa presente en algunas levaduras, que puede hidrolizar estos compuestos liberando a los monoterpenos y de esta forma creando características a la bebida. Además de esta hidrólisis, se ha reportado que en algunas levaduras como es el caso de *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* y *K. lactis* ocurre una biotransformación de un monoterpeno a otro durante la etapa de fermentación, para la producción de vinos y cerveza, ocasionando un cambio en las notas aromáticas de la bebida (Segura *et al.*, 2010). Dentro de las investigaciones realizadas y centralizadas en el análisis de los compuestos volátiles presentes en distintos mezcales se ha encontrado terpenos tales como: α -terpineol, citronelol, linalool, trans-linalool oxidado, cis-linalool oxidado, farnesol isómero α , nerolidol, y limoneno (Molina *et al.*, 2007; De Leon *et al.*, 2006). Los vinos aromáticos deben su aroma, en gran parte, a los alcoholes terpénicos. Los componentes principales son: nerol, geraniol, citronelol, linalol, y terpineol. Sus concentraciones suelen ser más bajas que las de los alcoholes superiores y los ésteres, no obstante su repercusión en el aroma es muchísimo más importante (Romero *et al.*, 1986; Molina *et al.*, 2007).

II.4.6 Furanos

Los furanos son compuestos de origen variado, en general provenientes del procesamiento térmico de la materia prima utilizada en la elaboración de la bebida, como el caso del 2-furfuraldehído y el 5-hidroximetil 2-furfuraldehído, que se originan principalmente en la degradación térmica de los carbohidratos durante la cocción del agave (Molina *et al.*, 2007).

La mayoría de los mezcales contienen compuestos volátiles similares a los que suelen presentarse en el tequila y otras bebidas alcohólicas destiladas. Sin embargo, los mezcales contienen compuestos únicos como el limoneno y el pentil-butanoato, que pueden ser usados como rasgo característico de esta bebida (De León *et al.*, 2006). En el mezcal y en el tequila hay compuestos volátiles (aromáticos) en concentraciones relativamente altas (volátiles mayoritarios), principalmente metanol y alcoholes superiores (De León-Rodríguez *et al.*, 2006) que son tóxicos, por lo que están regidos por las normas oficiales mexicanas NOM-070-SCFI-1994 y NOM-006-SCFI-2005. Además, contienen volátiles en concentraciones bajas (volátiles minoritarios), como ésteres, aldehídos, cetonas, ácidos, furanos y terpenos (De León-Rodríguez *et al.*, 2006), que contribuyen al aroma del mezcal y del tequila. Los compuestos volátiles tienen diferente origen: a) Pueden estar contenidos en la materia prima y variar entre especies, regiones geográficas y entre condiciones climáticas de cultivo; o b) Pueden generarse durante la fermentación en función de la cepa, características del mosto y condiciones del proceso, o durante la maduración del producto.

Debido a la naturaleza artesanal del proceso de producción del mezcal, es frecuente encontrar tantos procesos como palenques (fabricas artesanales), lo que da lugar a diferentes calidades de materias primas y a modificaciones en los procesos. La variedad de procesos influye directamente en la concentración de aromáticos del mezcal, principalmente en los compuestos mayoritarios, como alcoholes superiores y metanol que son tóxicos en altas concentraciones (Vera Guzmán *et al.*, 2009). En la literatura existe escasa información referente a la composición del mezcal, la mayoría de los reportes están relacionados con tequila y otras bebidas alcohólicas. Se han reportado más de 175 componentes que fueron clasificados por su naturaleza química en: acetales, ácidos, alcoholes, aldehídos, ésteres, furanos, fenoles, pirazinas compuestos sulfurados, terpenos, entre otros; siendo los más abundantes los alcoholes, ésteres y ácidos, en una variedad amplia de constituyentes en cada familia, esto en tequila. También se han reportado los principales agentes odorantes del tequila analizando: isovalerialdehído, alcohol isoamílico, β -damascenona y vainillina (Molina Guerrero *et al.*, 2007).

En el caso de mezcal y su composición de la valoración cuantitativa de componentes relacionados a la norma oficial e identificación de volátiles se han identificado 37 componentes, de los cuales nueve de ellos fueron clasificados como componentes mayoritarios, donde se encuentran alcoholes saturados, acetato de etilo, 2-hidroxipropanoato de etilo y ácido acético. Los componentes minoritarios suelen ser a su vez otro tipo de alcoholes, aldehídos, cetonas, etil-ésteres de cadena larga, ácidos orgánicos, furanos, terpenos, entre otros (De León *et al.*, 2006).

El análisis de compuestos volátiles en bebidas alcohólicas presenta un problema analítico complejo, desde su aislamiento, caracterización e interpretación de su efecto sobre las características sensoriales finales. Ferreira y *col.* Han reportado que se han identificado aproximadamente 800 componentes en vinos mediante técnicas de detección olfatómica y cromatografía de gases, de los cuales, se han identificado de 40 a 50 compuestos como los principales agentes responsables de la producción de aromas. La caracterización de la composición de bebidas alcohólicas ofrece ventajas en su procesamiento y en sus propiedades sensoriales finales, en la selección de cepas de levaduras por la producción de terpenos, en la selección de barricas para los procesos de reposo, añejamiento y en el efecto de la región de cultivo de la materia prima sobre el contenido de odorantes importantes (Molina *et al.*, 2007).

Cuadro 1 Compuestos volátiles analizados en diversas bebidas alcoholicas.

Comp. Volátil	Compuesto	Nota Aromática	Bebida alcohólica analizada	Autor
	Dietil acetal	Frutal	Mezcal, Tequila, Calvados, Aguardiente de caña	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); Guichard <i>et al.</i> , (2003); Nobrega (2003)
Acetales	1,3-dietoxi propan-1-ol		Mezcal, Calvados y Coñac	
	1,1-dietoxipentano		Mezcal, Calvados y Coñac	
	1,1-dietoxiheptano		Mezcal, Calvados y Coñac	
	1,1-dietoxioctano		Mezcal, Calvados y Coñac	
	1,1-dietoxinonano		Mezcal, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004)
	Ácido acético	Vinagre	Mezcal, Tequila, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006); Benn y Peppard (1996); López y Dufour (2001); López <i>et al.</i> , (2002); Ledauphin <i>et al.</i> ,(2004); Patel y Shibamoto (2002)
	Ácido propanoico	Frutal, ácido, floral	Mezcal, Tequila, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006); López y Dufour (2001); López <i>et al.</i> , (2002); Ledauphin <i>et al.</i> ,(2004); Patel y Shibamoto (2002)
	Ácido 2-metil propanoico	Frutal, sudor, grasa, fenolico, pies	Mezcal, Tequila, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); López y Dufour (2001); Ledauphin <i>et al.</i> ,(2004); Patel y Shibamoto (2002); Selli <i>et al.</i> ,(2006); Aznar <i>et al.</i> , (2001)
Ácidos	Ácido butanoico	Grasa, rancio, queso, dulce	Mezcal, Tequila, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); López y Dufour (2001); López <i>et al.</i> , (2002); Ledauphin <i>et al.</i> ,(2004); Patel y Shibamoto (2002); Selli <i>et al.</i> ,(2006); Aznar <i>et al.</i> , (2001)
	Ácido 2-metil butanoico	Frutal, sudor	Mezcal, Tequila, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); Ledauphin <i>et al.</i> , (2003); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004)
	Ácido pentanoico		Mezcal, Tequila, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006); Benn y Peppard (1996); López y Dufour (2001); López <i>et al.</i> , (2002); Ledauphin <i>et al.</i> ,(2004)
	Ácido hexanoico	Levadura, sidra, seta, pasto, frutal, queso	Mezcal, Tequila, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006); Benn y Peppard (1996); López y Dufour (2001); López <i>et al.</i> , (2002); Ledauphin <i>et al.</i> ,(2003); Ledauphin

	Ácido heptanoico			Mezcal, Tequila	<i>et al.</i> ,(2004); Patel y Shibamoto (2002); Aznar <i>et al.</i> , (2001)
	Ácido octanoico	Ácido graso, seco, sudor, queso		Mezcal, Tequila, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); López <i>et al.</i> , (2002) Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); López y Dufour (2001); López <i>et al.</i> , (2002); Ledauphin <i>et al.</i> , (2003); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004); Patel y Shibamoto (2002); Selli <i>et al.</i> , (2006); Aznar <i>et al.</i> , (2001); Charles <i>et al.</i> , (2000)
	Ácido nonanoico			Mezcal, Tequila, Vino	Molina <i>et al.</i> , (2007); López <i>et al.</i> , (2002); Selli <i>et al.</i> , (2006)
	Ácido decanoico	Grasa, seco, madera		Mezcal, Tequila, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); López y Dufour (2001); López <i>et al.</i> , (2002); Ledauphin <i>et al.</i> , (2003); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004); Patel y Shibamoto (2002); Selli <i>et al.</i> , (2006)
	Metanol			Mezcal, Tequila	De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006); Arrizon <i>et al.</i> , (2006)
	Etanol			Mezcal, Tequila, Mosto de Uva, Vino	Romero <i>et al.</i> , (1986); Arrizon <i>et al.</i> , (2006)
	Propanol			Mezcal, Tequila, Mosto de Uva, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006); Benn y Peppard (1996); López y Dufour (2001); López <i>et al.</i> , (2002); Mallouchos <i>et al.</i> , (2002); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004); Patel y Shibamoto (2002); Guichard <i>et al.</i> , (2003); Selli <i>et al.</i> , (2006)
Alcoholes	2-metil-1-propanol isobutilico)	(alcohol Dulce, blanqueador, mohoso	químico, chocolate,	Mezcal, Tequila, Mosto de Uva, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006); Benn y Peppard (1996); Mallouchos <i>et al.</i> , (2002); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004); Patel y Shibamoto (2002); Guichard <i>et al.</i> , (2003); Selli <i>et al.</i> , (2006); Charles <i>et al.</i> , (2000)
	1-butanol	Dulce, fusel		Mezcal, Tequila, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006); Benn y Peppard (1996); López <i>et al.</i> , (2002); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004); Patel y Shibamoto (2002); Guichard <i>et al.</i> , (2003); Selli <i>et al.</i> , (2006)
	2-metil-butanol			Mezcal, Tequila, Vino	Molina <i>et al.</i> , (2007); Arrizon <i>et al.</i> , (2006); Romero <i>et al.</i> , (1986)

2-butanol			Mezcal, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004); Guichard <i>et al.</i> , (2003)
3-metilbut-3-en-1-ol			Mezcal, Tequila, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); López <i>et al.</i> , (2002); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004); Selli <i>et al.</i> , (2006)
3-metilbut-2-en-1-ol	Herbal		Mezcal, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004)
Isobutanol			Mezcal, Tequila, Vino	Molina <i>et al.</i> , (2007); Arrizon <i>et al.</i> , (2006); Romero <i>et al.</i> , (1986)
3-metil-1-butanol isoamílico)	(alcohol	Dulce, frutal, fusel, plástico, alcohol, vino, pies, mohoso	Mezcal, Tequila, Mosto de Uva, Vino, Agua ardiente de caña, Calvado y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006); Benn y Peppard (1996); López y Dufour (2001); López <i>et al.</i> , (2002); Mallouchos <i>et al.</i> , (2002) Ledauphin <i>et al.</i> , (2004) Patel y Shibamoto (2002); Guichard <i>et al.</i> , (2003); Selli <i>et al.</i> , (2006); Nobrega (2003)
Pent-4-en-1-ol			Mezcal, Tequila, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); López y Dufour (2001); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004)
3-metil-3-penten-1-ol			Mezcal, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004)
3-metil-1-pentanol			Mezcal, Tequila, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004); Selli <i>et al.</i> , (2006)
4-metil-1-pentanol			Mezcal, Tequila, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); López y Dufour (2001); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004); Selli <i>et al.</i> , (2006)
1-hexanol	Pasto verde, tostado		Mezcal, Tequila, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); López y Dufour (2001); López <i>et al.</i> , (2002); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004); Patel y Shibamoto (2002); Guichard <i>et al.</i> , (2003); Aznar <i>et al.</i> , (2001)
Cis-3-hexanol			Mezcal, Tequila, Vino	Molina <i>et al.</i> , (2007); Arrizon <i>et al.</i> , (2006); Romero <i>et al.</i> , (1986)
4-hexen-1-ol			Mezcal, Tequila, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); López y Dufour (2001); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004)
3-hexen-1-ol			Mezcal	De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006)
Heptanol			Mezcal, Tequila, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004); Selli <i>et al.</i> , (2006)

	Octan-3-ol		Mezcal, Tequila, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); López y Dufour (2001); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004)
	1-Octanol		Mezcal, Tequila, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004); Patel y Shibamoto (2002)
	Oct-1-en-3-ol	Seta, tierra	Mezcal, Tequila, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); López <i>et al.</i> , (2002); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004)
	1-nonanol		Mezcal, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004)
	1-undecanol		Mezcal, Tequila	Molina <i>et al.</i> , (2007); López y Dufour (2001)
	1-hexadecanol		Mezcal, Tequila, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004)
	2-feniletan-1-ol	Floral, rosas, seta, dulce	Mezcal, Tequila, Mosto de Uva, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006); Benn y Peppard (1996); López y Dufour (2001); López <i>et al.</i> , (2002); Mallouchos <i>et al.</i> , (2002) Ledauphin <i>et al.</i> , (2004) Patel y Shibamoto (2002); Guichard <i>et al.</i> , (2003); Selli <i>et al.</i> , (2006) Aznar <i>et al.</i> , (2001); Charles <i>et al.</i> , (2000); Arrizon <i>et al.</i> , (2006)
	6,9-pentadecadien-1-ol		Mezcal	De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006)
	(Z-E) 9,12-Tetradecandien-1-ol		Mezcal	Molina <i>et al.</i> , (2007)
Cetonas	2-butanona		Mezcal	Molina <i>et al.</i> , (2007)
	3-hidroxi-2-butanona		Mezcal, Vino	Molina <i>et al.</i> , (2007); De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006); Charles <i>et al.</i> , (2000)
	3-metil ciclopentanona		Mezcal, Tequila	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996)
	Ciclopen-2-en-1-ona		Mezcal, Tequila, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004)
	Pent-3-en-2-ona		Mezcal, Tequila, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996)
	Ciclopentanona		Mezcal, Tequila	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996)
	Ciclohexanona		Mezcal, Tequila	Molina <i>et al.</i> , (2007); López y Dufour (2001)
	Oct-1-en-3-ona	Seta	Mezcal, Calvados	Molina <i>et al.</i> , (2007); Ledauphin <i>et al.</i> , (2003)
Aldehídos	Acetaldehído	Químico	Mezcal, Tequila, Mosto de Uva	Molina <i>et al.</i> , (2007); De León-Rodríguez

			<i>et al.</i> , (2006); Benn y Peppard (1996); Mallouchos <i>et al.</i> , (2002) Molina <i>et al.</i> , (2007)
	2-metil hexanal		Mezcal
Ésteres	Acetato de metilo		Mezcal, Tequila
	Acetato de hexilo		Mezcal, Vino
	Acetato de etilo		Mezcal, Tequila, Mosto de Uva, Calvados
	Butanoato de etilo	Frutal, banana, piña, fresa	Mezcal, Tequila, Vino, Aguardiente de caña, Calvados y Coñac
	Pentanoato de etilo		Mezcal, Aguardiente de caña
	2-hidroxi-4-metil pentanoato de etilo		Mezcal y Tequila
	Heptanoato de etilo		Mezcal, Tequila, Aguardiente de caña, Calvados y Coñac
	Hexanoato de etilo	Frutal, manzana, banana, fresa	Mezcal, Tequila, Mosto de Uva, Vino, Aguardiente de caña, Calvados y Coñac
	Octanoato de etilo	Fruta madura, dulce, pera	Mezcal, Tequila, Mosto de Uva, Vino, Aguardiente de caña, Calvados y Coñac
	Nonanoato de etilo		Mezcal, Tequila, Aguardiente de caña, Calvados y Coñac
	9-decanoato de etilo		Mezcal, Tequila
	Decanoato de etilo	Dulce, lechería, canela, madera	Mezcal, Tequila, Mosto de Uva, Vino, Aguardiente de caña, Calvados y Coñac

	Dodecanoato de etilo		Mezcal, Tequila, Aguardiente de caña, Calvados y Coñac	Shibamoto (2002); Nobrega (2003) Molina <i>et al.</i> , (2007); De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006); Benn y Peppard (1996); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004); Guichard <i>et al.</i> , (2003); Nobrega (2003)
	Hexadecanoato de etilo		Mezcal, Tequila, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006); Benn y Peppard (1996); López y Dufour (2001); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004); Selli <i>et al.</i> , (2006)
	Octadecanoato de etilo		Mezcal, Tequila, Calvados y Coñac	De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006); López y Dufour (2001); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004)
	Succinato de dietilo		Vino	Romero <i>et al.</i> , (1986)
	Succinato de etilo		Mezcal	Molina <i>et al.</i> , (2007)
	Laurato de etilo		Vino	Romero <i>et al.</i> , (1986)
	Lactato de etilo		Mezcal, Tequila, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006); Benn y Peppard (1996); López y Dufour (2001); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004); Guichard <i>et al.</i> , (2003); Selli <i>et al.</i> , (2006)
	Acetato de 3-metil butilo	Frutal, banana	Mezcal, Tequila, Mosto de Uva, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); Mallouchos <i>et al.</i> , (2002); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004); Selli <i>et al.</i> , (2006); Charles <i>et al.</i> , (2000)
	Butanoato de butilo		Mezcal, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004); Patel y Shibamoto (2002)
	Butanoato de pentilo		Mezcal	De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006)
	Acetato de Isoamilo		Vino	Romero <i>et al.</i> , (1986)
	Acetato de 2-feniletilo	Floral, tepache, frutal, rosas	Mezcal, Tequila, Mosto de Uva, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); López y Dufour (2001); Mallouchos <i>et al.</i> , (2002); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004); Selli <i>et al.</i> , (2006); Charles <i>et al.</i> , (2000)
	Propionato de 2-feniletilo		Mezcal, Calvados	Molina <i>et al.</i> , (2007); Ledauphin <i>et al.</i> , (2003)
Fenoles	Cresol	Dulce	Mezcal, Tequila	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); López y Dufour (2001)
	Isocresol		Mezcal	Molina <i>et al.</i> , (2007)
	Eugenol	Clavo, especias, medicina, bálsamo	Mezcal, Tequila, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); López y Dufour (2001); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004); Aznar <i>et al.</i> , (2001)

	Mequinol (p-guaiacol)	Humo, Fenólico	Mezcal, Tequila	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Pappard (1996)
	Cuminol		Mezcal	Molina <i>et al.</i> , (2007)
Furanos	Furfural	Floral, frutal	Mezcal, Tequila, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006); Benn y Peppard (1996); López y Dufour (2001); López <i>et al.</i> , (2002); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004); Guichard <i>et al.</i> , (2003); Aznar <i>et al.</i> , (2001)
	alcohol furfurílico		Mezcal, Tequila	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); López y Dufour (2001); López <i>et al.</i> , (2002)
	5-metil furfural		Mezcal, Tequila, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006); Benn y Peppard (1996); López y Dufour (2001); López <i>et al.</i> , (2002); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004)
	2-acetil-5-metil furano		Mezcal, Tequila	Molina <i>et al.</i> , (2007); López y Dufour (2001)
	2-etil-5-metil-furano		Mezcal	Molina <i>et al.</i> , (2007)
	5-Hidroximetil furfural		Mezcal, Tequila	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Pappard (1996); López <i>et al.</i> , (2002)
	2-Pentilfurano		Mezcal, Calvados y Coñac	De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004)
Terpenos	α -Terpineol		Mezcal, Tequila, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006); Benn y Peppard (1996); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004); Selli <i>et al.</i> , (2006)
	Citronelol	Dulce, floral	Mezcal, Tequila, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); López y Dufour (2001); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004); Selli <i>et al.</i> , (2006)
	Linalool	Floral, frutal, dulce, especias	Mezcal, Tequila, Vino, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004); Selli <i>et al.</i> , (2006)
	Trans-linalool óxido		Mezcal, Tequila, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004)
	Cis-linalool óxido		Mezcal, Tequila, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004)
	Fernesol isómero a		Mezcal, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004)
	Nerolidol		Mezcal, Tequila, Calvados y Coñac	Molina <i>et al.</i> , (2007); Benn y Peppard (1996); López y Dufour (2001); Ledauphin <i>et al.</i> , (2004)
	Limoneno		Mezcal, Calvados y Coñac	De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006);

	Nerol	Vino	Ledauphin <i>et al.</i> , (2004)
	Geraniol	Vino	Romero <i>et al.</i> , (1986)
	α -Terpineno	Mezcal	De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006)
	Benceno	Mezcal	Molina <i>et al.</i> , (2007)
	Naftaleno	Mezcal, Vino	De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006); Patel y Shibamoto (2002)
Varios	4-etil-1,2-dimetil	Mezcal	
	Metil centeno	Mezcal	
	1,8-nonadieno	Mezcal	De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006)
	1-dodecina	Mezcal	

Como se puede apreciar en el cuadro 1, en el cual se detallan los compuestos que se incluyen en cada una de estas categorías, así como la nota aromática de la cual son responsables además del tipo de bebida en la cual se presentan, la variedad de los diversos compuestos volátiles así como su la concentración en la cual pueden estar presentes es tan variada como las diversas bebidas alcohólicas que se producen actualmente.

II.5 La microbiología de las bebidas alcohólicas

La producción industrial de las bebidas alcohólicas está sujeta a distintas condiciones de estrés durante el proceso de fermentación, lo que produce un decremento en la actividad del crecimiento celular así como en la asimilación de substrato (Hirasawa *et al.*, 2010). Sin embargo, cuando algunas cepas presentan una alta actividad celular bajo estas condiciones estresantes son objeto de un mayor estudio para su manipulación y uso en la implementación y mejoramiento de las fermentaciones. Bioquímicamente en la fermentación los azúcares son transformados a etanol y otros compuestos como alcoholes con tres o más átomos de carbono y ésteres. En general las propiedades organolépticas de una bebida alcohólica son determinadas por la composición de una mezcla de alcoholes, ésteres, y otros compuestos como terpenos provenientes de la planta. Es decir, la variedad de compuestos organolépticos generados en la fermentación, depende del tipo de microorganismo, de la materia prima y de las condiciones de fermentación (Berry *et al.*, 1987; Lachenmeier *et al.*, 2006).

Es conocido que los microorganismos no viven aislados en un determinado espacio y tiempo, sino que coexisten con otras poblaciones, dando con ello el establecimiento de relaciones de cada uno de los microorganismos que tienen efectos en la adecuación biológica de las especies que interactúan, logrando como resultado de ello que los distintos consorcios se propaguen dentro de un ecosistema con dinámicas muy diferentes, lo que dependerá de su potencialidad genética, así como de su capacidad de adaptación a las condiciones ambientales (Lappe *et al.*, 2008). Por esto, es importante considerar las posibles interacciones entre los microorganismos aislados de los microsistemas, los cuales comúnmente muestran altos niveles de interacciones no lineales que se presentan en dicho proceso de fermentación durante la producción de la bebida alcohólica.

Aunque estas interacciones pueden ir desde el antagonismo a la sinergia entre microorganismos y puede depender, además, de los grupos microbianos y de las especies involucradas, del tipo de sustrato y su disponibilidad, se ha encontrado que la fermentación alcohólica de la mayoría de las bebidas suele ser llevada a cabo mayormente por *Saccharomyces cerevisiae*, destacando esta como la iniciadora y principal productora durante este proceso, sin embargo cabe mencionar que dicho microorganismo suele ser apoyado por una gran microbiota nativa de levaduras, que confieren esas características organolépticas especiales así como únicas de cada uno de los productos elaborados durante la

fermentación (Fleet *et al.*, 1984, 2003). Dicha composición de la microbiota que participa en el proceso de la fermentación dependerá de los siguientes factores: la región de origen del material vegetal, el procedimiento de producción, la concentración inicial de células, la temperatura y la concentración de etanol presente. Es por tanto que una parte de las propiedades organolépticas son también el resultado de la frecuencia de aparición de los organismos, así como por esos factores limitantes o factores regionales de origen de cada uno de los sustratos empleados para la elaboración de la bebida.

La dinámica poblacional de la flora responsable del proceso fermentativo del mosto en las diversas bebidas tales como vinos de mesa (Pretorius, 2001; Abdel *et al.*, 1999; Xufre *et al.*, 2006), el tequila (Arrizon *et al.*, 2002; Aguilar-Uscanga *et al.*, 2007), el mezcal (De la Torre González 2010; Jaques *et al.*, 2005; Cáceres *et al.*, 2008), el pulque (Estrada *et al.*, 2001), y otras han sido objeto de diversos estudios.

En vinos, se han realizado estudios sobre la influencia de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en la formación de compuestos volátiles en la fermentación (Pretorius, 2001; Abdel *et al.*, 1999). Para optimizar la producción de vino y otras bebidas fermentadas se han manipulado genéticamente cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, se sabe que esta levadura interviene en la fermentación y calidad; de tal forma que se han introducido o eliminado características genéticas con la finalidad de que la cepa intervenga en el proceso de fermentación afectando de manera deseable la producción del vino (influyendo en los cambios de acidez volátil, sabores y olores agradables) (Pretorius, 2001; Querol *et al.*, 1990; Pérez *et al.*, 1999).

En tequila la identificación de levaduras nativas se encontró que en el agave fresco la microbiota estaba dominada por *Clavispora lusitanae* y especies endémicas como *Merschnikowia agavaveae*, en *Drosophila spp* encontradas alrededor o dentro de la destilería se identificó *Hanseniaspora spp.*, *Pichia kluyveri* y *Candida krusei.*, en melazas *Schizosaccharomyces pombe*, en agave cocido y mostos una considerable diversidad de especies incluida *Saccharomyces cerevisiae*, en mostos fermentados se encontró baja la heterogeneidad de especies, encontrando al inicio de la fermentación a *Torulaspora delbrueckii*, *Kluyveromyces marxianus* y *Hanseniaspora spp*, progresivamente en el tiempo se encontró a *S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida milleri* y *Brettanomyces spp.*, concluyendo que la principal fuente de inóculo para el proceso de fermentación son los tanques de fermentación (Arrizon *et al.*, 2002).

En el caso de la micoflora, debe recordarse que la actividad que llevan a cabo las levaduras no se limita a la producción de etanol, sino que también participan en los rasgos característicos organolépticos de cada producto, de ahí el interés por estudiar los organismos presentes durante la fermentación que se lleva a cabo en el mezcal. Un ejemplo de este interés es el de Jacques *et al.* (2006) quienes compararon las especies presentes en mostos de mezcal por los métodos moleculares y bioquímicos clásicos, encontrando las especies *S. cerevisiae*, *Candida globata*, *Pichia mexicana*, *P. membranifaciens*,

Issatchenkia orientalis, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Ustilago alcommii*, *Galactomyces geotrichum* y *Clavispora lusitaniae*. En un estudio más reciente, Arratia Mireles (2010) también en mezcal tamaulipeco, caracterizó molecularmente un total de 48 aislamientos pertenecientes a 9 diferentes especies, y se comparó su producción de etanol. Dichos aislamientos se analizaron por rep-PCR y por un análisis filogenético de la región 26S, obteniendo patrones de bandeado que permitieron diferenciar de manera rápida entre levaduras de diferentes especies. Dentro de las especies de levaduras identificadas se pueden mencionar *Saccharomyces cerevisiae*, *K. marxianus*, *Torulaspota delbrueckii*, *Pichia kluyveri*, *C. lusitaniae*, *Pichia guillermondi*, *P. mexicana*, *Candida parapsilopsis* y *Zygosaccharomyces bailii*, y se encontró que todas eran capaces de producir etanol en concentraciones significativas. En el cuadro 2 se muestran los valores máximos de producción de etanol de los diferentes organismos analizados en el estudio de Arratia-Mireles (2010).

En pulque, elaborado de las especies *Agave atrovirens* o *A. americana*, de la flora natural presente en el agua miel han sido encontradas bacterias ácido lácticas homo y heterofermentativas así como *Zymomonas mobilis*, además de las levaduras dichos organismos encontrados con actividad killer y resistencia al mismo, siendo considerados como organismos de potencial aplicación biotecnológico (Estrada *et al.*, 2001).

Cuadro 2 Producción máxima de etanol en el medio de mosto a las 60 horas de las especies: *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Kluyveromyces marxianus* (K.m), y *Torulaspora delbrueckii* (Td) del cepario de levaduras del mezcal LBI.

Especie	Cepa	Producción de etanol (g/L)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sc 4Y3	43
<i>S cerevisiae</i>	Sc 3Y3	49
<i>S cerevisiae</i>	Sc 3Y5	59
<i>S cerevisiae</i>	Sc Mosca3	90
<i>S cerevisiae</i>	Sc 3Y8	27
<i>S cerevisiae</i>	Sc D5	73
<i>S cerevisiae</i>	Sc 1D1	31
<i>S cerevisiae</i>	Sc 3Y4	57
<i>S cerevisiae</i>	Sc D4	47
<i>S cerevisiae</i>	Sc Mosca 1	39
<i>S cerevisiae</i>	Sc 3Y2	70
<i>S cerevisiae</i>	Sc D6	64
<i>S cerevisiae</i>	Sc D3	64
<i>S cerevisiae</i>	Sc mosca 6	51
<i>S cerevisiae</i>	Sc D2	58
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Km 4D2	49
<i>K. marxianus</i>	Km mosca 5	5
<i>K. marxianus</i>	Km 4D5	32
<i>K. marxianus</i>	Km 1Y11	28
<i>K. marxianus</i>	Km 4D4	29
<i>K. marxianus</i>	Km 1AN6	32
<i>K. marxianus</i>	Km mosca 7	28
<i>K. marxianus</i>	Km 4D3	4
<i>K. marxianus</i>	Km 1D5	37
<i>K. marxianus</i>	Km 1Y9	50
<i>K. marxianus</i>	Km 4Y2	6
<i>K. marxianus</i>	Km 1Y1	7
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Td 1AN5	4.6
<i>T. delbrueckii</i>	Td 1D2	60
<i>T. delbrueckii</i>	Td 1AN1	30
<i>T. delbrueckii</i>	Td 1AN2	55
<i>T. delbrueckii</i>	Td 1AN9	33

Datos tomados la tesis de maestria de Arratia Mireles (2010).

Por lo tanto, el proceso fermentativo es y debe ser considerado de gran interés, por ser crucial para la industria productora de las diferentes bebidas alcohólicas, y de igual importancia resulta ser conocer en lo posible la diversidad de la microflora involucrada y sus interacciones existentes entre la gran gama de organismos que trabajan en conjunto y que producen las características específicas como el cuerpo, sabor y olor de las diversas bebidas alcohólicas.

Todo lo anterior ha permitido incrementar y continuar con la elucidación del conocimiento acerca de la microflora presente durante el proceso de elaboración de las bebidas tal como es el caso del mezcal tamaulipeco, cuya producción empieza a tener impacto en la economía de la región. En este sentido, es necesario continuar los esfuerzos dirigidos al conocimiento de las diferentes poblaciones de microorganismos involucrados, así como la comprensión de la importancia de cada uno durante el proceso, y ampliar el conocimiento básico de la fermentación durante la elaboración de las diversas bebidas. En resumen, la diversidad de microorganismos que participan o se encuentran en las diversas bebidas es tan grande y variada como los sabores o las diferentes bebidas que se producen como lo muestra a continuación el cuadro 3.

Cuadro 3. Microorganismos encontrados en las diversas bebidas alcoholicas.

Sustrato	Proceso fermentativo	Microorganismos	Observaciones relevantes	Autores
	Vino	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>S. bayanus</i> , <i>S. pastorianus</i> , <i>S. paradoxus</i>	Uso de la técnica para la correcta caracterización de cepas de levaduras <i>Saccharomyces</i> las cuales son utilizadas en la elaboración de alimentos.	Montrocher <i>et al.</i> , (1998)
	Vino e instalaciones vinícolas	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Dekkera bruxellensis</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>P. membranifaciens</i>	Investigación de la variación genética en cepas comerciales de levaduras, tipos de cepas así como especies aisladas de la industria vinícola.	De Barros <i>et al.</i> , (1999)
	Vino	<i>Kloeckera</i> , <i>Metschnikowia</i> , <i>Candida</i> , <i>Hanseniaspora</i> , <i>Saccharomyces</i> , no- <i>Saccharomyces</i> (<i>Kloeckera</i> , <i>Metschnikowia</i> , <i>Candida</i> , <i>Hansenula</i>).	Diversidad presente en la fermentación del vino.	Cocolin <i>et al.</i> , (2000)
Jugos de frutas y de tallos	Vino	<i>Candida</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Pichia</i> , <i>Schizosaccharomyces</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Hansenula</i> .	Diferenciamiento entre especies de levaduras no- <i>Saccharomyces</i> .	Capece <i>et al.</i> , (2003)
	Vino portugués de uva de variedad Castelaó.	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>H. vanae</i> , <i>Torulaspóra delbrueckii</i> , <i>Candida stellata</i> , <i>Zygoascus hellenicus</i> , <i>Pichia kluyveri</i> , <i>Saccharomycodes ludwigii</i> , <i>Zygosaccharomyces bailii</i> , <i>Issatchenkia</i> , <i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	Seguimiento de la dinámica poblacional de levaduras durante la fermentación de vino tinto.	Baleiras <i>et al.</i> , (2005)
	Vino blanco y tinto.	<i>Candida stellata</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>H. guillermondii</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>K. thermotolerans</i> , <i>Torulaspóra delbrueckii</i> , <i>Pichia anómala</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	Detección de levaduras no- <i>S. cerevisiae</i> diferentes presentes a lo largo de la fermentación natural.	Xufre <i>et al.</i> , (2006)
	Sidra	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Hanseniaspora valbyensis</i> , <i>Metschnikowia pucherrima</i> , <i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Zygosaccharomyces</i> , <i>Torulaspóra</i> , <i>Candida</i> , <i>Pichia</i> , <i>Brettanomyces</i> , <i>Hansenula</i> .	En fermentaciones naturales, sin embargo, es más común el uso de inóculos puros de <i>S. cerevisia</i> para la producción de esta bebida.	Johansen (2000)

Técnica	Proceso fermentativo	Microorganismo	Observaciones relevantes	Autores
Mostos de Agave	Tequila	<i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Merschnikowia agavaveae</i> , <i>Hanseniaspora</i> spp., <i>Pichia kluyveri</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Torulaspota delbrueckii</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Zygosaccharomyces bailii</i> , <i>Candida milleri</i> y <i>Brettanomyces</i> spp.	Identificación de las levaduras en el <i>Agave</i> fresco, en <i>Drosophila</i> spp alrededor y dentro de la destilería, en melazas, <i>Agave</i> cocido y finalmente en mostos fermentados.	Arrizon <i>et al.</i> , (2002)
	Tequila	<i>C. lusitaniae</i> , <i>K. marxianus</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>S. cerevisiae</i> .		De León-Rodríguez <i>et al.</i> , (2006)
	Mostos del agave (tequila, mezcal), sotol, raicilla.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>S. bayanus</i> , <i>S. paradoxus</i> , <i>S. pastorianus</i> .	Mosto fermentado naturalmente.	Flores Berrios <i>et al.</i> , (2005)
	Mezcal	<i>Candida conglobata</i> , <i>Pichia mexicana</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>Ustilago alcommii</i> , <i>Galactomyces geotrichum</i>	Fermentación natural	
	Mezcal (<i>Agave salmiana</i>)	<i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , bacterias <i>Zymomonas mobilis</i> , <i>Weissella paramesenteroides</i> , <i>Lactobacillus pontis</i> , <i>L. kefri</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. farraginis</i> .	Identificación de levaduras y bacterias presentes durante la fermentación.	Escalante-Minikata <i>et al</i> (2008)
	Mezcal	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>K. marxianus</i> , <i>Torulaspota delbrueckii</i> , <i>Pichia kluyveri</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>Pichia guilliermondi</i> , <i>P. mexicana</i> , <i>Candida parapsilopsis</i> y <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Identificación de las levaduras en el proceso de trapiche, en <i>Drosophila</i> spp, inicio y termino del proceso fermentativo. Fermentación natural.	Arratia 2010
	Mezcal	<i>Pediococcus parvulus</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>L. composti</i> , <i>L. parabuchneri</i> , <i>L. plantarum</i>	Fermentación natural.	Narváez Zapata <i>et al.</i> , (2010)
	Pulque	<i>Zymomonas mobilis</i> ,	Flora natural presente en el agua miel.	Estrada <i>et al.</i> , (2001)
	Pulque	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> spp <i>mesenteroides</i> , <i>Zymomonas mobilis</i> spp., <i>Candida</i> spp., <i>C. parapsilosis</i> , <i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>K. marxianus</i> , <i>K. lactis</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Pichia</i> spp., <i>T. delbrueckii</i> , <i>S. bayanus</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. paradoxus</i>	En fermentación espontanea.	Lappe y Ulloa (1993); Steinkraus (1997); Ramírez <i>et al.</i> , (2004)
	Raicilla	<i>C. lusitaniae</i> , <i>K. marxianus</i> , <i>S. cerevisiae</i> .		Arrizon <i>et al.</i> , (2007)

Mosto de arroz Balines	Brem, (sake).	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Pichia anómala</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> .	Fermentación natural con 1 semana de haber iniciado.	Sujaya <i>et al.</i> , (2004)
	Cachaça	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida sp.</i> , <i>Pichia heimi</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Candida maltosa</i> ,	Identificación de organismos del proceso fermentativo de 15 destilerías. Aislados de una fermentación natural y artesanal muestreando el inicio, mediados y final de la fermentación	Pataro <i>et al.</i> , (2000); Schwan <i>et al.</i> , (2001)
	Cachaça	<i>Candida azyma</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. incommunis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. rugopelliculosa</i> , <i>C. bombicola</i> , <i>Kloeckera japonica</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. exiguous</i> , <i>S. kluyveri</i> .	Aislado e identificación de levaduras durante las primeras 24 h del ciclo fermentativo natural de tres destilerías.	Guerra <i>et al.</i> , (2001)
Caña de azúcar	Cachaça	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , No-S. <i>cerevisiae</i> (<i>Schizosaccharomyces spp.</i> , <i>Kluyveromyces spp.</i> , <i>Hansenula spp.</i> , <i>Hanseniaspora spp.</i>).	Aislado e identificación de 10 alambiques en distintas ciudades de Brasil. Inoculo de levadura silvestre o con una levadura de la colección de fisiología microbiológica.	Bernardi <i>et al.</i> , (2008)
	Cachaça	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida milleri</i> , <i>Pichia caribica</i> , <i>P. guilliermondii</i> , <i>Zygosaccharomyces fermentati</i> (<i>Lachancea fermentati</i>), <i>Candida sp.</i> , <i>Candida drosophilae</i> , <i>C. ubatubensis</i> , <i>Zygosaccharomyces sp.</i>	Inicio de la fermentación con las levaduras nativas del sustrato.	Vila Nova <i>et al.</i> , (2009)

II.5.1 Sucesión poblacional microbiana durante la fermentación alcohólica

El proceso de fermentación alcohólica espontánea como muchos otros procesos no suele ser llevada por un solo tipo de organismo, sino que es producto de la actividad de una diversa cantidad de organismos, lo que implica, que pueden presentarse diferentes tipos de interacciones entre ellos. Es posible que se presente neutralismo, en el caso de que los organismos participantes consuman diferente fuente de substrato.

Cuando dos organismos necesitan una misma fuente de carbono estos compiten por obtener dicho substrato, debido a que en el momento en que uno lo consuma se presentará un efecto negativo para el otro microorganismo. En ocasiones este tipo de efectos negativos puede llevar a un punto donde uno de las especies involucradas puede verse afectada presentándose algún tipo de depredación o parasitismo (Zagorc *et al.*, 2001). Sin embargo, esta interacción puede otorgar características que contribuyan en propiedades organolépticas al producto final, como por ejemplo en el vino tinto, en donde se da la interacción entre levaduras y bacterias ácido lácticas, llevándose a cabo primero la fermentación alcohólica y la proliferación de levaduras, y al término de la cual se produce la fermentación ácido láctica, lo que confiere al vino olores, colores, y un sabor característico. Es por ello de considerar los microorganismos nativos presentes en la periferia de la uva, en los tanques empleados para la fermentación así como los instrumentos que intervienen en la elaboración del vino que pueden contribuir de manera especial en las características y composición química del producto de la fermentación (Fleet, 2003).

Se ha observado que durante el proceso de fermentación se presenta un crecimiento inicial y posterior muerte de levaduras del género *Kloeckera* y *Hanseniospora*, seguido esto por el incremento de la población de *S. cerevisiae*, la cual domina la fermentación alcohólica en la mayoría de los casos, debido al incremento del estrés osmótico que produce el incremento de las concentraciones de etanol (Fleet *et al.*, 1984). Sin embargo algunos organismos a pesar de tener una tolerancia máxima al etanol de 6 % v/v pueden persistir debido a diferentes factores como son la temperatura de fermentación, la viabilidad de nutrientes, el inóculo inicial, los niveles de dióxido de sulfuro así como el número y tipo de organismos presentes (Fleet *et al.*, 2003). Este tipo de interacciones suelen comenzar con interacciones de levadura-levadura, presentándose en los estadios tempranos de fermentación alcohólica en la producción de vinos, por lo menos en los primero dos o tres días de la fermentación, y posteriormente es posible observar un decaimiento de las levaduras no-*Saccharomyces* conforme avanza el tiempo mientras que *Saccharomyces cerevisiae* se mantiene por el resto del proceso fermentativo mostrando con ello el aumento en la concentración de etanol (Pina *et al.*, 2004b). Sin embargo este tipo de relación puede modificarse al adicionar un substrato diferente que maneje la fermentación como galactosa o melobiosa,

fuentes de carbono que *S. cerevisiae* no puede utilizar pero sí *S. bayanus* (*S. ovarum*) que en este caso puede predominar en la fermentación (Nadal *et al.*, 1996).

El establecimiento de cultivos con poblaciones simultáneas o secuenciales requiere que se presenten diferentes tipos de factores, dentro de los que se pueden mencionar compatibilidad bioquímica y fisiológica de las especies presentes (Navarrete Bolaños *et al.*, 2007), así como la tolerancia para diferentes tipos de estrés como los inducidos por temperatura, luz y radiación, o en algunos casos la tolerancia al uso de inhibidores químicos. Estas interacciones suelen presentarse de una manera tal que pareciese mostrar una ruta definida para estos organismos, como por ejemplo el hecho de que las levaduras *no-Saccharomyces* suelen ser las primeras en incrementar su población durante la fermentación, consumiendo las vitaminas y aminoácidos y con ello limitando en teoría el desarrollo de *Saccharomyces*, sin embargo, al alcanzar estas su límite de tolerancia a la concentración de etanol suelen sufrir una autólisis, liberando nutrientes que sirven como sustrato iniciador para *Saccharomyces* así como también proporcionan manoproteínas, relacionadas con taninos y antocianinas que producen un impacto en la astringencia y el color del vino. En algunos casos se presenta el fenómeno *killer*, que puede dañar a todo un grupo de organismos dicho fenómeno es comúnmente encontrado en organismos como *Candida* spp, *Pichia* spp y *Hanseniaspora* (Fleet, 2003), y en *Saccharomyces cerevisiae*. Por otra parte se debe considerar la posible sucesión de las bacterias acéticas, que en interacción con algunas levaduras y con bacterias lácticas pueden producir alguna alteración en vinos conocidas como enfermedades del vino. Adicionalmente pueden considerarse también la interacción de las levaduras con los mohos (hongos filamentosos), especialmente aquellas especies que pueden desarrollarse sobre la uva y en las vides causando mermas importantes en la cantidad y calidad de la uva (Mesas *et al.*, 1999). Los mohos más comunes en las uvas son especies de los géneros *Botrytis*, *Uncinula*, *Alternaria*, *Plasmopora*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Oidium* y *Cladiosporium*, los cuales presentan una alta posibilidad de tener una interacción entre levaduras y hongos, la cual puede producir una serie diferente de metabolitos que suele provocar disturbios ecológicos y retardo en el crecimiento de levaduras, debido a que el crecimiento de hongos puede producir condiciones favorables para el desarrollo de bacterias ácido lácticas, las cuales producen niveles elevados de ácido acético así como otros compuestos que ocasionan el retardo del crecimiento de las levaduras (Fleet, 2003).

Las diferentes interacciones entre microorganismos pueden provocar efectos negativos, como un retraso o paro de la fermentación, pudrición del vino durante su almacenado en la cava o después de su envasado. Sin embargo, también puede producir un efecto positivo el cual consiste en la conducción de la fermentación maloláctica, proceso secundario de la fermentación donde las bacterias hacen uso de los compuestos malolácticos producidos por la levadura mostrando con ello el refinamiento y una magnífica calidad del vino. Estas relaciones son conducidas por bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus* spp., *Pediococcus* sp. y *Oenococcus* sp) y ácido acéticas (*Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* y

Gluconobacter oxidans). Sin embargo debido a la vigorosa fermentación este tipo de bacterias suele presentarse en crecimientos bajos a niveles no detectables (Fleet, 1984 y 2003).

II.6 Metodologías de estudio de las sucesiones microbianas

Tomando en cuenta los efectos positivos de la presencia de diferentes microorganismos en el sistema de fermentación alcohólica, es importante conocer su identidad y prevalencia para poder inferir su participación en las características bioquímicas y organolépticas finales del producto. Una manera de conocer la identidad de los microorganismos es mediante técnicas clásicas basadas en pruebas bioquímicas y morfológicas. En las últimas décadas se han generado nuevas técnicas basadas en el análisis de ADN microbiano que permiten diferenciar de forma rápida y segura distintas cepas de una misma especie, lo que proporciona la información necesaria para el seguimiento del proceso fermentativo. A continuación se hace una revisión de las metodologías que han sido utilizadas para estudiar las sucesiones microbianas en sistemas de fermentación alcohólica.

II.6.1 Técnicas clásicas para el estudio de poblaciones microbianas

Para el estudio de poblaciones microbianas durante un proceso por técnicas clásicas, existe todo un protocolo para asegurar la correcta caracterización de las poblaciones microbianas presentes, y el cual requiere que la toma de muestra sea conservada a una temperatura de 4 °C para evitar cambios en la composición original de la población, o de preferencia realizar el aislamiento *in situ*, siendo más fácil su transporte en medio sólido. Una vez que se obtienen colonias individuales, se realiza la purificación y un primer análisis visual de cada uno de los diferentes tipos de colonias presentes registrando, las características de morfología macroscópica, como pigmentación de la colonia, margen y textura de la colonia, forma celular, entre otras. Cada colonia analizada también es sometida a análisis microscópico para identificar la morfología celular posibilitando con ello la identificación a nivel de género y en algunos casos la especie de organismo. Sin embargo el análisis visual no proporciona una identificación contundente excepto en el caso de colonias típicas, por lo cual se debe hacer uso de pruebas bioquímicas, debiendo registrar resultados positivos o negativos de las distintas pruebas, como formación de gas (CO₂), asimilación de diferentes fuentes de carbono, cambio de coloración del medio por degradación de sustrato. En conjunto las características morfológicas y las pruebas bioquímicas deberán permitir identificar con certeza el género y la especie del organismo. Sin embargo, algunos microorganismos comparten las mismas características físicas y bioquímicas de asimilación de fuente de carbono, por tanto se procede a un análisis de consumo de fuente de nitrógeno. Dentro de los análisis fisiológicos se pueden listar también la síntesis de compuestos amiláceos, temperatura máxima de crecimiento, producción de ureasa, entre otras. Por otro lado en la biotecnología moderna el género y

especie no son suficientes para referirse a un organismo, si no que es de importancia conocer la cepa como tal, para lo que son de utilidad algunas técnicas empleadas en la actualidad como las que a continuación se describen.

II.6.2 Técnicas moleculares para el estudio de poblaciones microbianas

El gran avance que se ha desarrollado en la biología molecular ha permitido estudiar y caracterizar a los diferentes microorganismos desde la unidad molecular más básica, el ADN. Para la detección e identificación de un microorganismo mediante técnicas moleculares, es necesario en la gran mayoría de los casos extraer ADN ó ARN del microorganismo o de la muestra en cuestión, generalmente seguido por la amplificación de regiones específicas mediante la técnica de PCR, y la detección del producto amplificado, el cual, en casos de identificación, puede ser secuenciado y comparado con secuencias conocidas en el GenBank, permitiendo un estudio de los diversos genes que pueden diferenciar un organismo de otro teniendo así una idea más clara de la diversidad de microorganismos presentes en un sistema determinado y específico.

Dentro de estas técnicas se ha reportado el uso de marcadores moleculares en levaduras para ayudar a elucidar la variabilidad de las especies que pueden o no estar presentes en un sistema. Además, se ha hecho uso de polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) así como una variante de la misma llamada PCR-RFLP la cual ha mostrado ser una metodología rápida y confiable para la identificación y diversificación de levaduras aisladas en el proceso fermentativo (Baleiras *et al.*, 2005; Escalante-Minakata *et al.*, 2008), así como el uso de AFLP, DGGE, RAPD y más recientemente el uso de la técnica de fluorescencia in situ (FISH) la cual permitió la detección así como la sucesión de las diferentes especies de levaduras a lo largo del proceso fermentativo del vino (Xufre *et al.*, 2006).

En el caso de las bacterias presente en los mostos de mezcal, microflora aún menos estudiada que la de levaduras, se tiene el trabajo de Hernández Mota (2010) quien realizó un estudio metagenómico de la flora bacteriana así como el análisis de la acumulación de metabolitos durante la fermentación del mosto del mezcal elaborado en Tamaulipas, encontrando que existe un perfil fermentativo típico de la fermentación alcohólica en la primera fase de esta etapa. El perfil microbiano metagenómico, estudiado por DGGE, mostró que la población microbiana de la fase final de fermentación es muy diferente del resto de las otras etapas de la fermentación, logrando identificar con una correspondencia del 90% a bacterias ácido lácticas de las especies *Lactobacillus parakefiri*, *L. brevis*, *L. similis*, *L. buchneri*, *L. sakei* y *L. plantarum*. Además se lograron identificar otros grupos bacterianos tales como *Methylobacterium organophilum*, *Methylobacterium extorquens*, y *Enterococcus sp* y otras bacterias no cultivables, demostrando con ello además de la presencia de organismos no conocidos, que la diversidad de la gama también difiere dependiendo de cada mosto empleado para la fermentación.

Otro estudio en relación a las bacterias presentes durante la fermentación del mezcal es el trabajo de Narváez Zapata *et al.*, (2010) en el cual se realizó una caracterización de la comunidad de bacterias ácido lácticas así como el análisis de la acumulación de metabolitos durante el proceso fermentativo. El perfil estudiado por DGGE logró identificar *Pediococcus parvulus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus composti*, *Lactobacillus parabuchneri* y *Lactobacillus plantarum*. Demostrando con ello que no solo las levaduras están implicadas en las características organolépticas de esta bebida tradicional mexicana.

II.7 Inóculos (starter) en los procesos fermentativos de las bebidas alcohólicas

Los cultivos estárter son microorganismos viables adicionados a un sustrato, han sido objeto de estudio y desarrollo durante los últimos años con el fin de adicionar ventajas al proceso fermentativo como reducir el tiempo de fermentación y tratar de tener un control del mismo proceso, además del intento de proporcionar el establecimiento de las características organolépticas finales de un producto (González-Fernández *et al.*, 2006).

Un cultivo iniciador puede estar dado por una especie o combinación de especies microbianas las cuales originan un conjunto de transformaciones en los componentes básicos (comúnmente azúcares) teniendo como resultado final una mejora en su calidad y un incremento en su aceptabilidad mediante un cambio de la textura, color, desarrollo de aromas y sabor del producto final. Los microorganismos que suelen emplearse como cultivos estárter pueden ser bacterias, levaduras y mohos, siendo estos adicionados de manera individual o una mezcla de ellos (bacteria-bacteria; bacteria-levadura; bacteria-moho; moho-moho; moho-levadura; levadura-levadura). La bioquímica de las transformaciones que tienen lugar en los sustratos se presenta resumido en el siguiente esquema:

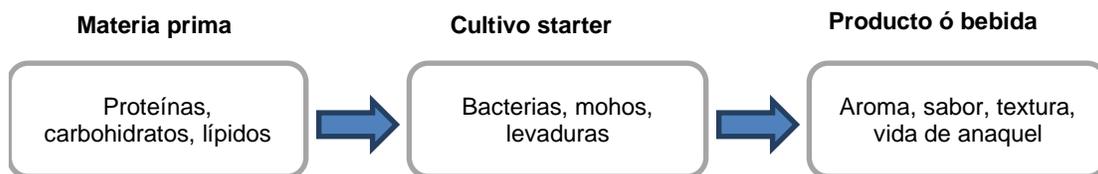


Figura 6. Principio del proceso de interacción materia prima- cultivo estárter- nuevo producto.

Actualmente, debido al incremento en el estudio y potencial uso de este tipo de inóculos, los productores como los candidatos a consumidores de estos cultivos buscan en ellos seguridad, funcionalidad y propiedades tecnológicas como las características deseadas. La diversa gama de organismos que están presentes en los diversos ambientes de nuestro planeta suelen ser candidatos para ser usados como un cultivo estárter. Sin embargo, resultan de mayor interés como cultivos estárter aquéllos que son aislados de la microbiota nativa y del área de elaboración de los productos así como aquellos que son aislados de

los procesos tradicionales, puesto que dichos microorganismos suelen adaptarse de una manera rápida y sin complicaciones a las condiciones medioambientales que puede propiciar el sustrato.

Para la selección de cepas con potencial actividad como cultivo iniciador o *estárter*, debe reunir un conjunto de características a tener en cuenta como las que a continuación se mencionan:

- Evaluar y disponer de información experimental suficiente sobre su metabolismo y actividades, ya que en algunos casos su efecto sobre los sustratos puede ser limitado.
- Que estén reconocidos como seguros, GRAS (FDA, EEUU).
- Tener la capacidad de ser producido en forma viable y en gran escala.
- Durante su uso y almacenamiento, deberán permanecer viables y estables.

Sin embargo, lo que permite en realidad estandarizar y mantener una calidad uniforme del producto final es la correcta selección, conservación, manejo, y resiembra de los cultivos *estárter*. El proceso de formulación de un cultivo *estárter* comienza con la elaboración de un cultivo madre, este cultivo se prepara a partir del cultivo liofilizado o líquido comercial, y parte de la suspensión de la cantidad deseada en la solución adecuada para el fin que se requiera.

La dinámica poblacional de cultivos mixtos y secuenciales en fermentaciones de mostos de frutas es un problema muy interesante desde el punto de vista teórico y tecnológico. Por cultivos mixtos nos referimos a aquellos que se encuentran presentes desde un inicio, siendo estos más de una especie de microbio, y por cultivo secuencial a aquellos que serán añadidas a lo largo de la fermentación. Dichos procesos tienen un papel fundamental en la industria de bebidas fermentadas, de ahí la importancia de su estudio y modelado. Los modelos de estos procesos deben representar la dinámica de múltiples microorganismos y especies que crecen en una mezcla de sustratos, porque el mosto de frutas está formado por una proporción importante de hexosas y pentosas. En las bebidas y en general en los alimentos fermentados un aspecto muy importante y fundamental son las propiedades organolépticas, por ello estudiar la dinámica poblacional y el impacto de estos consorcios microbianos en el perfil de compuestos volátiles, y su influencia en el perfil sensorial. Es tan grande el interés en el conocimiento de aquellos organismos que pueden fungir como *estárter* que estos han sido ya estudiados en distintas áreas de producción. El uso de cultivos *estárter* en las diversas industrias tienen como objetivo principal añadir un fin tecnológico más que uno biológico, es decir, el empleo de algún microorganismo en específico es empleado para lograr características que son deseables en el producto o bebida tanto para el productor como para el consumidor, ya sea que propicie un menor tiempo de elaboración o acelere el proceso de maduración (de ser el caso) y además otorgue características organolépticas únicas y

específicas al producto. Por ejemplo el uso de multi-iniciadores en el proceso fermentativo simula una fermentación natural, además de mostrar una producción de compuesto volátiles, de los cuales algunos son deseables por su producción de aromas, como esteroides, alcoholes superiores entre otros, así como puede propiciar una desacidificación biológica del mosto y el vino como tal, reduciendo la cantidad de ácido acético que pueda o no estar presente.

Los organismos presentes durante los procesos de elaboración de bebidas alcohólicas, presentan un metabolismo estrictamente fermentativo produciendo etanol como el mayor producto final de los azúcares vía glucólisis y en ocasiones producen además glicerol. En términos generales estos organismos tienen complejas necesidades de crecimiento. Esta es una de las razones de por qué abundan en un medio tan rico nutricionalmente como lo son los mostos de frutas o agaves. A nivel laboratorio se emplean medios selectivos que poseen estas características para su aislamiento. Una característica de este grupo de microorganismos es su tolerancia a niveles altos de etanol. Es esta tolerancia la que ha hecho que estos microorganismos sean empleados principalmente en la industria de bebidas fermentadas. En el caso de los mostos las fermentaciones son llevadas a cabo en la mayoría de los casos por las levaduras. La producción de cultivos estériles para la industria de bebidas alcohólicas no se encuentra masificada, por diversos factores destacando entre otros la poca difusión y aceptabilidad de algunos de estos productos en el mercado, además, si la fermentación de las diferentes bebidas se desarrolla en forma correcta, durante el transcurso de la misma los microorganismos implicados en la fermentación aparecen en la mayoría de los casos de forma natural, es decir, sin la adición de cultivos iniciadores.

En el caso del vino los estudios, en cuanto al interés de organismos iniciadores, es mucho más detallado puesto que de ello dependen las características finales del producto que sale a la venta. Suele ser puesto a prueba desde el análisis de los microorganismos que se encuentran en la periferia de la uva (cepas silvestres), aquellos que pueden encontrarse en los materiales de fermentación y aquellos que son inoculados (cepas comerciales) o cuando se presenta el caso de cepas no *Sacharomyces* (Tofalo *et al.*, 2010), tal es el caso reportado por Cavazza *et al.* (2010) quien dio seguimiento a la cinética del proceso fermentativo encontrando que en presencia de las cepas silvestres el vino presenta mayor contenido de acetato de etilo y menor contenido de acetaldehídos, mostrando con ello que dependiendo del estéril utilizado se pueden o no presentar características que pueden o no ayudar en el proceso fermentativo y finalmente en la bebida final.

El iniciador del pulque está diseñado para aumentar la microbiota natural que determina la correcta fermentación en la elaboración de la bebida. Pulque pastel de Cuba se prepara en el tanque del primer fermentador con el tipo I de savia (la de mejor calidad) y se inoculan con pulque de arranque, posteriormente este se utiliza para establecer el equilibrio óptimo entre la bioquímica de los sustratos fermentables y los microorganismos básicos que intervienen en la fermentación (Ramírez *et al.*, 2004).

II.7.1 Aplicación de levaduras como cultivo iniciador

Dentro de una fermentación alcohólica espontánea podemos observar una sucesión de distintas especies de levaduras tales como *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Candida stellata*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Torulasporea delbrueckii* o *Pichia*, las cuales suelen presentarse en el mosto. Sin embargo, conforme el proceso fermentativo transcurre mueren, generalmente por la aparición y dominio de *Saccharomyces cerevisiae* durante las últimas etapas de la fermentación. No obstante, el dominio y aparición de esta especie no garantiza una fermentación exitosa. Actualmente existen más de 200 cepas de levaduras que se encuentran comercialmente disponibles para ser empleadas en la elaboración del vino. Dichas cepas han sido seleccionadas en base a propiedades específicas (cuadro 4), las cuales pueden ser divididas en 2 grupos: características deseables e indeseables. Sin embargo, es necesario mantener un seguimiento de cerca en las necesidades de nitrógeno, oxígeno así como de la tolerancia a temperatura y etanol de las diferentes cepas para evitar fermentaciones alcohólicas lentas o el paro de las mismas.

Anteriormente, cuando el primer cultivo iniciador fue empleado para la elaboración del vino, la selección de las cepas fue dirigida en busca de ventajas tecnológicas; en la actualidad se pretende realizar dicha selección en base a las propiedades sensoriales y características que contribuyan a una mejor calidad del vino, por lo que la selección de ahora no es tan simple como el cumplimiento del rol de transformación de azúcares en etanol.

En comparación del método tradicional de inoculación del zumo con jugo recién preparado con una cantidad de organismo activo, podemos encontrar dos tipos de cultivos iniciadores de levaduras que se utilizan: cultivos líquidos y preparaciones de levaduras deshidratadas en forma activa. Dichos cultivos de inicio suelen ser puros y consisten solamente en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, el uso de estos diferentes tipos de cultivos iniciadores tiene un mercado limitado para el caso de los cultivos líquidos por su corta vida de anaquel, aun cuando presentan la ventaja de que al no ser deshidratados mantienen una alta población de células viables

Cuadro 4. Criterio de selección para cepas de levaduras de uso comercial

Características deseables	Características indeseables
Propiedades cualitativas	Propiedades cualitativas
Producción de aromas frutales y esterres	Producción de SO ₂
Producción de β-glucosidasa	Producción de sulfuro de hidrogeno
Producción de glicerol	Producción de compuestos derivados de S
Producción de mano-proteínas	Producción de ácidos volátiles y acetato de etilo
	Formación de precursores de carbamato de etilo
Para aplicaciones especiales	Producción de polifenol oxidasa
Degradación de ácido málico	Producción de aminas biogenicas
Formación de ácido láctico	
Formación de acetato isoamilico	Propiedades tecnológicas
Autólisis rápida	Producción de espuma
Propiedades de aglomeración	Formación de biopelículas
Propiedades de sedimentación	Actividad durante la fermentación
Propiedades tecnológicas	
Fermentación completa de los azúcares	
Alta tolerancia al alcohol	
Resistencia a SO ₂	
Retraso lento de la fase de rehidratación	
Fermentación a bajas temperaturas	
Tolerancia a altas temperaturas	
Fermentación bajo presión	
Actividad durante la fermentación	
Efecto killer	

Datos tomados del libro *Biology of microorganism in grape, in must and in wine* (Helmut König, Gottfried Uden y Jürgen Frohlich; 2009).

. Mientras que los cultivos iniciadores deshidratados presentan una larga vida de anaquel en comparación con los líquidos además de que puede ser cultivada en diferentes etapas de propagación con el suministro adecuado de oxígeno y nutrientes para producir células con cantidades óptimas de proteínas, ergosterol, ácidos grasos insaturados y materiales de reserva.

Existen diversas presentaciones de monocultivos iniciadores deshidratados de levaduras tales como: CC Sauvignon, ES454, Fermicru, XL, Fermivin PDM, las cuales suelen ser levaduras enológicas o diseñadas

para la fermentación del vino, dichas presentaciones suelen ser cepas de *S. cerevisiae* que muestran una aplicación que permite la producción de vino ya sea blanco o tinto. De igual forma existen algunas presentaciones con 2 cepas como cultivo iniciador tales como: ESPerlage, EZFerm, EZFerm44, VQ10, que son cepas de *S. cerevisiae* y *bayanus*. Dichas presentaciones aseguran consumo completo de azúcares, cinéticas de fermentación de fases de latencia corta, cinética rápida y regular, así como características tecnológicas con un intervalo óptimo de temperaturas de 15 a 30 °C, tolerancia al alcohol menor o igual a 16%, resistencia frente al SO₂ libre, como adición de características sensoriales de aromas frutales suaves y volumen de la bebida.

No obstante, las fermentaciones alcohólicas espontáneas son generalmente llevadas a cabo por más de una levadura. Esta sucesión de diferentes cepas de levaduras puede propiciar una mayor complejidad en el perfil aromático así como una característica sensorial positiva o negativa a la bebida final. Por tanto, además de la ideología de lograr la complejidad desarrollada durante la fermentación de una manera más controlada mediante la preparación de fermentos distintos, con cepas diferentes y luego mezclarlos, cultivos mixtos con *S. cerevisiae* se han desarrollado, a imitación de la variabilidad de una fermentación alcohólica espontánea.

En algunos casos, los vinos producidos por monocultivos de levaduras presentan una falta de complejidad en el sabor que puede presentarse por una buena fermentación llevada a cabo por los microorganismos nativos. Sin embargo, las fermentaciones no controladas requieren de mayor vigilancia puesto que se pueden presentar problemas durante el proceso fermentativo tales como paro de fermentación, fermentación lenta o altas concentraciones de azúcares residuales, esto debido a el dominio de las cepas non-*Saccharomyces*.

Recientemente la investigación vinícola ha mostrado que el uso de estas cepas de levaduras exóticas proporciona un impacto favorable en las características sensoriales del vino. Son cepas como *Pichia fermentans*, *Candida stellata* o *Torulaspota delbrueckii* las que se han estudiado por sus interesantes contribuciones organolépticas al producto final. Sin embargo, estas cepas por si solas son incapaces de finalizar el proceso de fermentación o presentan altas concentraciones de azúcares residuales, razón por la cual suele ser incorporada con estas levaduras una cepa de *S. cerevisiae*. Logrando con ello el uso de inoculación secuencial lo que ha mostrado mejores resultados no solo en términos tecnológicos si no también en términos de la complejidad de las características sensoriales.

III. JUSTIFICACIÓN

La elaboración de las bebidas fermentadas tiene como parte fundamental el proceso de fermentación alcohólica, en donde participan las levaduras que son el factor más importante durante el proceso de fermentación, pues como ya se ha mencionado, además de etanol, producen alcoholes superiores, enzimas extracelulares, precursores de aromas y compuestos de alto peso molecular que constituyen o participan en el aroma característico de los productos refinados y reposados. No obstante, la conformación de las comunidades de levaduras en fermentaciones alcohólicas naturales, así como la diversidad de las especies dominantes durante la fermentación, apenas empieza a ser elucidada.

Esta gran diversidad de especies de levaduras que se desarrollan y coexisten en los mostos ya sea de agave o de uva influye en la calidad organoléptica final del producto. Por otro lado, estudios recientes sobre la diversidad genética de las cepas de *S. cerevisiae* aisladas del mezcal y tequila, abordado por AFLP y su comparación con cepas aisladas de la industria vitivinícola a través de parámetros tecnológicos de interés productivo, tales como sus actividades enzimáticas, su resistencia al SO₂ y Cu⁺⁺ así como, su tolerancia a etanol, confirman que las marcadas diferencias entre grupos de cepas respaldan la ventaja del uso de cepas específicas para la elaboración de productos específicos (Flores Berrios *et al.*, 2005).

No obstante, existen pocos estudios enfocados en la comprensión de las características y cualidades que forman y dan a todas y cada una de las bebidas fermentadas que en la actualidad se producen, específicamente acerca de la amplia variedad de microorganismos involucrados. Sin embargo, los reportes en cuanto a diversidad de microorganismos se refiere están mayormente enfocados al estudio del vino, como los elaborados por Montrocher *et al.*, (1998), Cocolin *et al.*, (2000), Baleiras *et al.*, (2005) y Xufre *et al.*, (2006) entre otros. En cuanto a productos de agave, en específico el tequila, se tiene el reporte de Flores-Berrios *et al.*, (2005), y con respecto al mezcal, lo reportado por Oliva-Hernández *et al.*, (2013), así como los trabajos elaborados por Escalante-Minakata *et al.*, (2008) y De León *et al.*, (2006). Sin embargo, no se conoce en detalle el tiempo específico y la concentración en la que los microorganismos participan en la fermentación de los mostos de agave.

Debido a la importancia del sector productivo de bebidas alcohólicas en los diferentes estados de la república así como en otros países, el actual crecimiento que está experimentando, y la gran diversidad en el número de especies de levaduras que se presentan, coexisten y desarrollan en los mostos es necesario un estudio detallado de las poblaciones microbianas específicas que participan durante el proceso de elaboración de estas bebidas así como el análisis de la asimilación que presentan para los azúcares presentes en el medio, por lo cual en este proyecto se propone analizar la presencia temporal y carga específica de microorganismos, durante la fermentación de un medio sintético como de un medio a

base de mosto, debido a que es la etapa más importante para el desarrollo de las características organolépticas de las bebidas, para elucidar y proponer un cultivo (mixto) estárter capaz de asimilar completamente las diferentes concentraciones de los azúcares que puedan estar presentes y con ello lograr un proceso de producción eficiente en la industria alcohólica.

Las levaduras de la especie *Saccharomyces* y las no-*Saccharomyces* aisladas de la fermentación del mezcal tamaulipeco, debido a sus diferentes capacidades metabólicas durante el proceso fermentativo, pueden ser utilizadas en el diseño de iniciadores con el objetivo de obtener un perfil organoléptico específico.

IV. HIPÓTESIS

La variación de carga temporal presente en los mostos del mezcal de Tamaulipas, así como la amplia variedad de sus poblaciones microbianas durante el proceso de fermentación, presenta la posibilidad para diseñar una metodología para la selección de levaduras en base a sus capacidades metabólicas específicas para ser empleadas en la formulación de un modelo inoculante (mixto o individual) dirigidos a un perfil fermentativo deseado para la elaboración de las distintas bebidas alcohólicas.

V. OBJETIVOS

V.1 *Objetivo general*

Diseñar una metodología de selección del cultivo iniciador (*starter*) de la fermentación alcohólica en base a las levaduras del mezcal para su utilización según el perfil de fermentación deseado.

V.2 *Objetivos particulares*

1. Caracterización biológica de las cepas de levaduras en base a su productividad, tolerancia a EtOH, fructosa y producción de volátiles.
2. Caracterización de fermentaciones modelo en base a condiciones contrastantes y selección de los inóculos de acuerdo a su producción de etanol, azúcares residuales y producción de metabolitos.
3. Propuesta de una metodología para el diseño de un inóculo *starter* basado en el objetivo de fermentación alcohólica deseado.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Levaduras de estudio

Las levaduras utilizadas durante el desarrollo de este trabajo pertenecen a la colección de levaduras de mezcal del Laboratorio de Biotecnología Industrial (colección LBI-CBG), obtenidos de la mezcalería “El Palmar” del Sr. Emilio Lozoya, situada en San Carlos (Tamaulipas, México), que se ubica a una altitud 609 m y con coordenadas N24° 43.241' y W 98° 52.934' y que fueron aisladas de la pared del equipo y agave cocido; el trapiche (molino) al área de molienda, mostos y bagazo de agave; y en las diversas etapas de los mostos en fermentación. Adicionalmente, se reaislaron e identificaron treinta levaduras más de muestras que no habían sido procesadas en la primera campaña de aislamiento y selección. Todas estas levaduras se encuentran en conservación a -70 °C en medio adicionado con glicerol a un 60% de concentración final. La activación de las levaduras con las que se trabajó se llevo a cabo mediante resiembra en cajas de petri con medio YPD con agar, el cual fue incubado por 24 h a 30 °C.

VI.2 Identificación molecular

VI.2.1 Extracción de ADN

El ADN de los microorganismos a estudiar fue extraído utilizando el protocolo modificado de extracción de ADN propuesto por Raeder y Broda (1985). Se recolectaron de 40 a 50 mg del material celular y sometieron en nitrógeno líquido, por 20seg, en tubos eppendorf para su macerado posterior por 5seg. Se agregaron inmediatamente 500 µl de solución amortiguadora de extracción a temperatura ambiente (200 mM Tris HCl, pH 8.5, 250 mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS) incubándose 10 min. En seguida se añadieron 500 µl de fenol-cloroformo (50/50) a 4°C para mezclarlos por 5min y realizar una posterior centrifugación a 13000 rpm por 30 min. La fase acuosa se colocó en tubo nuevo, y se adicionaron 400 µl de cloroformo helado (-20° C), se mezcló por 1 min para una posterior centrifugación a 13000 rpm por 5 min. Dicho sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo al cual se adicionaron 8 µl de RNAsa (10 mg/ml) y se incubó por 30 min a 37 °C. Se adicionaron 500 µl de isopropanol frío a 4°C y se mezcló por inversión para incubar a -20 °C por 15 min para una posterior centrifugación por 5 min. El sobrenadante se desechó y se añadieron 500 µl de etanol al 70% a -20° para una mezcla por inversión y una centrifugación a 13000 rpm por 5 min. El sobrenadante se desechó para dejar secar la pastilla por 30 min para posteriormente fue resuspendida en 50 µl de TE1X o agua miliQ estéril a temperatura ambiente y almacenada a 4 °C hasta su uso. La cantidad de ADN obtenida fue cuantificada por su absorbancia a 260 nm en un espectrómetro GBC, La calidad del ADN se cuantificó mediante el valor de la relación

$Abs_{260\text{ nm}}/Abs_{280\text{ nm}}$, donde un valor entre 1.8 y 2 indica que la solución está libre de proteína, por lo que se tiene una buena calidad de ADN.

VI.2.2 Amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 por PCR

La amplificación de las regiones ITS fue llevada a cabo utilizando un termociclador GeneAmp PCR system 9700 (marca Perkin Elmer, EEUU) y haciendo uso de los iniciadores reportados por White *et al.* (1990) ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') y ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') con las condiciones siguientes: 1X (94 °C 5 min), 35X (94 °C, 30 seg; 59 °C, 30 seg; 72 °C 1 min), 1X (72 °C, 7 min) bajo el contenido descrito en el cuadro 5. Dichos productos de PCR se sometieron a una purificación con el estuche comercial Wizard SV and PCR clean up System.

Cuadro 5. Mezcla de reacción utilizada para la amplificación de la región ITS.

Componente	Volumen (μL)
Buffer (10X)	2.5
MgCl ₂ (25mM)	0.75
Oligo Fw (5μM)	1
Oligo Rv (5μM)	1
dNTP's (10mM)	0.2
Taq (5U/5μl)	0.2
H ₂ O	18.35
DNA	1
Volumen total	25

VI.2.3 Amplificación de la región 26S por PCR

La amplificación de la región 26S fue llevada a cabo utilizando un termociclador marca *GeneAmp PCR system 9700* (Perkin Elmer, EEUU) y haciendo uso de los iniciadores reportados por White *et al.*, (1990) NL1 (5' GCATTCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') y NL4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3') con las condiciones: 1X (94 °C, 5 min), 35X (94 °C, 30 s; 61 °C, 30 s; 72 °C 1 min), 1X (72 °C, 7 min) con el contenido descrito en el cuadro 6. Dichos productos de PCR se sometieron a una purificación con el estuche comercial Wizard SV y el PCR clean up System.

Cuadro 6. Mezcla de reacción utilizada para la amplificación de la región 26S.

Componente	Volumen (μL)
Buffer (10X)	2.5
MgCl (25mM)	0.75
Oligo Fw (5μM)	1
Oligo Rv (5μM)	1
dNTP's (10mM)	0.2
Taq (5U/5μl)	0.2
H ₂ O	18.35
DNA	1
Volumen total	25

VI.2.4 Electroforesis en gel de agarosa

Para la visualización de los productos de PCR, fue preparado un gel de agarosa al 1% en solución TBE 1X. Se mezclaron 5 μL del producto y 2 μL de SyberGold™ para ser depositados en los pocillos del gel, el cual fue corrido en una cámara de electroforesis horizontal de la marca Bio-Rad a 100 V por 40 min. Se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta para la visualización y la imagen del gel fue captada en el programa Kodak digital Science™ 1D. A partir del ADN obtenido se amplificaron las regiones 26S e ITS de las levaduras del estudio, mediante el uso de los pares de oligonucleótidos descritos en la sección anterior.

Una vez re-aisladas y crecidas las levaduras sin identificación seleccionadas de un muestreo a las vinatas analizadas durante el desarrollo de trabajos previos (Arratia Míreles, 2010; Oliva Hernández *et al* 2013) se procedió a la extracción de ADN el cual se puede apreciar en la figura 7 que fue de buena calidad para los análisis posteriores, con una pureza cerca del 70% calculada mediante el uso de la cuantificación de la relación de $Abs_{260\text{ nm}}/Abs_{280\text{ nm}}$ por lo que se prosiguió a la realización de los análisis siguientes.

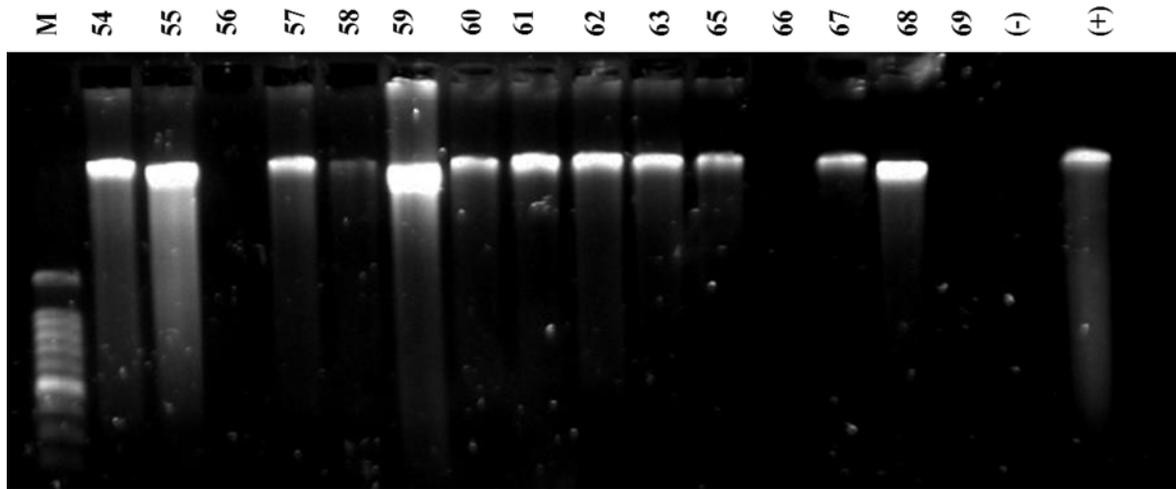


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de la extracción de ADN de las levaduras de estudio. En el carril 1 el marcador de 100 pb y en los carriles del 2 al 16 el ADN de las levaduras re-aisladas, en los carriles 17 y 18 los controles (-) y (+).

En la figura 8 se muestran los fragmentos obtenidos en la amplificación por PCR de la región 26S con un tamaño de alrededor de 550 a 600 pb, así como los fragmentos de la región ITS en los cuales el tamaño oscila entre 700 y 800 pb, en el primer carril el marcador de peso molecular, del carril 2 al 18 (parte superior de la imagen) amplificación de las levaduras 54 a 62, los carriles del 2 al 13 (parte inferior de la imagen) amplificación de las levaduras 63 a 69 iniciando con la región 26S seguida de la ITS.

VI.2.5 Secuenciación de la región ITS y 26S.

Los fragmentos amplificados fueron secuenciados haciendo uso del secuenciador automático de columna ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, EEUU) con el oligonucleótido ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') *forward* para la región ITS y NL1 (5' GCATTCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') *forward* para la región 26S. Dichas condiciones que se utilizaron para secuenciar se muestran en el cuadro 7. Bajo las condiciones: 1X (96 °C, 1 min), 25X (96 °C, 10 s; 59 °C para ITS o 61 C para 26S, 30 s; 60 °C 4 min). Posteriormente la reacción de secuenciación fue purificada adicionando 2 µL de EDTA 125 mM, 2 µL de NaOAC 3M pH 5.2 y 50 µL de etanol absoluto mezclando suavemente e incubando a -20 °C durante 20 min y centrifugando a 14000 rpm por 15 min a 4 °C, se hizo un segundo lavado con 70 µL de etanol al 70% mezclando, incubando y centrifugando como en el paso anterior, secando la pastilla utilizando un termo-mixer (Eppendorf) durante aproximadamente 30 minutos, posteriormente fueron secuenciadas en el Área de Biotecnología del CBG.

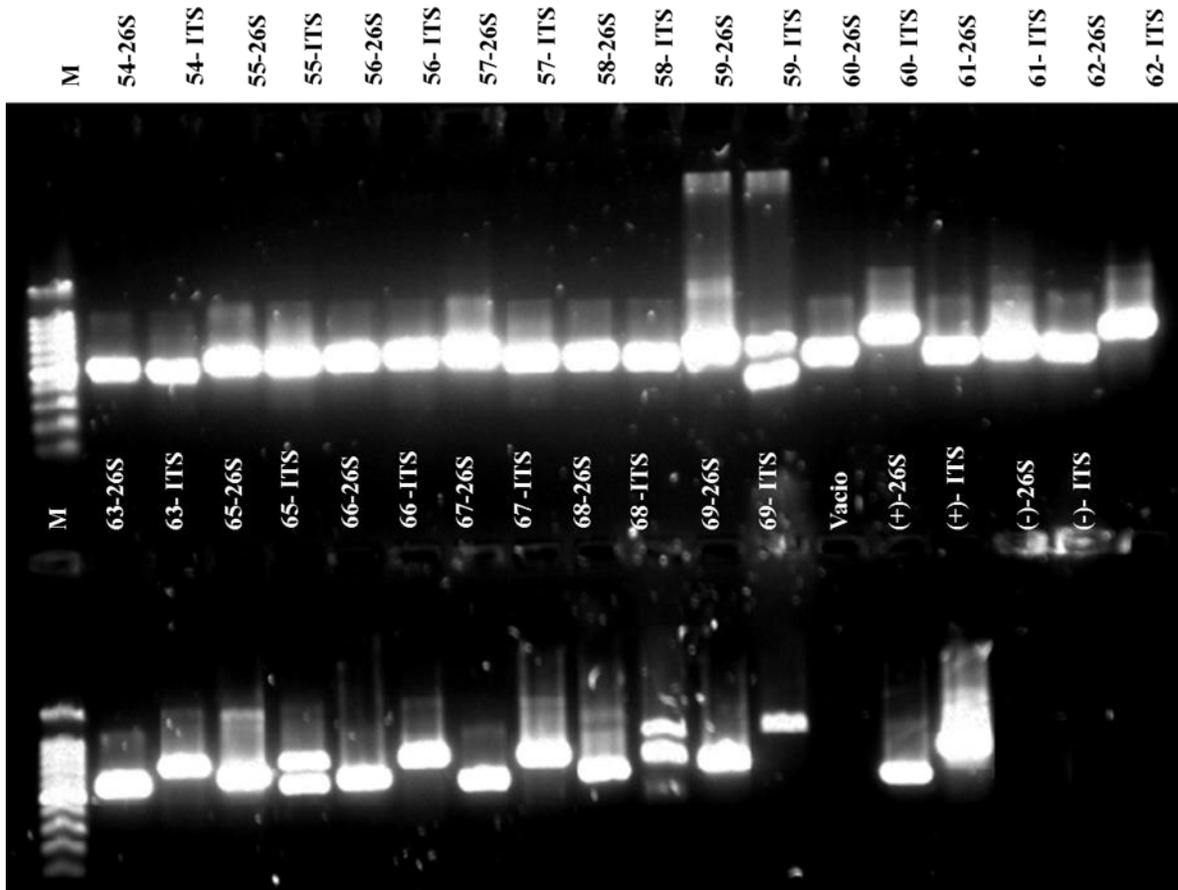


Figura 8. Amplificación de las regiones 26S e ITS de las levaduras de estudio. Marcador de peso molecular, muestras de levaduras, (+) control positivo, (-) control negativo.

Cuadro 7. Componentes de la reacción para la secuenciación de los fragmentos amplificados mediante el kit ABI PRISM® Big Dye® Terminator v3.1

Componentes	Volumen (µL)
Buffer big dye (5X)	4
Iniciador <i>forward</i> (5µM)	1
Big dye®	4
Templado	3
H ₂ O	8
Volumen total	20

VI.3 Cuantificación de la viabilidad en microgotas

Con el fin de poder verificar cuantitativamente el nivel de resistencia al estrés de la colección de las levaduras de LBI-CBG, el primer paso fue la adaptación de la técnica de cuenta en placa en un formato de microlitro, verificando la reproducibilidad de esta técnica cuando fue escalado hasta 10 µl frente a la técnica de recuento en placa normal así como dando seguimiento por conteo con cámara de Neubauer. Esto se logró mediante la detección de las colonias de la deposición cuidadosa de los 10 µl de una dilución determinada previamente, se utilizó una dilución de 10^{-4} para el control (teniendo en cuenta que la muestra inicial tenía una absorbancia de 0,5 a 600 nm, equivalente a 1×10^7 CFU/ml) y entre 10^{-1} y 10^{-3} para las condiciones más estresantes. El experimento se realizó en placas Petri de 9 cm que contenían 15 ml de agar YPD (placa de control) y agar YPD más el agente estresante (fructosa o etanol). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se analizaron como el crecimiento logarítmico obtenidas en cada condición.

VI.4 Tolerancia al etanol

La tolerancia al etanol de las levaduras de la colección del Laboratorio de Biotecnología Industrial fue cuantificada sometiéndolas a crecimiento en placas de medio sólido con glucosa, fructosa y ausencia de azúcar en presencia de concentraciones crecientes de etanol.

Las levaduras fueron re-activadas en placa de petri con medio YPD agar y posteriormente empleadas como inóculo para crecer en 3 mL de YPD líquido durante 24 h (200 rpm a 30 °C). La DO_{600nm} fue medida por triplicado y se ajustó a una DO_{600nm} de 0.5. Cuatro diluciones seriales fueron preparadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}). Un volumen de 10 µl fue inoculado en las placas de petri [YPD (control), YPD + 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15 y 16% (v/v) etanol, YPF + 2, 4, 5, 6, 8, 9 y 10% (v/v) etanol, YPDF + 8, 9, 10, 11, 12, 14 y 15% (v/v) etanol y YP + 2, 4, 5, 6, 8, 9 y 10% (v/v) etanol]. Las placas fueron sometidas a incubación a 30 °C por hasta un máximo de 12 días.

Para determinar la tolerancia al estrés que imponen las concentraciones crecientes de etanol, se hizo el seguimiento del crecimiento de las diferentes levaduras. Para ello se realizó un conteo de las unidades formadoras de colonias presentes en las microgotas, a partir de las 8 h de incubación para las condiciones menos estresantes y para el medio testigo, y a partir del segundo día de incubación para las concentraciones mayores de etanol. Dicho análisis se realizó por triplicado de cada una de las diferentes levaduras, concentraciones y sustrato empleado durante la investigación.

VI.5 Tolerancia a la fructosa

La resistencia a fructosa de las levaduras de la colección del Laboratorio de Biotecnología Industrial fue determinada sometiéndolas a crecimiento en placas de medio sólido con fructosa a concentraciones crecientes.

Las levaduras fueron re-activadas en placa de petri con medio YPD agar y posteriormente empleadas como inóculo para crecer en 3 mL de YPD líquido durante 24 h (200 rpm a 30 °C). La DO_{600nm} fue medida por triplicado y se ajustó a una DO_{600nm} de 0.5. Cuatro diluciones seriales fueron preparadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}). Un volumen de 10 μ l fue inoculado en las placas de petri [YPF (control), YP + 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90% (p/v) fructosa]. Las placas fueron sometidas a incubación a 30 °C por hasta 12 días.

Para determinar la resistencia al estrés que supone las concentraciones crecientes de fructosa, se hizo seguimiento del crecimiento de las diferentes levaduras. Para ello se realizó un conteo de las unidades formadoras de colonias presentes en las microgotas, a partir de las 8 h de incubación para las condiciones menos estresantes y para el medio testigo, y a partir del segundo día de incubación para las concentraciones mayores de fructosa. Dicho análisis se realizó por triplicado de cada una de las diferentes levaduras y concentraciones de la hexosa empleada durante la investigación.

VI.6 Fermentaciones

VI.6.1 Medios de cultivo

Con el fin de disminuir la fase de adaptación del microorganismo al medio en el inicio de la fermentación, las levaduras se activaron en un pre-cultivo. Esta etapa se realizó en matraz erlenmeyer de 250 mL, conteniendo 50 mL de medio YPD. El microorganismo fue incubado a 120 rpm a 30 °C por 24 horas. Se cuantificó el número de células con el fin de determinar el volumen necesario para iniciar la cinética a 1×10^7 cel/mL en M3 (Taillander *et al.*, 2006), mientras que para el jugo de uva fue de 3×10^6 cel/mL para la evaluación de los perfiles fermentativos individuales de cada cepa, mientras que para la evaluación de las mezclas de *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* se utilizó una proporción 1:10 para un total de 3×10^6 cel/mL.

Cuadro 8. Composición de medios de cultivo semi-definidos (g/L)

Reactivo	Precultivo	M2 (agave sintético)	M3 (uva sintético)
Extracto de levadura	10.0	1.0	1.0
KH ₂ PO ₄	0.0	5.0	5.0
MgSO ₄ (H ₂ O) ₇	0.0	0.4	0.4
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.0	2.0	2.0
Peptona	20.0	0.0	0.0
Glucosa	20.0	10.0	100.0
Fructosa	0.0	90.0	100.0

Cuadro 9. Composición de jugos de uva pasteurizados y del mosto de agave (g/L)

Reactivo	Jugo rojo	Jugo blanco	Mosto de agave
Glucosa	102	102	11.6
Fructosa	103	102	94
Amonio	0.55	0.60	2.0
Nitrógeno	0.161	0.136	ND

Las cepas pre-seleccionadas con base a su tolerancia a concentraciones crecientes de etanol y fructosa en el medio fueron evaluadas en los medios M2 y M3 (cuadro 8). Las cepas que mostraron mejores características en el consumo de los azúcares presentes, así como la producción de etanol y compuestos volátiles fueron evaluadas en jugo comercial de uva rojo y blanco, así como en un mosto de agave elaborado bajo condiciones de laboratorio (cuadro 9).

Las condiciones de las fermentaciones se llevaron a cabo por triplicado en minibiorreactores de 50 mL (Corning cat. 431720) conteniendo 20 mL de medio de cultivo a probar a una temperatura de 30 °C a 75 rpm durante 360 horas para experimentos tipo vino y 300 rpm para experimentos tipo tequila. La cinética de fermentación fue monitoreada por la producción de CO₂ durante el crecimiento de las cepas. La producción de CO₂ se determinó por la pérdida de peso cada 24 h. Transcurrido el tiempo de cada muestreo se tomaron muestras de 2 mL para ser centrifugadas y eliminar levaduras así como otras partículas en suspensión y se procedió al análisis. Los parámetros analizados fueron los siguientes: azúcares residuales, etanol, glicerol, ácido acético y al final de la fermentación además se evaluaron el pH y compuestos volátiles.

VI.6.2 Determinación de la productividad de levaduras por HPLC.

Para la cuantificación de la producción de etanol, azúcares y glicerol, las muestras tomadas durante las horas de fermentación del cultivo fueron sometidas a una centrifugación a 13000 rpm y fueron filtradas

en una membrana de 0.20 μm . donde fueron inyectados 20 μL de la muestra en un equipo de HPLC (Agilent 1100 seriesTM) equipado con una columna BioRadTM Aminex HPX (30 X 7.8 mL). La fase móvil fue preparada con agua milliQ y ácido sulfúrico al 0.005M la cual contó con un flujo de de 0.5 mL min^{-1} con un tiempo de análisis de 30 min, a una temperatura de 35 °C y con una DO de 190 nm. Se elaboró una curva de calibración, de cada uno de los diferentes metabolitos a cuantificar, que fueron preparados con concentraciones conocidas, de 0 a 20 g/L del compuesto a analizar, tomando en cuenta que el coeficiente de correlación de Person (R^2) no debía ser menor a 0.95.

VI.6.3 Cuantificación de CO_2

En esta metodología se realizó la determinación de CO_2 liberado durante el proceso fermentativo de cada una de las diversas cepas y mezclas de las mismas. Inicialmente se realizó la evaluación de la pérdida de peso debida únicamente a la evaporación del agua del medio bajo las mismas condiciones empleadas en este trabajo, corroborándose tanto en el medio M3 como en el jugo de uva y en agua destilada, teniendo una pérdida lineal por orificio abierto de la tapa de 0.0034 $\text{g}_{\text{agua}}/\text{h}$, con una R^2 de 0.999. Para el seguimiento de la cinética de las fermentaciones, se pesaron de manera individual todos y cada uno de los mini-bioreactores de 50 mL con el medio ya inoculados con la cepa a evaluar inmediatamente para tomar esto como el tiempo cero. Posteriormente fueron pesados, al inicio del proceso fermentativo cada 6 h los primeros dos días, para posteriormente darles un seguimiento cada 24 h hasta el final de la fermentación. Finalmente fueron realizados los cálculos necesarios para tener los gramos de CO_2 liberados por litro de medio de cada una de las levaduras aquí analizadas, y descontando del cálculo lo correspondiente a la pérdida de peso por evaporación. Dicho análisis se realizó por triplicado de cada una de las diferentes levaduras y mezclas empleadas durante la investigación.

VI.6.4 Cuantificación de biomasa de las levaduras

VI.6.4.1 Cuenta celular

En esta metodología se realizó la determinación de la concentración celular utilizando un hematocitometro (en una cámara de Neubauer o en una cámara de Thoma) mediante la visualización en el objetivo 40X de un microscopio BH-2 (Olympus, Japon). De igual forma se hizo una tinción con azul de metileno para poder visualizar las células vivas y muertas teniendo con ello la viabilidad de las cepas analizadas.

VI.6.4.2 Diferenciación de especies en cultivo mixto

En esta metodología se realizó la diferenciación de especies de los cultivos mixtos mediante el uso en combinación del medio agar WLN (*Wallerstein Nutrient Broth*, Fluka, EEUU) y el WLD (*Wallerstein Differential Broth*, Fluka, EEUU). Las placas de WLN permitieron un conteo total de las levaduras presentes en la fermentación, mientras que las placas de WLD mostraron el crecimiento de las cepas de especies no-*Saccharomyces* debido a la ciclohexamida presente en el mismo, a la cual las cepas de la especie *Saccharomyces* son más sensibles, impidiendo su crecimiento. Por otra parte se observó en las placas de WLN la coloración azul-verde que toman las colonias no-*Saccharomyces* en comparación con las *Saccharomyces*, que se mantienen color crema. Estos datos fueron empleados para conocer a la población mixta completa y como corroboración de conteos celulares totales.

VI.6.4.3 Espectrometría

La densidad óptica (DO) fue evaluada a 600 nm en un espectrofotómetro modelo Hitachi U-2000TM equipo monocromático Seya-Namioka (Japón). Las medidas se realizaron en cubetas de 10 mm de trayecto óptico.

VI.6.4.4 Peso seco

Esta técnica permite la estimación de la biomasa total de cada levadura. Para ello se pesaron tubos de 2 mL limpios y secos, se les agregó un volumen de 2 mL de la muestra para ser centrifugados a 13000 rpm por 10 min y se colectó el sobrenadante para ser filtrado y posteriormente empleado para HPLC. El tubo con la pastilla celular fue sometido a un secado a 60 °C por 24 h, el cual posteriormente se sometió en un desecador por 4 h más para llevar a peso constante y finalmente fue pesado con la muestra seca para realizar los cálculos necesarios como se observa en la fórmula a continuación:

$$PS = \left(\frac{P_f - P_o}{V} \right)$$

Donde:

Pf = peso final del tubo con la pastilla seca (mg)

Po = peso inicial del tubo limpio (mg)

V = Volumen de la muestra (mL)

PS = peso seco (mg/mL, equivalente a g/L)

VI.6.5 Determinación de nitrógeno

Se determinó el nitrógeno únicamente para las muestras de jugo de uva mediante análisis enzimático utilizando un kit comercial Megazyme primary AminoNitrogen (PAN), mediante una serie de reacciones sucesivas basado en la combinación de la función amina de los aminoácidos que resulta determinada en base a su absorbancia a 340 nm.

VI.6.6 Determinación de amonio

Se determinó el amonio en las muestras de jugo de uva mediante análisis enzimático utilizando un kit comercial ENZYTEC Fluid Ammonia, mediante una serie de reacciones sucesivas que presentan una liberación de NADH proporcional estequiométricamente con la cantidad de amoníaco y resulta determinada en base a su absorbancia a 340 nm.

VI.6.7 Determinación de compuestos volátiles por GC

La determinación de los compuestos volátiles se realizó en un cromatógrafo de gases con detector de masas. La separación de los compuestos se realizó en una columna capilar de polietilenglicol Stabilwax de 60 m x 0.25 mm x 0.25 μ m. Se utilizó helio de ultra alta pureza como gas acarreador con una presión constante. Las condiciones de extracción fueron las siguientes: 30 min a 70°C con agitación (15s on, 5s off) de lo cual fueron inyectados 2 μ l de muestra a una temperatura de 75 °C. La temperatura del puerto de inyección fue de 220°C. Para la inyección de las muestras se utilizaron viales de 10 mL, colocándose 1 mL de la muestra en cada vial, posteriormente son engargolados con una tapa la cual consistía en una argolla de aluminio-plata con una apertura de seguridad y de tapón de PTFE de silicón blanco de 20 mm, para posteriormente ser colocados en el carrusel del muestreador.

Para el análisis, se utilizó el siguiente programa de rampa de temperaturas: 50 °C a 240 °C a una razón de 15 °C/min, con la temperatura inicial mantenida por 5 min y la temperatura final mantenida por 30 min. Previamente al análisis de las muestras, se realizaron curvas de calibración (1 a 1000 ppm) de los diferentes compuestos.

VI.7 Análisis estadístico

VI.7.1 Análisis de varianza

Para el análisis de la tolerancia, los datos del conteo de colonias (UFC / ml) fueron convertidos a sus correspondientes valores logarítmicos para facilitar el análisis estadístico, que se realizó utilizando el software Analyse-it para Microsoft Excel (versión 2.20) y JMP de SAS software para el análisis de

ANOVA. Para el análisis global de la tolerancia se hizo uso de cinco valores (obtenidos con YPD normal más los cuatro de las tolerancias de etanol y fructosa) por cepa en una descripción del tipo de diagrama de caja (Krzywinski y Altman, 2014) como el método estadístico más directo de clasificar el rango de tolerancia de las cepas de *S. cerevisiae*. Vale la pena señalar que cuando no se observó crecimiento, se utilizó un valor de 1 para permitir cálculos logarítmicos, y en consecuencia el valor de cero fue dado para esta condición.

En busca de determinar si los diferentes tratamientos mostraban diferencias significativas en la producción de metabolitos y biomasa por el contrario sus medias poblacionales no diferían en las distintas evaluaciones de estrés en las levaduras de la colección analizadas, se realizó un análisis de varianza con Tukey en las distintas fermentaciones realizadas en este trabajo mediante el paquete estadístico JPM.

VI.7.2 Análisis de Componentes Principales (ACP).

Se realizó un análisis de componentes principales para reducir la dimensionalidad de los datos obtenidos de los diferentes procesos fermentativos elaborados durante este estudio, lo que nos permitió encontrar la causa de variabilidad en los datos obtenidos y así ordenarlos por su importancia.

De manera general el resultado del ACP se resume a dos representaciones gráficas: El diagrama de variables o círculo de correlación, en el que se representan las variables en el plano factorial retenido, donde las coordenadas corresponden a los coeficientes de correlación entre las variables originales y cada uno de los componentes. El análisis de los datos experimentales fue realizado en el paquete estadístico InfoGen.

VII. RESULTADOS

VII.1 *Identificación molecular de las levaduras*

Las levaduras que se incorporaron al cepario de levaduras del mezcal LBI-CBG fueron identificadas por la secuencia de dos regiones ribosomales encontrando de esta manera 7 especies diferentes de levaduras (cuadro 10) a las cuales se les asignó una clave colocando las iniciales de la especie y el número de cada levadura, quedando de la siguiente manera: 15 *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), 5 *Pichia guillermondii* (Pg), una *P. kluyveri* (Pk), una *Rhodotorula mucilaginosa* (Rm), una *Clavispora lusitaniae* (Cl), una *Candida* sp. (C) y 2 *Zygosaccharomyces bailli* (Zb). Una vez obtenida la identificación de cada una de las levaduras fueron anexadas con el resto de las cepas de la colección LBI-CBG para dar un total de 10 especies y 71 cepas.

Cuadro 10. Levaduras de los mostos de mezcal añadidas al cepario LBI-CBG, identificadas por secuenciación de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 y 26S

Clave	Identificación con 26S	Valor E	Identidad (%)	Identificación con ITS	Valor E	Identidad (%)	Identificación
54	<i>P.guilliermondii</i> (EU177574.1)	0	100	<i>P.guilliermondii</i> (EU568973.1)	0	99	<i>P. guilliermondii</i>
55	<i>P.guilliermondii</i> (EU177574.1)	0	99	<i>P.guilliermondii</i> (EU568973.1)	0	100	<i>P. guilliermondii</i>
56	<i>P.guilliermondii</i> (EU177574.1)	0	100	<i>P.guilliermondii</i> (EU568973.1)	0	99	<i>P. guilliermondii</i>
57	<i>P.guilliermondii</i> (EU177574.1)	0	100	<i>P.guilliermondii</i> (EU568973.1)	0	95	<i>P. guilliermondii</i>
58	<i>R.mucilaginosa</i> (HQ262395.1)	0	100	<i>R.mucilaginosa</i> (JF338814.1)	0	99	<i>R.mucilaginosa</i>
59	<i>C.lusitaniae</i> (FJ455101.1)	0	96	<i>P.guilliermondii</i> (EU568973.1)	3e-112	100	
60	<i>S. cerevisiae</i> (HQ262381.1)	0	100	<i>S. cerevisiae</i> (FN393995.1)	0	99	<i>S. cerevisiae</i>
61	<i>P.guilliermondii</i> (EU177574.1)	0	100	<i>P.guilliermondii</i> (EU568973.1)	0	100	<i>P. guilliermondii</i>
62	<i>S. cerevisiae</i> (HQ262381.1)	0	100	<i>S. cerevisiae</i> (FN393995.1)	0	99	<i>S. cerevisiae</i>
63	<i>S. cerevisiae</i> (HQ262381.1)	0	99	<i>S. cerevisiae</i> (FN393995.1)	0	99	<i>S. cerevisiae</i>
65	<i>S. cerevisiae</i> (HQ262381.1)	0	92	<i>S. cerevisiae</i> (FN393995.1)	0	91	<i>S. cerevisiae</i>
66	<i>S. cerevisiae</i> (HQ262381.1)	0	99	<i>S. cerevisiae</i> (FN393995.1)	0	100	<i>S. cerevisiae</i>
67	<i>S. cerevisiae</i> (HQ262381.1)	0	99				<i>S. cerevisiae</i>
68	<i>S. cerevisiae</i> (HQ262381.1)	0	87	<i>S. cerevisiae</i> (FN393995.1)	0	99	<i>S. cerevisiae</i>
69	<i>S. cerevisiae</i> (HQ262381.1)	0	99	<i>S. cerevisiae</i> (FN393995.1)	0	91	<i>S. cerevisiae</i>
71	<i>S. cerevisiae</i> (HQ262381.1)	0	99	<i>S. cerevisiae</i> (FN393995.1)	0	94	<i>S. cerevisiae</i>
73	<i>S. cerevisiae</i> (HQ262381.1)	0	100	<i>S. cerevisiae</i> (FN393995.1)	0	99	<i>S. cerevisiae</i>
74	<i>S. cerevisiae</i> (HQ262381.1)	0	99	<i>S. cerevisiae</i> (FN393995.1)	0	97	<i>S. cerevisiae</i>
79	<i>Z. bailli</i> (JN248597.1)	0	99				<i>Z. bailli</i>
80	<i>Candida</i> sp.	7E-11	90	<i>S. cerevisiae</i> (FN393995.1)	4E-156	83	
85	<i>S. cerevisiae</i> (HQ262381.1)	0	99	<i>S. cerevisiae</i> (FN393995.1)	0	99	<i>S. cerevisiae</i>
86	<i>S. cerevisiae</i> (HQ262381.1)	0	99	<i>S. cerevisiae</i> (FN393995.1)	0	96	<i>S. cerevisiae</i>
90	<i>S. cerevisiae</i> (HQ262381.1)	0	99	<i>S. cerevisiae</i> (FN393995.1)	0	99	<i>S. cerevisiae</i>
95	<i>S. cerevisiae</i> (HQ262381.1)	0	100	<i>S. cerevisiae</i> (FN393995.1)	0	89	<i>S. cerevisiae</i>
96	<i>Z. bailli</i> (JN248597.1)	0	98				<i>Z. bailli</i>

VII.2 Puesta a punto de la técnica de viabilidad en microgota

La reproducibilidad de la técnica de conteo de fue validada usando inicialmente un cultivo en YPD de 18 h de crecimiento de la cepa control Fermichamp. Se eligió el volumen de 10 µl como el más conveniente en términos de manejo, la visualización y la integridad de la gota sobre la superficie del agar (fig. 9A). Se utilizó una dilución de trabajo de 10⁻³, teniendo en cuenta que la muestra inicial tenía una absorbancia (DO 600 nm) de 0.5, equivalente a aproximadamente 3 x 10⁶ CFU/mL, lo que hace un recuento de alrededor de 20-50 colonias por gota depositada, y se hizo uso de la muestra directa (sin dilución) para las condiciones más estresantes. Se utilizó esta técnica para evaluar los efectos de concentraciones crecientes de etanol y fructosa en el crecimiento de levadura, como las que se muestran en la figura 9B obtenido para cepas de *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces* seleccionadas. En un pequeño volumen utilizado, resultó posible cuantificar la viabilidad de hasta 12 cepas por placa y permitió eliminar la necesidad de espera de la difusión de la muestra sobre toda la placa, lo que acelera el análisis.

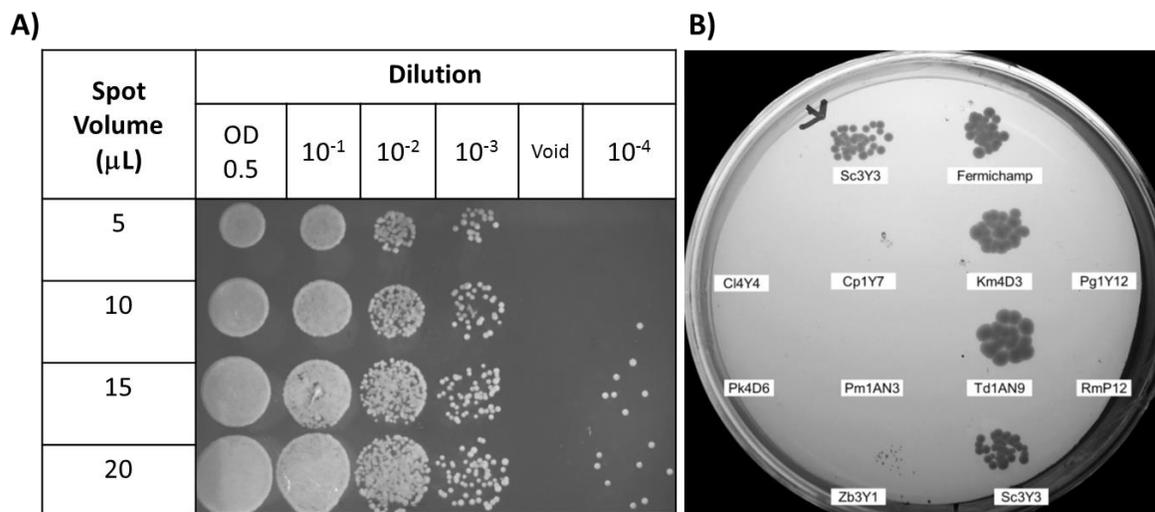


Figura 9. Evaluación de la técnica gota en placa: A) volumen y la dilución necesaria para cuantificar con exactitud el número de unidades formadoras de colonias en una muestra conocida de cepa control Fermichamp crecida en medio YPD durante 18 h; B) Ejemplo del crecimiento de las colonias a las 72 h de incubación por algunos representantes de las 10 especies de levaduras diferentes aisladas de mezcal, creciendo en YPD y 8% v/v de etanol a una dilución 10⁻³. Tomado de De la Torre-González et al. (2016)

Como era de esperar se encontró una correlación positiva entre los recuentos de células evaluadas en las placas completas y gota en placa así como los recuentos de cámara de Neubauer (fig. 10), que corresponde al intervalo a partir de 0.1 a 1 de absorbancia a 600 nm (DO 600nm) de los cultivos. Vale la pena mencionar que para las condiciones menos estresantes, las colonias se

podían contar de forma fiable a partir de 10 h de incubación utilizando un objetivo de ampliación de 2 a 4 X.

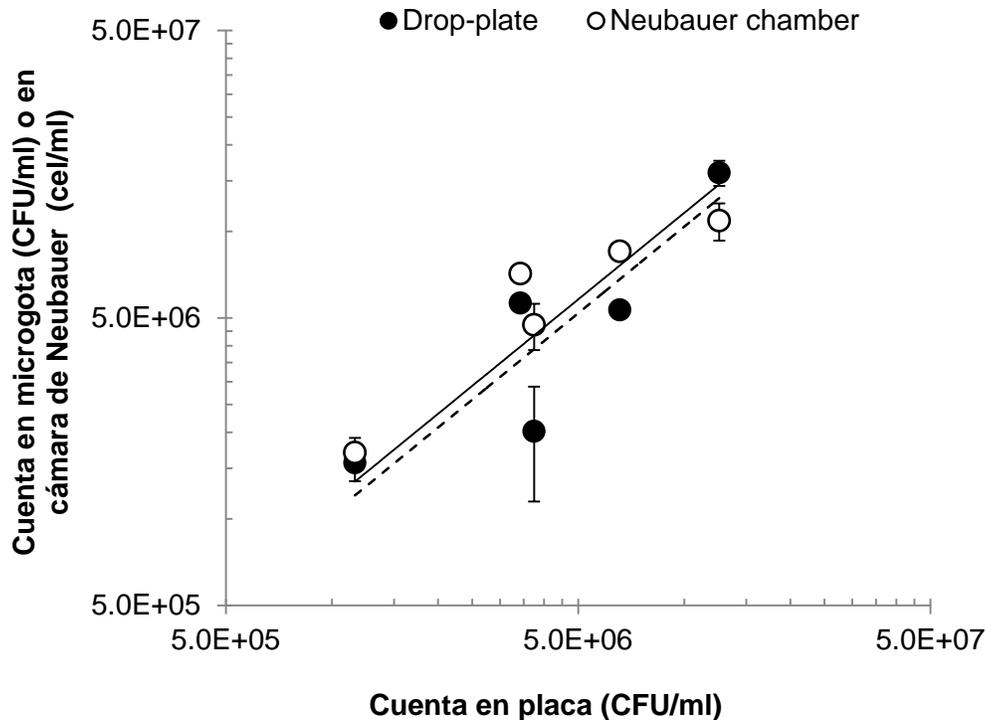


Figura 10. Correlación lineal del conteo de células de la cepa de control de *S. cerevisiae* Fermichamp obtenido en el conteo diferencial de la placa completa y el conteo de gota en placa (circulo negro, línea continua, $R^2 = 0,945$) y el conteo en cámara de Neubauer (circulo blanco, línea punteada, $R^2 = 0.899$). Las desviaciones estándar se calcularon a partir de tres experimentos independientes. Tomado de De la Torre-González et al. (2016)

VII.3 Tolerancia al etanol

VII.3.1 Tolerancia al etanol en medio YPD

La levadura se ve sometida a una variedad de tipos de estrés a medida que las condiciones del proceso fermentativo cambian conforme avanza el tiempo. Uno de los estreses más importantes durante este proceso es el producido por las crecientes concentraciones de etanol que en general propicia condiciones adversas a las cuales el organismo tiene que enfrentarse y terminan afectando principalmente las estructuras celulares y diversas macromoléculas tales como lípidos, proteínas, etc. los cuales suelen sufrir modificaciones estructurales que interfieren con su función culminando en un paro de fermentación o fermentaciones incompletas.

Se realizó un seguimiento del crecimiento poblacional, de todas y cada una de las levaduras de las diferentes especies de la colección LBI-CBG, que se presentaba en placas de petri de YPD en presencia de concentraciones crecientes de etanol que iban de 2 a 16% (v/v). Dicho análisis se realizó por triplicado para cada cepa y concentración de etanol empleadas en la investigación. Para un mejor análisis de las variaciones producidas en el tamaño poblacional a través de las distintas concentraciones crecientes de etanol se representan gráficamente los datos de cada una de las 10 especies de la colección, y en el apéndice el análisis estadístico correspondiente.

En ausencia de etanol todas las cepas muestran su máximo crecimiento. Sin embargo, a medida que incrementa la concentración de etanol en el medio se observa una disminución progresiva en el número de colonias de las diferentes cepas, afectada en menor o mayor medida según la especie y la concentración de etanol. En el caso de las cepas de la especie *S. cerevisiae* la máxima tolerancia alcanza un 15% (v/v) de etanol, no obstante a lo largo de todo el proceso se aprecia el efecto negativo que propicia el etanol sobre el crecimiento poblacional (fig 11). Dicho efecto se presenta de una forma progresiva disminuyendo el número de colonias a medida que incrementa el contenido de etanol en el medio. A los 12 días de incubación y en las concentraciones mayores de etanol la diferencia en el conteo son contrastantes, mostrando con ello la influencia del etanol sobre las diferentes cepas de la especie.

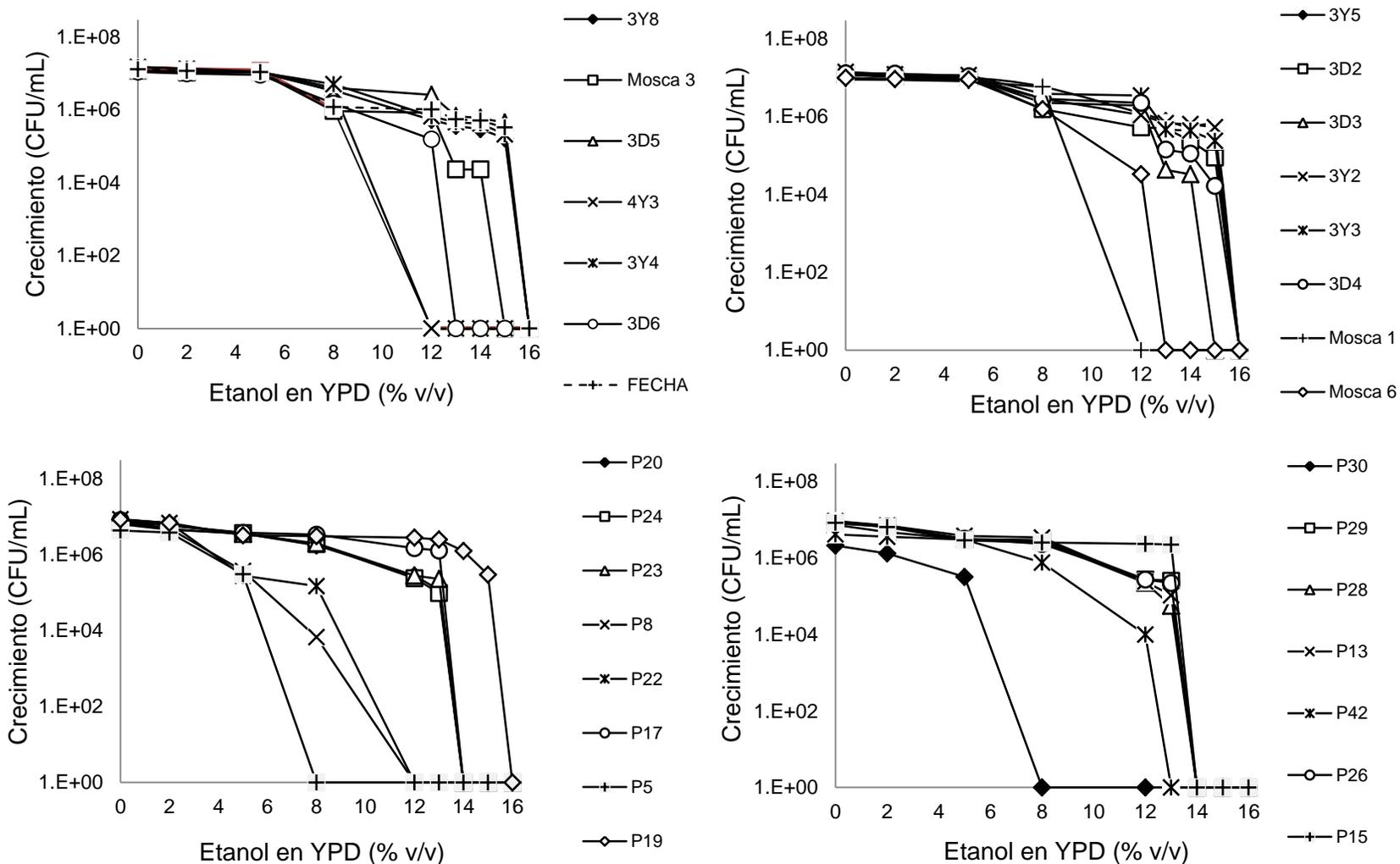


Figura 11. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPD de todas las cepas *S. cerevisiae* del cepario de LBI-CBG.

En el caso de la especie *K. marxianus* todas y cada una de las cepas alcanzan la máxima tolerancia de un 9% (v/v) de etanol (fig. 12), mostrando un comportamiento muy similar a lo largo de todo el proceso observándose cambios pequeños en la cuenta poblacional entre las cepas de dicha especie. Sin embargo, la influencia del etanol sobre las diferentes cepas se manifiesta igualmente de manera progresiva. A medida que incrementan las concentraciones de etanol el crecimiento se ve cada vez más afectado hasta llegar a la concentración en la cual no tolera más dicho metabolito.

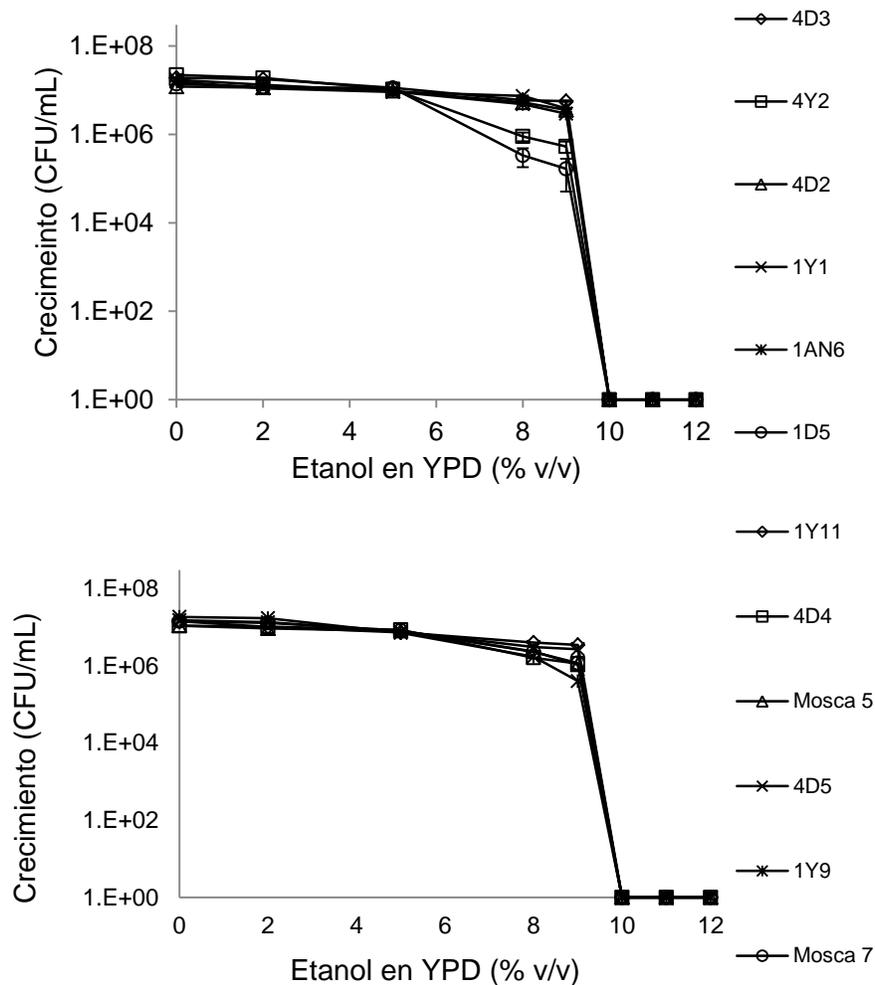


Figura 12. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPD de las cepas *K. marxianus* del cepario de LBI-CBG.

Las especies de *T. delbrueckii* y *Z. bailli* mostraron un comportamiento alto de tolerancia al etanol alcanzando un máximo de 10% (v/v) (fig. 13) y 11% (v/v) (fig. 14) respectivamente, siendo estas especies las segundas mas tolerantes después de *S. cerevisiae* que mostró una máxima tolerancia a 15 % (v/v) de etanol. Dichas especies no muestran grandes alteraciones a bajas

concentraciones, pero a partir de contenidos del 5% de etanol dichas alteraciones comienzan a manifestarse mostrando una reducción en la cuenta poblacional. En el caso de *T. delbrueckii* aunque el crecimiento se ve afectado en la mayoría de las cepas con el incremento de etanol en el medio, encontramos dos de ellas que logran alcanzar una máxima de 10% puesto que el resto de ellas se ven más afectadas de acuerdo a las cuentas poblacionales.

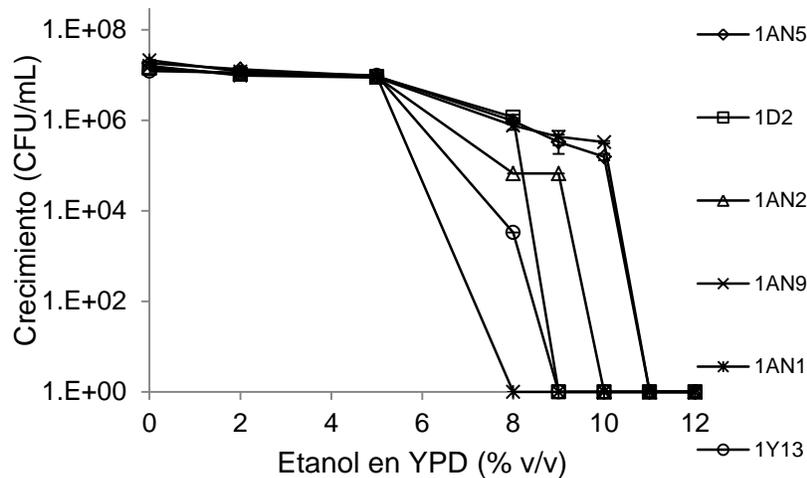


Figura 13. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPD de las cepas *T. delbrueckii* del cepario de LBI-CBG.

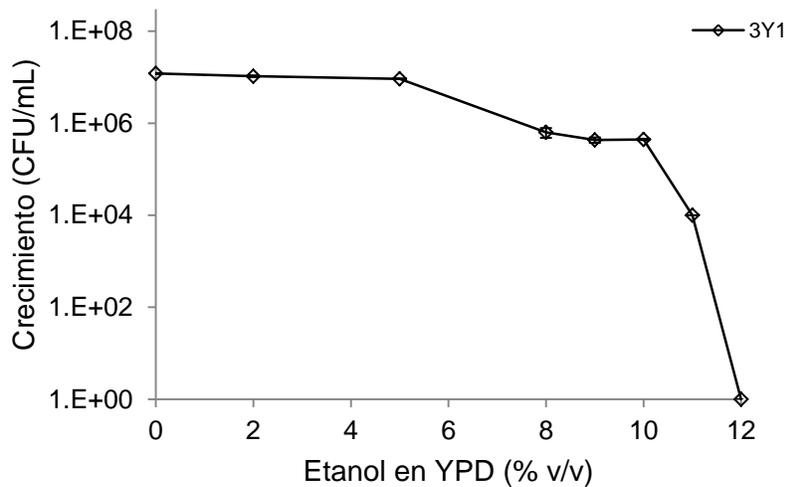


Figura 14. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPD de las cepas *Z. bailli* del cepario de LBI-CBG.

Las especies que presentaron una tolerancia media al etanol fueron *P. guillermondii*, *P. kluyvery*, *P. mexicana* y *R. mucilaginosa* mostrando una máxima tolerancia de 8%. Dichas especies como las anteriores no muestran grandes alteraciones a concentraciones bajas de etanol, pero es a partir

de 5% que se muestra más evidenetemente el daño en las células puesto que el recuento poblacional se ve disminuido en las siguientes concentraciones.

En el caso de *P. guillermondii* la mayoría de las cepas mostraron un comportamiento muy similar a excepción de Pg2AN8 que muestra una tolerancia mayor que el resto de su especie (10%), así como la Pg4Y11 que se muestra más afectada que de acuerdo a los recuentos poblacionales llega a tan solo un 5% de tolerancia (fig15).

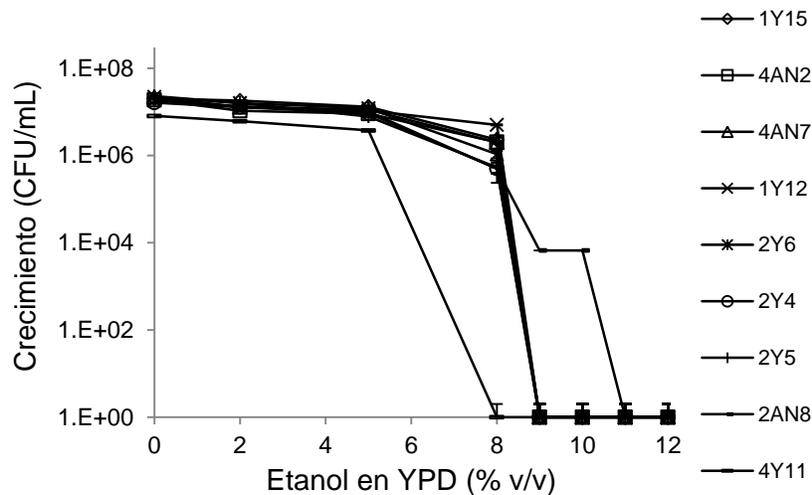


Figura 15. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPD de las cepas *P. guillermondii* del cepario de LBI-CBG.

P. kluyvery y *P. mexicana* presentan un patrón similar de tolerancia ante las concentraciones crecientes de etanol. Sin embargo, la cepa Pk2Y8 perteneciente al grupo de las *P. kluyvery* se ve rápidamente afectada por el etanol, puesto que su tolerancia máxima es de 5% mientras que el resto de su grupo así como la cepa de *P. mexicana* consiguen un desarrollo poblacional más alto de acuerdo a los recuentos poblacionales de cada una de ellas (fig. 16).

La cepa de la especie *R. mucilaginosa* al igual que las cepas de las anteriores especies presenta un patrón de tolerancia muy similar a estas, a diferencia de que presenta cambios menos drásticos en las últimas concentraciones de etanol. Sin embargo, dicha cepa también se ve afectada a concentraciones superiores al 8% de alcohol (fig. 17).

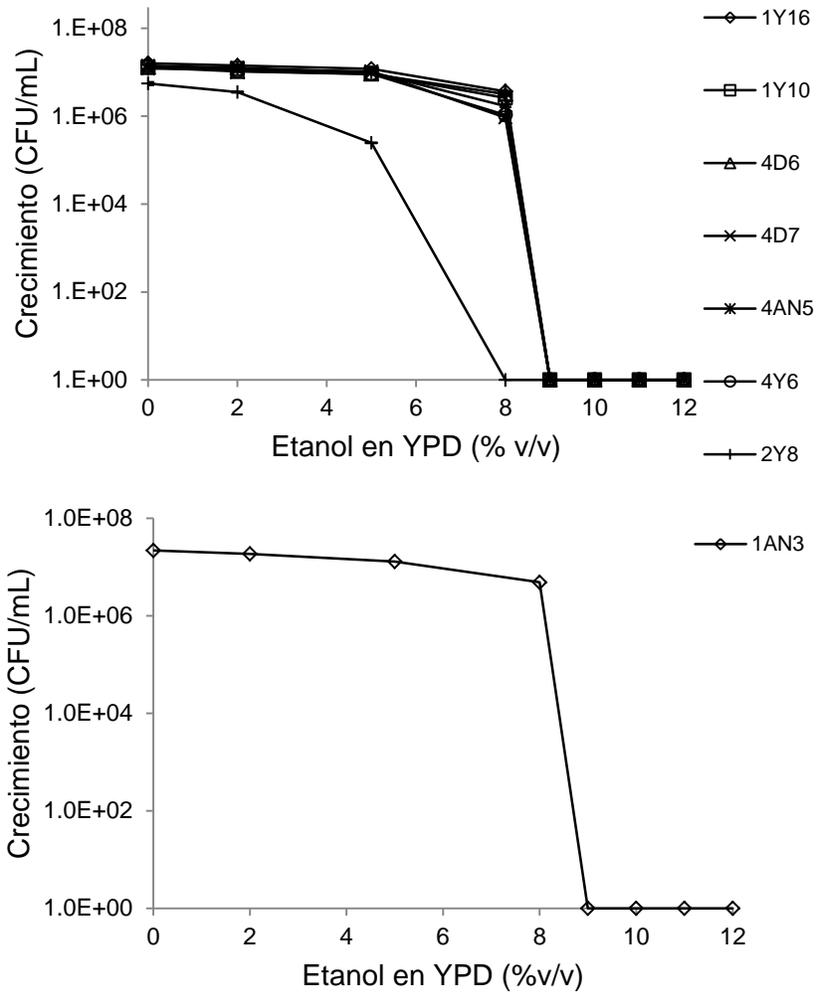


Figura 16. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPD de las cepas de la especie *P. kluyveri* (arriba), y *P. mexicana* (abajo) del cepario de LBI-CBG.

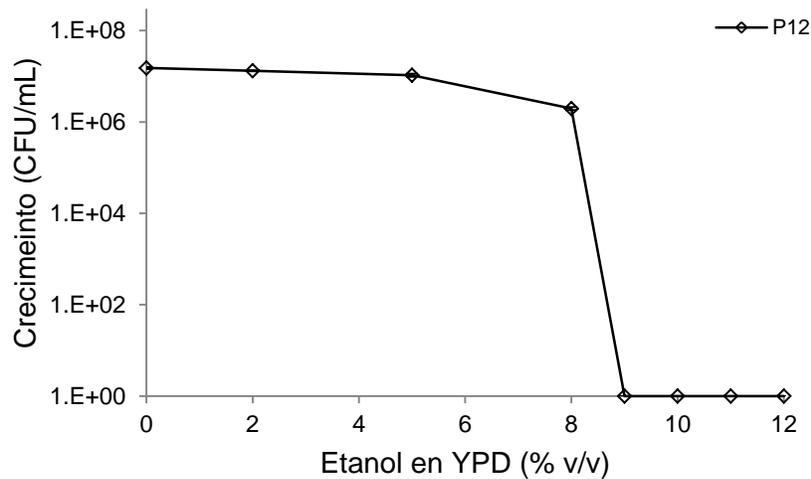


Figura 17. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPD de la cepa *R. mucilaginosa* del cepario de LBI-CBG.

De igual forma que se observaron cepas y/o especies con alta y media tolerancia al etanol, encontramos que las cepas de la especie *Clavispora lusitaniae* y *Candida* mostraron ser las de menor tolerancia alcanzando un valor máximo de 5% en la mayoría de las cepas de dichas especies.

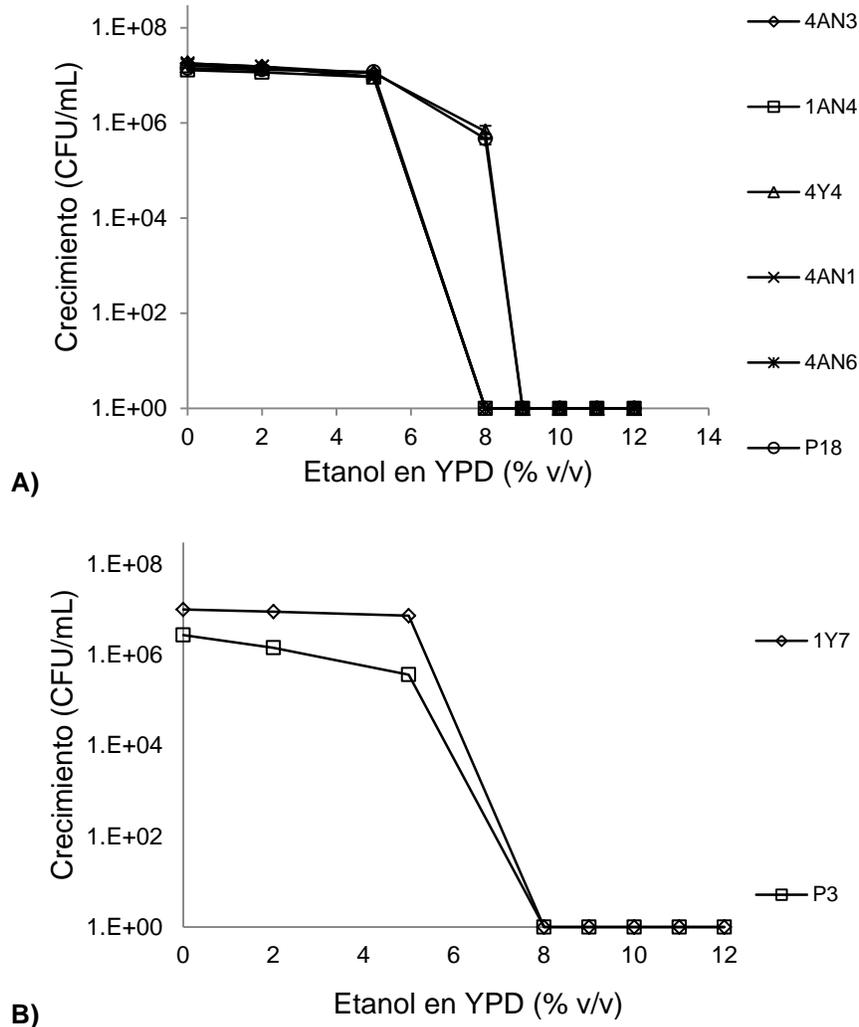


Figura 18. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPD de las cepas de la especie *C. lusitaniae* (A) y *Candida* (B) del cepario de LBI-CBG.

Dichas cepas al igual que el resto de las cepas analizadas en esta investigación se ven afectadas por la presencia del etanol. Sin embargo, estas especies a bajas concentraciones ya comienzan a presentar un decremento poblacional aunque no muy distinto al del resto de las especies anteriores (fig. 18). Esta disminución comienza a ser importante a concentraciones del 5% de etanol mostrando un desarrollo poblacional insuficiente para su conteo, lo cual a niveles fermentativos presentaría un problema de paro fermentativo o fermentación incompleta.

Si bien los resultados anteriores basados en ciertas tendencias y características particulares de las cuales se hicieron anotaciones mostraron distintos índices de tolerancia, también consideramos apropiado aplicar algunos análisis estadísticos para confirmar si las variables ejercen realmente alguna influencia en estas pruebas iniciales y si las diferencias son significativas entre todas y cada una de las levaduras. Por lo que de manera conjunta se realizó un análisis de varianza en las concentraciones crecientes de etanol para corroborar de manera estadística la variabilidad entre cepas bajo dichas condiciones de estrés.

Ante la existencia de diferencias entre cepas, procedimos a realizar un análisis de comparación múltiple mediante el test de Tukey. El análisis estadístico (apéndice 1) nos permitió apreciar diferencias y similitudes entre la población analizada, igualmente nos permitió apreciar las relaciones entre algunos factores como las concentraciones crecientes de etanol en las diversas cepas sometidas al estrés. La prueba de Tukey mostró que las diferencias significativas existieron en la mayoría de las cepas evaluadas conforme las concentraciones de etanol en el medio incrementaban, puesto que a concentraciones bajas como 5% las diferencias significativas existen pero en menor escala definiendo solo 4 grupos de tolerancia.

VII.3.2 Tolerancia al etanol en medio YPF

El seguimiento del crecimiento poblacional de todas y cada una de las levaduras de las diferentes especies de la colección del laboratorio de biotecnología industrial fue registrado de acuerdo a lo que se presentaba en placas de petri de YPF en presencia de concentraciones crecientes de etanol que iban de 2 a 10% (v/v). Dicho análisis se realizó por triplicado para cada cepa y concentración de etanol empleadas en la investigación.

Para un mejor análisis de las variaciones producidas en el tamaño poblacional a través de las distintas concentraciones crecientes de etanol se representan gráficamente los datos de cada una de las 10 especies de la colección. En ausencia de etanol todas las cepas muestran un crecimiento propio de la levadura. Sin embargo, a medida que incrementa la concentración de etanol en el medio se observa una disminución progresiva en el número de colonias de las diferentes cepas, pero el crecimiento de cada cepa se ve afectada en menor o mayor medida según la especie y la concentración de etanol.

La especie *S. cerevisiae* de igual manera que en medio YPD resultó ser una de las especies de mayor tolerancia mostrando una máxima de 9% (v/v) de etanol, no obstante a lo largo de todo el proceso se aprecia el efecto negativo que propicia el etanol sobre el crecimiento poblacional (fig 19). Dicho efecto se presenta de una forma progresiva disminuyendo los recuentos a medida que

incrementa el contenido de etanol en el medio. Sin embargo, al término de los 12 días de incubación y en las concentraciones más altas de etanol la diferencia en los recuentos son destacables además de observar que la tolerancia a dicho alcohol se ve fuertemente influenciada también de acuerdo al azúcar empleado como sustrato en el medio puesto que al emplear fructosa y no glucosa la capacidad de tolerancia disminue de un 15% a 9% (v/v).

Un aspecto a destacar es que dicho estrés propiciado por las concentraciones crecientes de etanol así como el efecto que mostro el cambio de azúcar como fuente de carbono en el medio mantiene una tolerancia máxima muy similar entre las diferentes cepas de la especie, a diferencia que lo observado en el mismo análisis en medio YPD que dentro de la especie la capacidad de tolerancia al etanol es variada, mientras que en este caso parecen mostrar el mismo nivel de tolerancia (9% v/v).

En el caso de las cepas de la especie *K. marxianus* todas y cada una de ellas alcanzan una máxima tolerancia de un 9% (v/v) de etanol (fig. 20), mostrando un comportamiento muy similar a lo largo de todo el proceso así como lo observado en análisis en medio YPD, observándose cambios pequeños en la cuenta poblacional entre las cepas de dicha especie. Sin embargo, la influencia del etanol sobre las diferentes cepas se manifiesta igualmente de manera progresiva. A medida que incrementan las concentraciones de etanol el crecimiento se ve cada vez más afectado hasta llegar a la concentración en la cual no tolera más dicho metabolito.

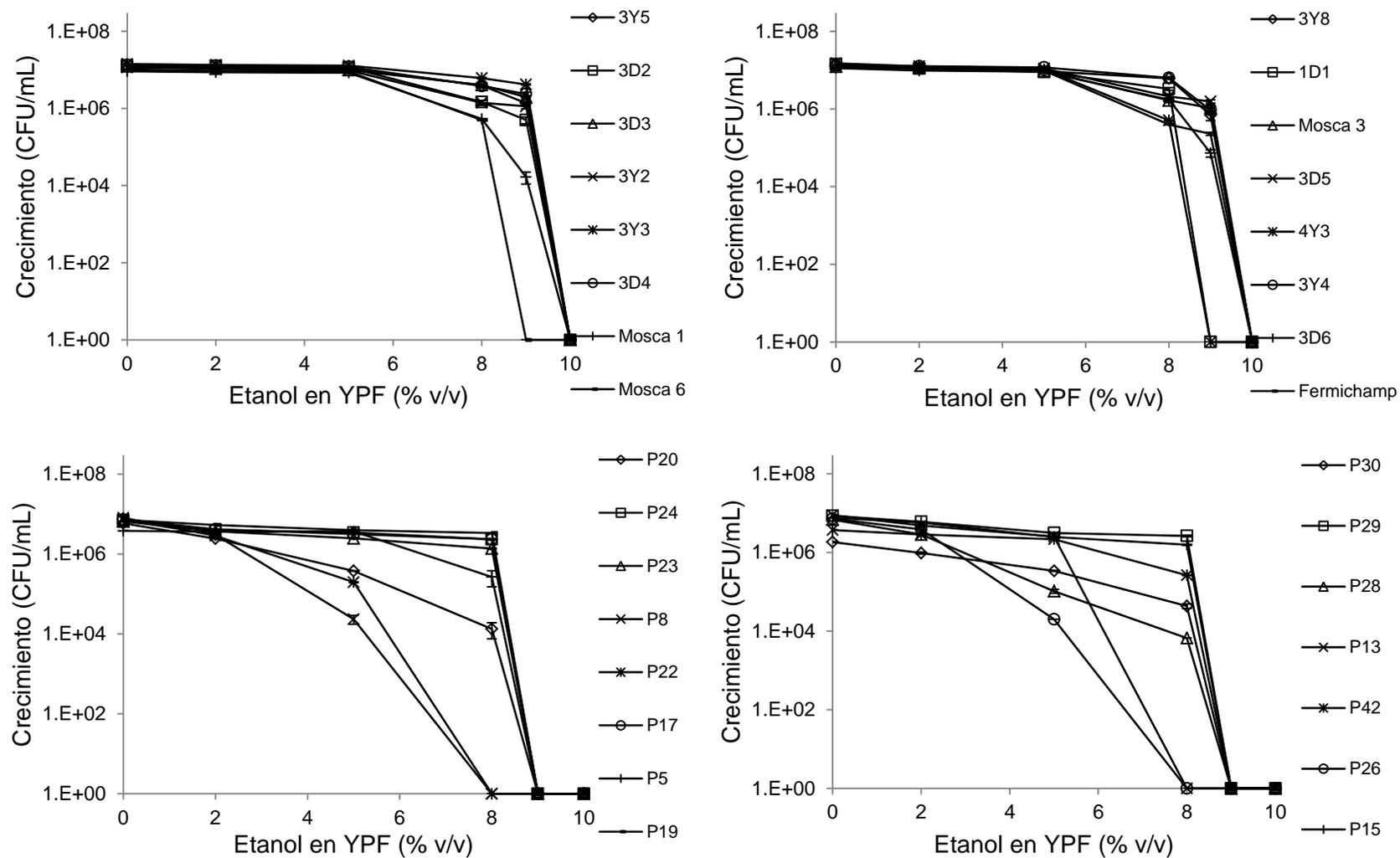


Figura 19. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPF de las cepas *S. cerevisiae* del cepario de LBI-CBG.

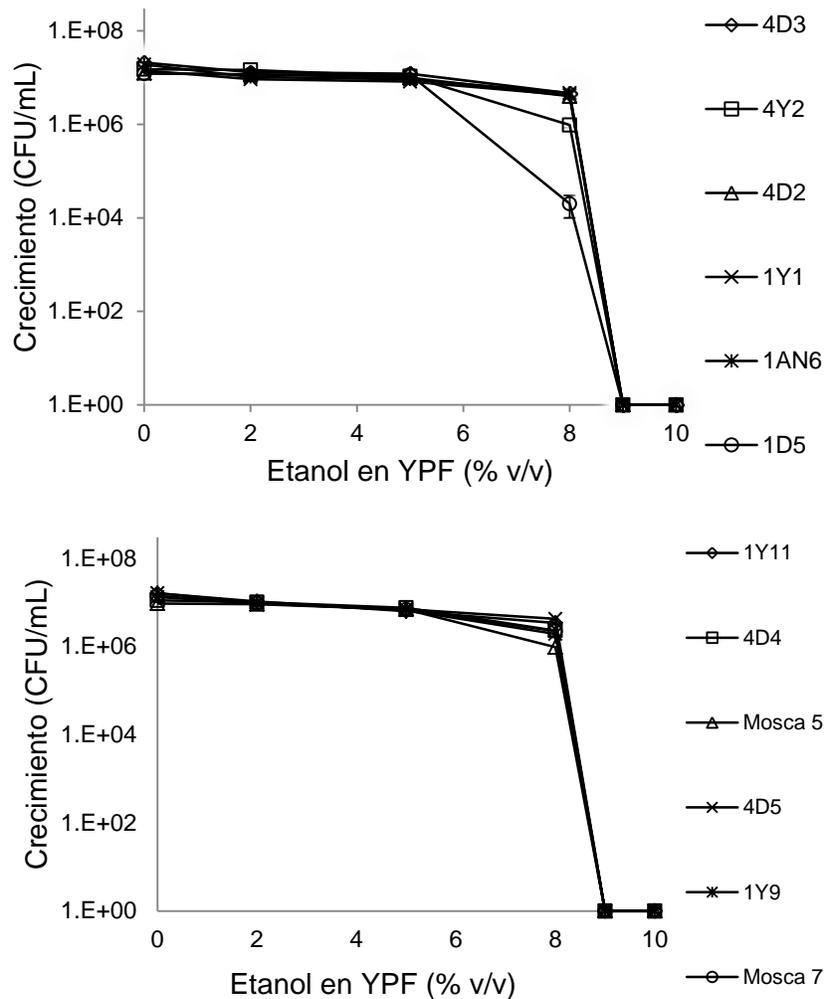


Figura 20. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPF de las cepas *K. marxianus* del cepario de LBI-CBG.

En el caso de *T. delbrueckii* y *Z. bailli* mostraron un comportamiento alto de tolerancia al etanol alcanzando un máximo de 8% (v/v) (fig. 21) y 9% (v/v) (fig. 22) respectivamente, siendo estas especies muy similares en términos de tolerancia como lo presenta *S. cerevisiae* que muestra una máxima de 9% (v/v). Dichas especies no muestran grandes alteraciones a bajas concentraciones, pero a partir de una concentración del 5% de etanol cambios poblacionales comienzan a manifestarse mostrando una reducción en la cuenta. En el caso de *T. delbrueckii* aunque el crecimiento se ve afectado en la mayoría de las cepas con el incremento de etanol en el medio, encontramos dos de ellas que logran alcanzar una máxima de 8% puesto que el resto de ellas se ven más rápidamente afectadas a menores concentraciones de etanol.

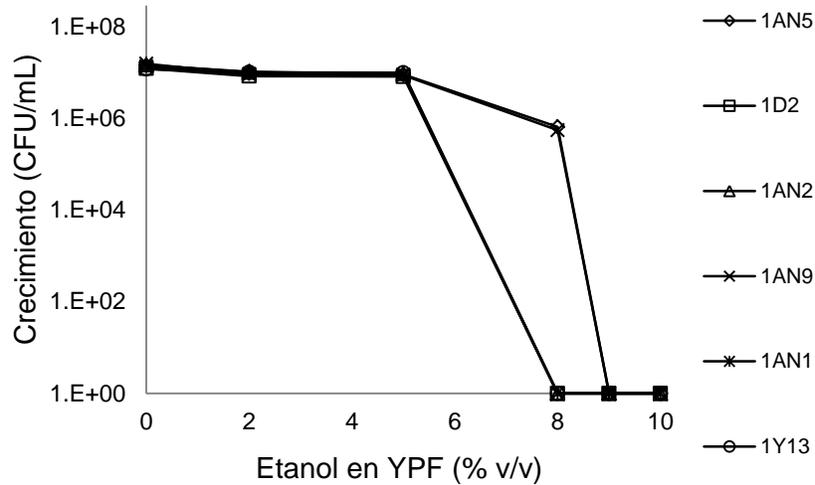


Figura 21. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPF de las cepas *T. delbrueckii* del cepario de LBI-CBG.

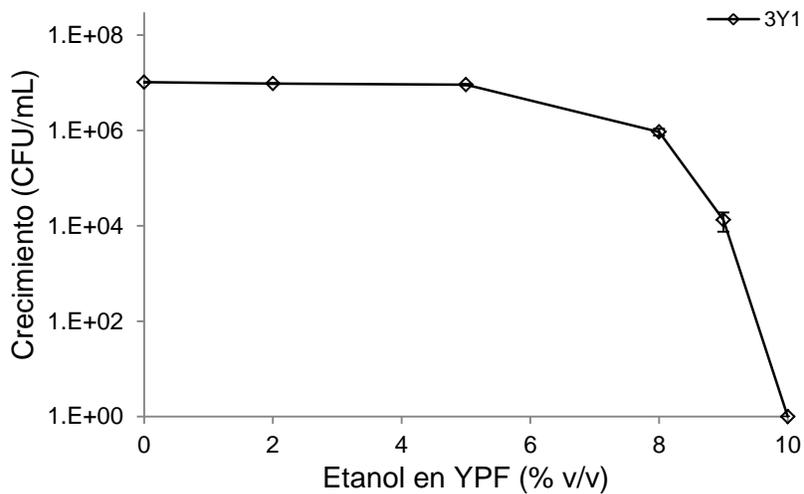


Figura 22. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPF de la cepa *Z. bailli* del cepario de LBI-CBG.

Las especies *P. guillermondii*, *P. kluyveri*, *P. mexicana* y *R. mucilaginosa* mostraron una máxima tolerancia de 8%. Dichas especies como las anteriores no muestran grandes alteraciones a concentraciones bajas de etanol, además de presentar un patrón muy similar al obtenido en el análisis en medio YPD aunque con una ligera diferencia en el recuento poblacional dado posiblemente a la fuente de carbono empleada en esta prueba, considerando que dichas cepas fueron aisladas de mostos de mezcal los cuales contienen en su mayoría fructosa más que glucosa.

Las cepas de *P. guillermondii* mostraron un comportamiento muy similar a excepción de la 2Y4 que muestra un efecto mayor a concentraciones más bajas como 5%, a diferencia del resto de su especie que alcanza una tolerancia del 8% (fig 23).

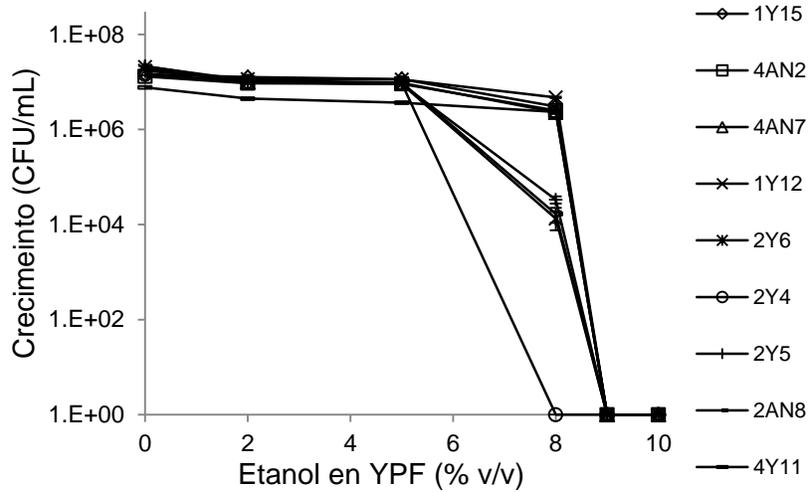


Figura 23. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPF de las cepas *P. guillermondii* del cepario de LBI-CBG.

De manera muy similar a lo observado en *P. guillermondii*, las diferentes cepas de las especies *P. kluyvery* y *P. mexicana* mostraron un patrón similar de tolerancia ante las concentraciones crecientes de etanol y al igual que en lo observado en medio YPD, la cepa 2Y8 perteneciente al grupo de las *P. kluyvery* se ve rápidamente afectada por el etanol, puesto que su tolerancia máxima es de 5% mientras que el resto de su grupo así como la cepa de *P. mexicana* consiguen un desarrollo poblacional más alto de acuerdo a los recuentos poblacionales de cada una de ellas (fig. 24).

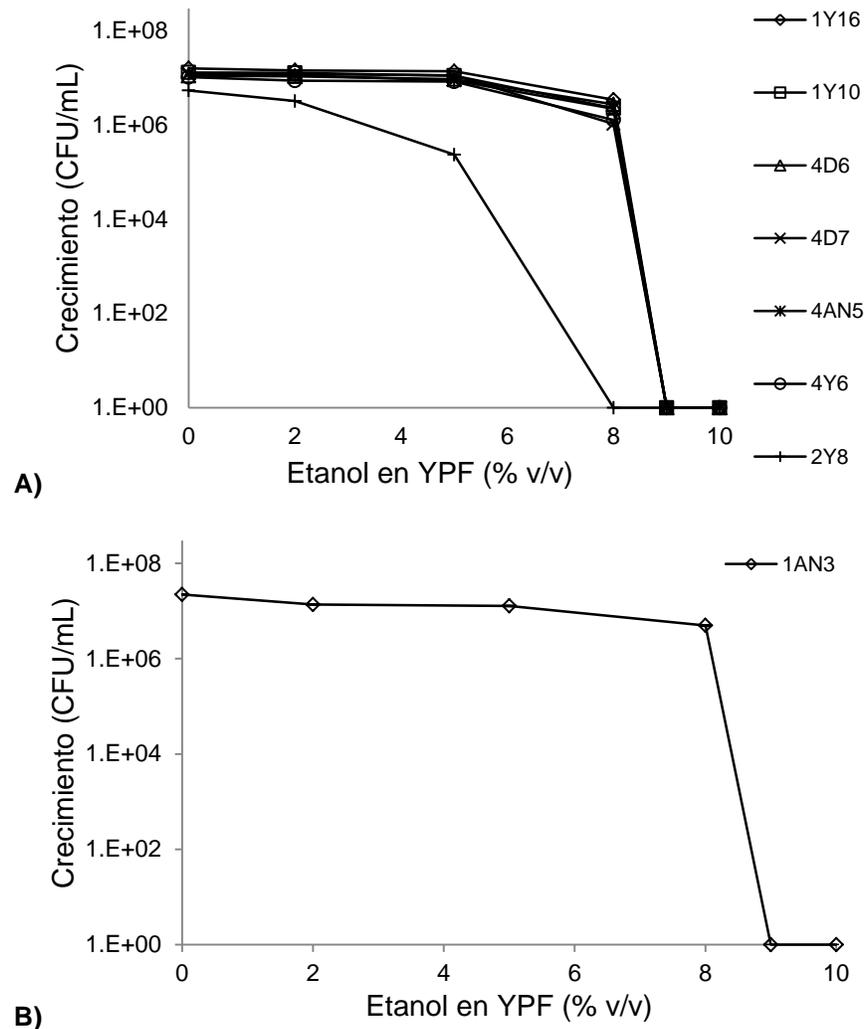


Figura 24. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPF de las cepas de la especie *P. kluyveri* (A), y *P. mexicana* (B) del cepario de LBI-CBG.

Al igual que las cepas de las anteriores especies la cepa de *R. mucilaginosa* presenta un patrón de tolerancia muy similar a estas, a diferencia de que presenta una mayor tolerancia que en la obtenida en medio YPD bajo las mismas condiciones en la cuenta poblacional en las últimas concentraciones de etanol. Sin embargo, dicha cepa también se ve afectada a concentraciones superiores al 9% de alcohol en el medio observando que ya no le es posible crecer bajo esas condiciones estresantes (fig. 25).

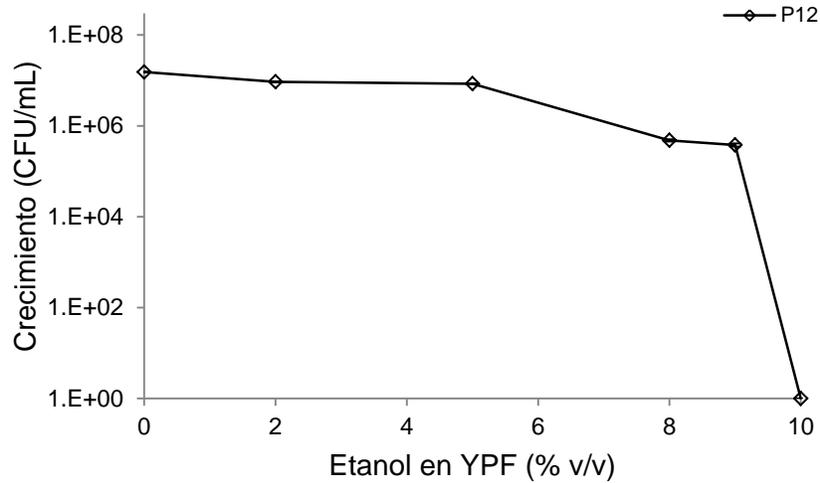


Figura 25. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPF de la cepa *R. mucilaginoso* del cepario de LBI-CBG.

Las cepas de la especie *Clavispora lusitaniae* y *Candida* mostraron ser de similar tolerancia alcanzando un valor máximo de 8% en algunas de las cepas de dichas especies. Dichas cepas al igual que el resto de las cepas analizadas en esta investigación se ven afectadas por la presencia del etanol. Sin embargo, estas especies a bajas concentraciones ya comienzan a presentar un decremento poblacional aunque no muy distinto al del resto de las especies anteriores (fig. 26). No obstante la cepa 4Y4 muestra una mejor tolerancia alcanzando un máximo de 9% mientras que algunas se mantienen en 8% y otra son aun mas bajas alcanzando solo un 5%.

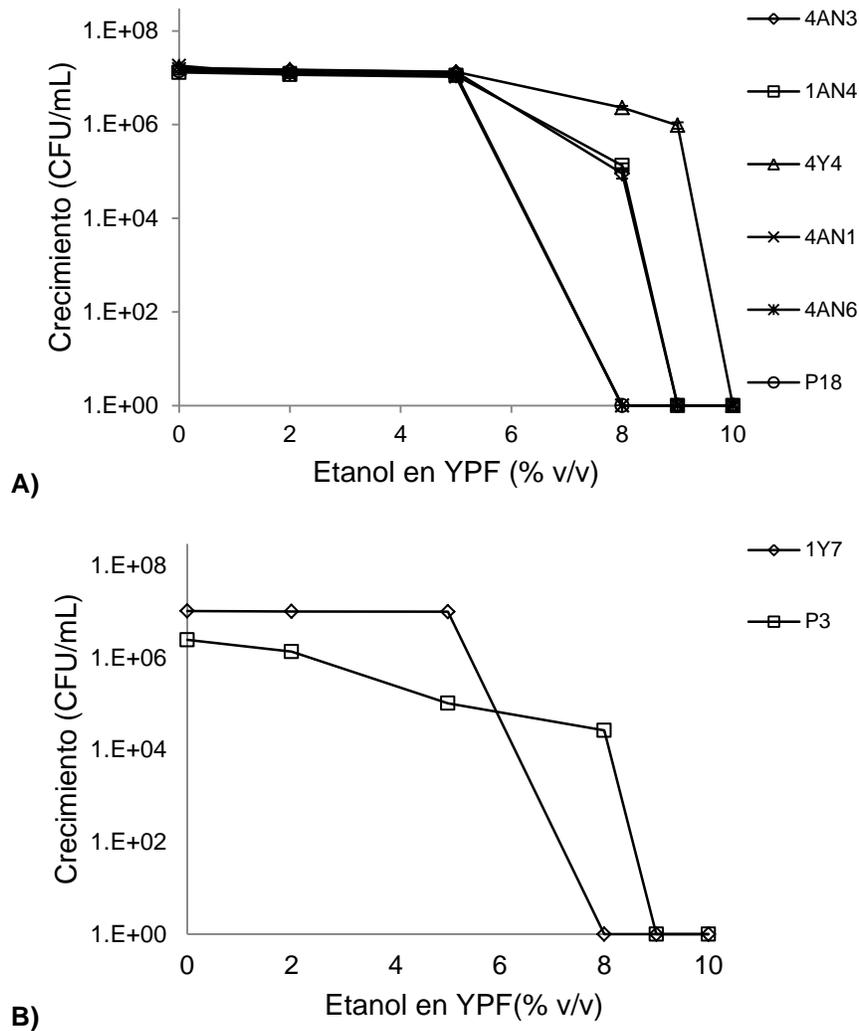


Figura 26. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YPF de las cepas de la especie *C. lusitaniae* (A) y *Candida* (B) del cepario de LBI-CBG.

Sin embargo, a diferencia de las cepas de *S. cerevisiae* las cepas de las no-*Saccharomyes* se vieron mayormente influenciadas con el incremento de etanol, con una diferencia significativa entre *Candida parasilopsis* que mostro la tolerancia mas baja y *S. cerevisiae*, especie que fue la de mayor tolerancia a dicho estrés.

De manera conjunta se realizo un análisis de varianza en las concentraciones crecientes de etanol para corroborar de manera estadística la variabilidad entre cepas bajo dichas condiciones de estrés.

El test de Tukey (apéndice 1) nos mostro que las diferencias significativas existieron en la mayoría de las cepas evuvaluadas prácticamente en todas las concentraciones de etanol en el medio, puesto que a concentraciones bajas como 5% las diferencias significativas existen ya a gran escala propiciando diversos grupos de tolerancia y cabe resaltar la mayor variabilidad posiblemente ligada al azúcar del medio en cuestión viéndose reducida su capacidad de tolerancia a un 9% en comparación con el medio anterior (YPD).

VII.4 Tolerancia al etanol de acuerdo a la hexosa presente

La tolerancia a concentraciones crecientes de etanol, se evaluó en más detalle para todas las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de glucosa o fructosa a una concentración de 20 g/L, lo que resultó en prácticamente la misma cantidad de crecimiento (G simboliza aquí el crecimiento en UFC/mL en una escala logarítmica) de 0 hasta 8% de etanol. En concreto, el crecimiento en glucosa fue $G_{glc} = 6.41 \pm 0.24 \log \text{ UFC/mL}$, mientras que con la fructosa, el crecimiento fue $G_{fru} = 6.35 \pm 0.38 \log \text{ UFC/mL}$, por lo tanto una relación de $G_{fru}/G_{glc} = 1.00 \pm 0.03 \log \text{ UFC/mL}$ en todas las cepas de *S. cerevisiae*, incluyendo Fermichamp. Por lo tanto la disminución en el crecimiento en este rango de concentraciones crecientes de etanol (0 a 8% v/v de etanol) puede atribuirse únicamente al efecto inhibitorio del etanol y no a la hexosa utilizada. Cuando sólo se utilizó etanol sin hexosa (medio YP), la proporción de crecimiento de las cepas bajo esta condición era: Etanol/Hexosa = $0.8 \pm 0.06 \log \text{ UFC/mL}$, con excepción de las levaduras que no fueron capaces de mostrar crecimiento bajo estas condiciones (*S. cerevisiae* 4Y3, 3D2 y 3D3, correspondiente al grupo de tolerancia 3 en la fig. 5), por lo tanto, éstas no fueron consideradas para el cálculo.

Curiosamente, cuando la concentración de etanol fue mayor a 8% en presencia de fructosa (a 20 g/L), lo que podría ser un caso típico en la etapa tardía de casi cualquier bebida de fermentación alcohólica, para todas las especies de levaduras probadas en este trabajo, incluyendo *S. cerevisiae*, se observo una drástica caída en la tolerancia máxima al etanol (Fig. 27A y 27B), que se marca gráficamente con una flecha hacia la izquierda. Este comportamiento único, se observó sólo cuando estaba presente la fructosa en lugar de glucosa, dando una caída en la tolerancia de 129 a 77 g/L de etanol. Este comportamiento general no ha sido reportado antes en lo que se comoce en levaduras, se evidencia un efecto inhibitor de la fructosa (o un efecto general de la potenciación del efecto tóxico de etanol) en lugar de un excedente de fuente de carbono para todas las levaduras, incluida la cepa control fructofílica Fermichamp.

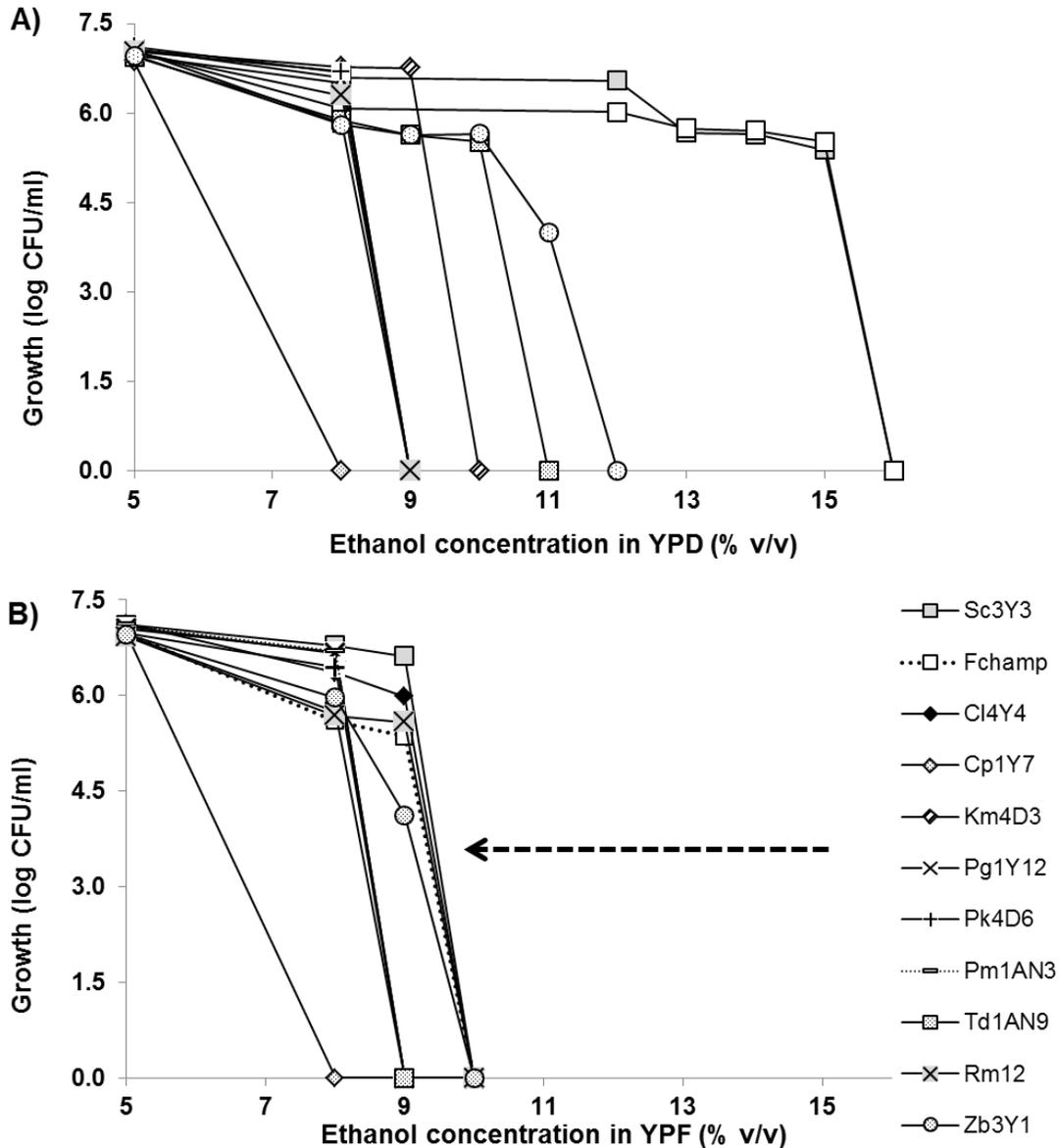


Figura 27. Tolerancia a concentraciones crecientes de etanol mostrados por las cepas representativas de cada una de las especies encontradas en mezcal que crecen en la presencia de A) glucosa, o B) fructosa, ambos a una concentración de 20 g/L. Hubo una caída en la resistencia (subrayado por la flecha de puntos) para todas las especies cuando el etanol estaba por encima de 8% v/v y la fructosa era la fuente de carbono. Tomado de De la Torre-González et al. (2016)

Como consecuencia, las cepas inicialmente clasificadas como altamente resistentes a etanol en YPD, especialmente algunas cepas de *S. cerevisiae* que eran capaces de crecer hasta 15% v/v de etanol (3Y2, 3Y3, 3Y4, 3Y5, 3Y8, 3D2, 3D4, 3D5 y Fermichamp), mostraron una tolerancia máxima de etanol sólo del 9% cuando la fructosa era la fuente de carbono. Este fue también el límite de la cepas no-*Saccharomyces* Cl4Y4, RmP12 y Zb3Y1 (fig. 27B) en esta hexosa. Para el resto de las cepas, la máxima resistencia a etanol fue de 8%, tanto en glucosa y fructosa.

VII.5 Tolerancia al etanol en medio YPDF

Para un mejor análisis de las variaciones observadas en el efecto, en menor o mayor medida, del crecimiento poblacional de cada cepa a través de las distintas concentraciones crecientes de etanol así como por el cambio en la fuente de carbono (glucosa/fructosa) que aparentemente estaba dándose en las diferentes especies de levaduras, se realizó una prueba más bajo las mismas concentraciones crecientes de etanol en el medio, pero empleando en esta ocasión una mezcla en los azúcares (glucosa/fructosa) de manera equimolar a 20 g/L de concentración total, para corroborar el posible efecto que pudiera tener el cambio de hexosa en el medio, además de la toxicidad propiciada por el etanol en el medio para los datos de cada una de las 10 especies de la colección.

Cuando se utilizó una mezcla equimolar de glucosa y fructosa (medio YPDF), se observó que la presencia de glucosa contrarresta parcialmente el efecto negativo de fructosa para las cepas de *S. cerevisiae* probadas, así como para la no-*Saccharomyces K. marxianus*, *P. guilliermondii*, *T. delbrueckii* y *Z. bailii*, que les permite aumentar su tolerancia a al menos 2% v/v de etanol más con respecto al valor obtenido sólo con fructosa. Esto significa que *S. cerevisiae* (3Y3 y Fermichamp) y *K. marxianus* 4D3 aumentaron su tolerancia del 9 al 12% de etanol en el medio equimolar, mientras que *T. delbrueckii* 1AN9 y *Z. bailii* 3Y1 aumentaron su tolerancia del 8 al 10% de etanol en este medio, con este último muestra un crecimiento de un orden de magnitud en esta mezcla equimolar que en solamente en glucosa a la misma concentración de etanol. Para el resto de las especies no hubo ningún efecto positivo al utilizar el medio de glucosa / fructosa de manera equimolar.

VII.5.1 Tolerancia en medio YP con etanol como única fuente de carbono

Concluidas las pruebas de tolerancia realizadas en los medios YPD y YPF, se observó que en la especie *S. cerevisiae* el patrón de tolerancia era variable con respecto a cada medio empleado durante el análisis por lo que considerando la importancia que tiene dicha especie en los estudios de los procesos fermentativos como lo observado en esta investigación, se procedió a utilizar una condición más limitante, quitando la hexosa del medio y dejando únicamente el etanol como única fuente de carbono a concentraciones crecientes de 2, 5, 7, 8, 9 y 10% v/v para corroborar y someter a prueba nuevamente la capacidad de tolerancia de dicha especie. Dicho análisis se realizó por triplicado para cada cepa y concentración de etanol empleadas en la investigación.

Para un mejor análisis de las variaciones producidas en el tamaño poblacional a través de las distintas concentraciones crecientes de etanol se representan gráficamente los datos de las diferentes levaduras de la especie.

En ausencia de etanol todas las cepas muestran un crecimiento propio de la levadura que aunque diferente al observado en los medios con hexosa como fuente de carbono sigue siendo propio del crecimiento normal. Sin embargo, a medida que se encuentra en presencia e incrementa la concentración de etanol en el medio se observa una disminución progresiva en el número de colonias de las diferentes cepas, observando que el crecimiento de cada cepa se ve afectada en menor o mayor medida según la concentración de etanol.

El patrón de tolerancia observado en este medio fue de cierta forma similar a los patrones observados en los medios con azúcar, no obstante es de destacar que dicha capacidad de tolerancia se vio gravemente afectada en comparación con los datos obtenidos en el medio YPD que mostraba una tolerancia de hasta 15% mientras que en esta prueba se observó una máxima de 9% (fig. 28). Sin embargo, es de vital importancia mencionar que las máximas, medias y bajas tolerancias de las diferentes cepas se mantuvo hablando en términos de baja, media y alta tolerancia, que si no fue el mismo valor en porcentaje mantuvieron su rango de capacidades en tolerancia a dicho alcohol.

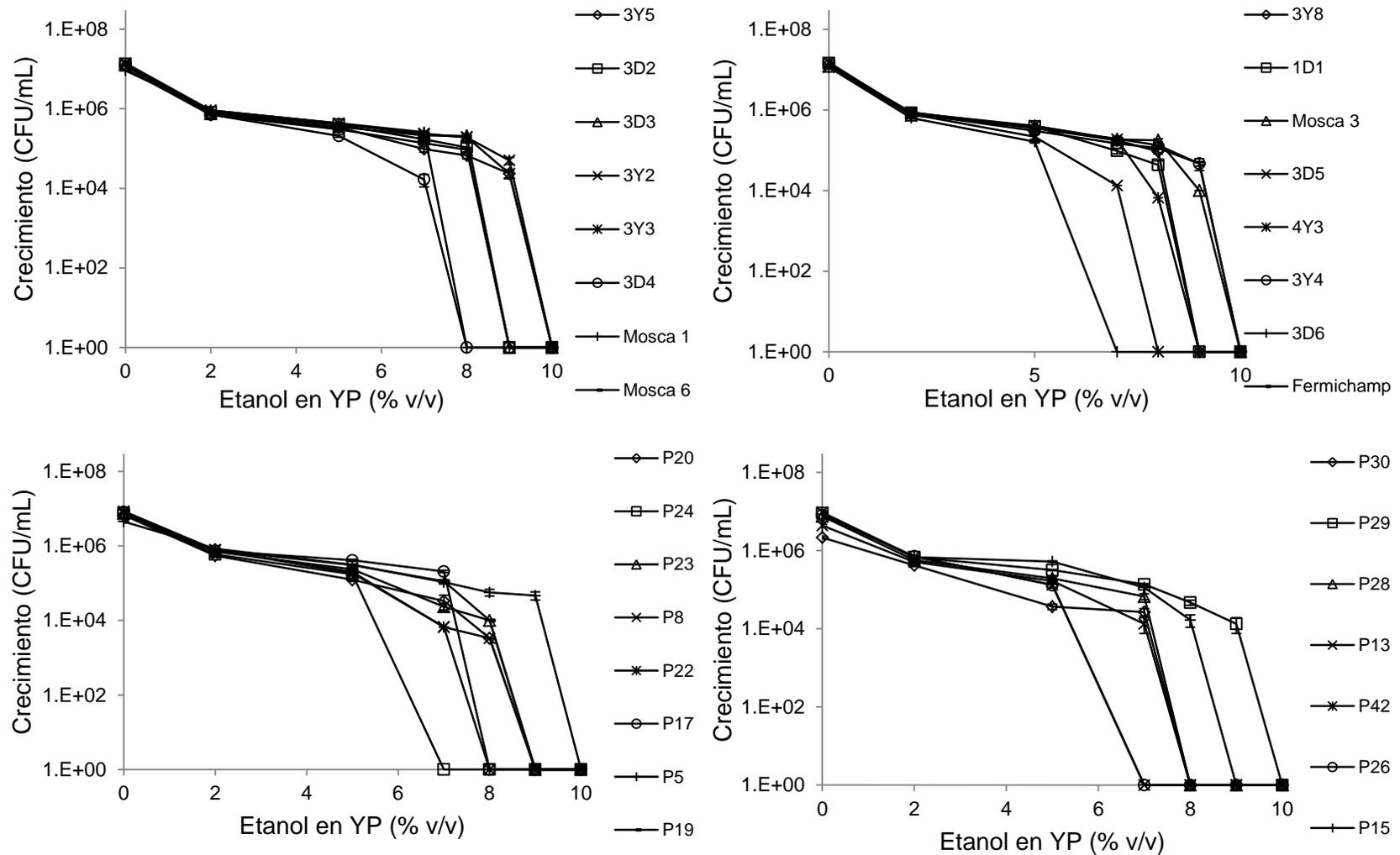


Figura 28. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de etanol en YP (ausencia de hexosas) de las cepas *S. cerevisiae* del cepario de LBI-CBG.

El seguimiento de la evolución poblacional de cada una de las cepas de la especie en presencia de concentraciones crecientes de etanol logro la identificación de las cepas con alta tolerancia al etanol en medio con y sin hexosa. Dichos análisis muestran una correlación en los datos arrojados por el conteo realizado sugiriendo que son la Sc3Y4 y Sc3Y8 las cepas de mayor tolerancia y producción al etanol lo cual a nivel industrial resulta de vital importancia.

De manera conjunta se realizó un análisis de varianza en las concentraciones crecientes de etanol para corroborar de manera estadística la variabilidad entre cepas bajo dichas condiciones de estrés.

El test de Tukey (apéndice 1) nos mostro que las diferencias significativas existieron en la mayoría de las cepas evaluadas prácticamente en todas las concentraciones de etanol en el medio, puesto que a concentraciones bajas como 5% las diferencias significativas existen ya a gran escala propiciando diversos grupos de tolerancia y cabe resaltar la mayor variabilidad posiblemente ligada a la falta de azúcar del medio en cuestión, viéndose reducida su capacidad de tolerancia a un 9% en comparación con el medio anterior (YPD) y muy similar a la de YPF.

VII.6 Tolerancia a altas concentraciones de fructosa

Las levaduras suelen adaptarse y, consecuentemente, sobrevivir y reproducirse en condiciones cambiantes. Debido a que el ambiente natural de dichos organismos suelen ser frutos o los jugos de estos, suelen enfrentarse a condiciones de estrés hiper-osmótico dado por altas concentraciones de azúcar presentes en su ambiente. Resulta de vital importancia el entendimiento y análisis de dicho efecto puesto que uno de los procesos más explotados por la humanidad son los procesos fermentativos en los cuales las levaduras suelen exponerse a un 20% de azúcar (vino) al inicio del proceso y a una ausencia de azúcar al final, por lo que se espera que dichos organismos poseen la capacidad de adaptarse a cambios de osmolaridad extrema.

Se evaluaron 30 cepas de la especie *S. cerevisiae* y la cepa control Fermichamp bajo condiciones estresantes de hiper-osmolaridad utilizando concentraciones crecientes de fructosa que iban de 50 a 900 g/L. La máxima tolerancia a la fructosa de las diferentes cepas se realizó por triplicado, dicho análisis de las variaciones producidas en el tamaño poblacional a través de las distintas concentraciones crecientes de fructosa se representan gráficamente los datos de las diferentes levaduras de la especie en la fig 29.

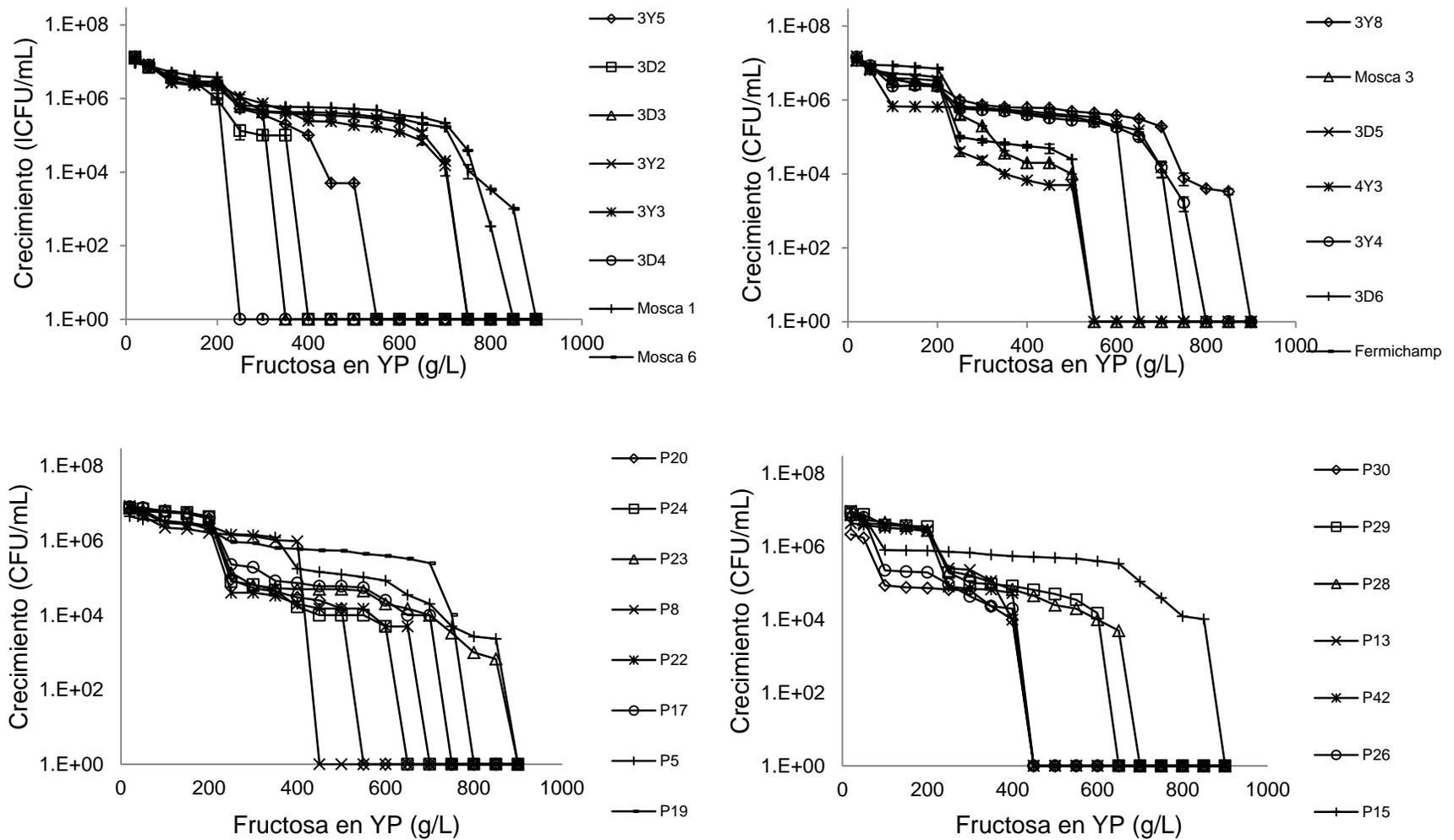


Figura 29. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de fructosa en YP de las cepas *S. cerevisiae* del cepario de LBI-CBG.

En presencia del 2% de fructosa (composición normal del medio) todas las cepas muestran un crecimiento propio de la levadura, incluso a un 5% muestra un crecimiento normal y rapido. En general, la mayoría de las cepas fueron capaces de desarrollar colonias en todas las diluciones a las primeras concentraciones de fructosa después de 24 h de incubación a 30 °C. Sin embargo, a medida que se encuentra en presencia de concentraciones altas de dicho azucar en el medio se observa un efecto negativo resultando en una disminución progresiva en el numero de colonias de las diferentes cepas, observando que el crecimiento de cada cepa se ve afectada en menor o mayor medida según la concentración de fructosa.

El patrón de tolerancia observado en este medio fue de cierta forma similar a los patrones observados en las pruebas de tolerancia a etanol, mostrando una clara variedad en tolerancia de las diferentes cepas analizadas alcanzando minimos de 200 g/L y máximos de 850 g/L. Durante el análisis de los datos arrojados se observo que de nueva cuenta las cepas de mayor tolerancia a la fructosa resultaron ser la Sc3Y4 y Sc3Y8 aun mejores que la cepa control (fermichamp) que de acuerdo a la literatura y lo reportado se sabe que presenta un carácter fructofilico. Sin embargo, a pesar de ser una de las cepas de mayor tolerancia (700 g/L) no logro soportar las altas concentraciones de fructosa como las 2 cepas aisladas de los mostos de mezcal tamaulipeco.

Considerando la dependencia de la habilidad de las levaduras del género no-*Saccharomyces* a tolerar altas concentraciones iniciales de azúcar en el medio asi como concentraciones crecientes de etanol que oscilan entre 15-20% v/v durante el proceso fermentativo, procedimos a emplear dichas características como primer nivel de selección para dicho grupo de levaduras de la colección del laboratorio de biotecnología industrial, puesto que se ha reportado que aquellas cepas etanol-resistentes suelen tener la capacidad de resistir a otro tipo de estrés como el osmótico, oxidativo y el producido por altas temperaturas (Mehdikhani *et al.*, 2011).

De manera similar e independiente se evaluaron las diversas cepas de las especies *Clavispora lusitanae*, *Candida parasitopsis*, *K. marxianus*, *Pichia guilliermondii*, *P. kluyveri*, *P. mexicana*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *T. delbrueckii* y *Z. bailli* bajo condiciones estresantes de hiper-osmolaridad utilizando concentraciones crecientes de fructosa, que iban de 500 a 900 g/L. La máxima tolerancia se representan gráficamente en la fig 30.

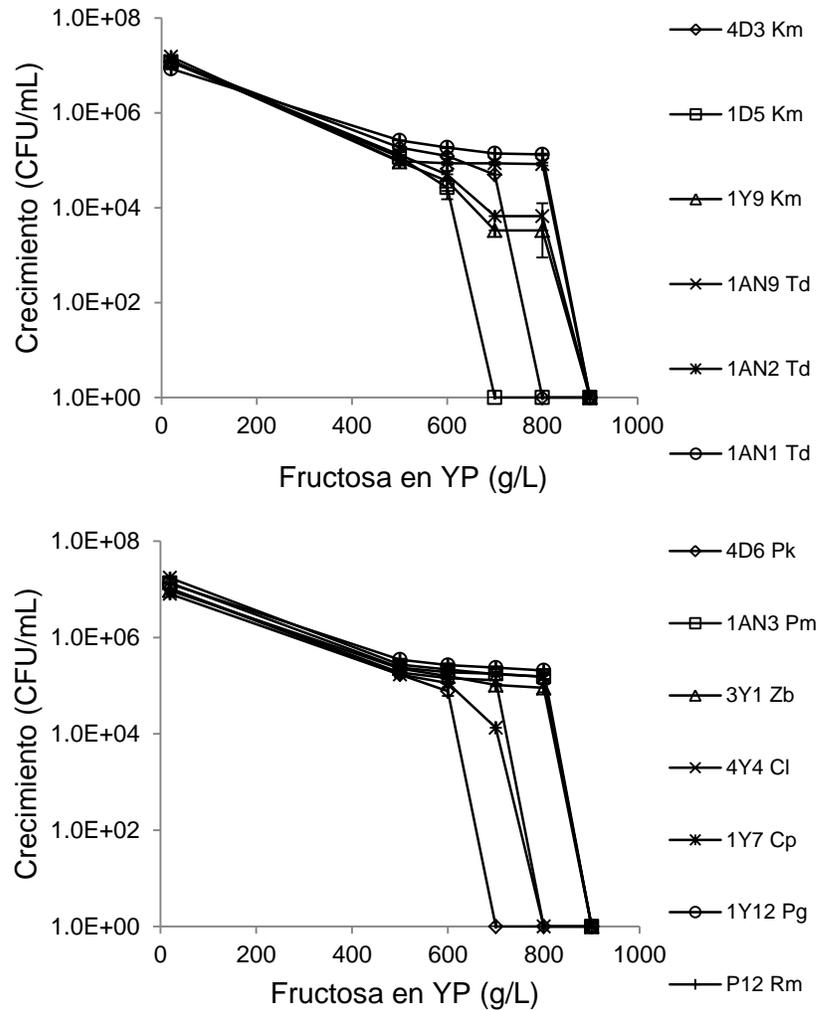


Figura 30. Tolerancia evaluada como capacidad de crecimiento a concentraciones crecientes de fructosa en YP de las cepas de las diversas especies del cepario de LBI-CBG.

Por otra parte, la especie *Z. bailli* de la colección de LBI mostró una alta tolerancia a las concentraciones crecientes de fructosa en el medio con hasta 80 % p/v.

En general, la mayoría de las cepas fueron capaces de desarrollar colonias en todas las diluciones a las primeras altas concentraciones de fructosa después de 24 h de incubación a 30 °C. Sin embargo, a medida que se encuentran en presencia de concentraciones mas altas de dicho azucar en el medio se observa un efecto negativo resultando en una disminución progresiva en el numero de colonias de las diferentes cepas, observando que el crecimiento de cada cepa se ve afectada en menor o mayor medida según la concentración de fructosa.

El patrón de tolerancia observado en este medio fue de cierta forma similar a los patrones observados en las pruebas de tolerancia a etanol, mostrando una clara tolerancia de las diferentes cepas analizadas

alcanzando mínimos de 600 g/L y máximos de 800 g/L. Durante el análisis de los datos arrojados se observó que las diversas cepas de de las diferentes especies lograron alcanzar altos rangos de tolerancia a la fructosa resultado que de acuerdo a la literatura y lo reportado se sabe puesto que presentan un carácter tolerante debido a ser aquellas que inicialmente se encuentran en el proceso fermentativo. Sin embargo, a pesar de ser cepas de alta tolerancia (600 g/L) aun encontramos otras que muestran un carácter más tolerante mostrando la capacidad de dichas cepas aisladas de los mostos de mezcal tamaulipeco.

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas a nivel especie de acuerdo a la prueba T-Student realizada en los datos obtenidos, por consiguiente no se observa una diferencia notoria en la respuesta de las cepas de las diversas especies bajo las concentraciones crecientes de fructosa. No obstante al analizar bajo la misma prueba estadística cada una de las cepas de las diferentes especies se logró observar una diferencia significativa entre la cepa de *Pichia guilliermondii* y el resto de las cepas aquí analizadas.

De manera conjunta se realizaron análisis de varianza en distintas concentraciones de fructosa para corroborar de manera estadística las diferencias o variabilidad en cuanto a la tolerancia de cada una de las cepas analizadas en esta investigación.

El test de Tukey (apéndice 1) mostró que existieron diferencias significativas en la mayoría de las cepas evaluadas, prácticamente en todas las concentraciones de fructosa en el medio, formándose grupos de las levaduras con tolerancia baja, moderada, alta, muy alta y extrema. Finalmente observamos que prácticamente en todas las pruebas de estrés aplicadas a la colección de cepas del LBI-CBG era posible encontrar una alta diversidad fenotípica de tolerancia a la fructosa y al etanol, en rango que eran aun mayores que los impuestos por la fermentación del mezcal, que es de donde fueron aisladas.

VII.7 Análisis global de la tolerancia al estrés para las cepas de *S. cerevisiae*

El final de casi cualquier fermentación alcohólica, se caracterizan por concentraciones altas de fructosa y etanol, y también por el predominio casi absoluto de las especies *S. cerevisiae*, por lo tanto, se utilizó una combinación de crecimiento testigo en condiciones de cultivo normales y aquél cuantificado en cuatro condiciones de estrés (altos niveles de etanol con y sin hexosas presentes, y el crecimiento a alta presión osmótica causada por fructosa) como una manera de clasificar los fenotipos observados para esta especie.

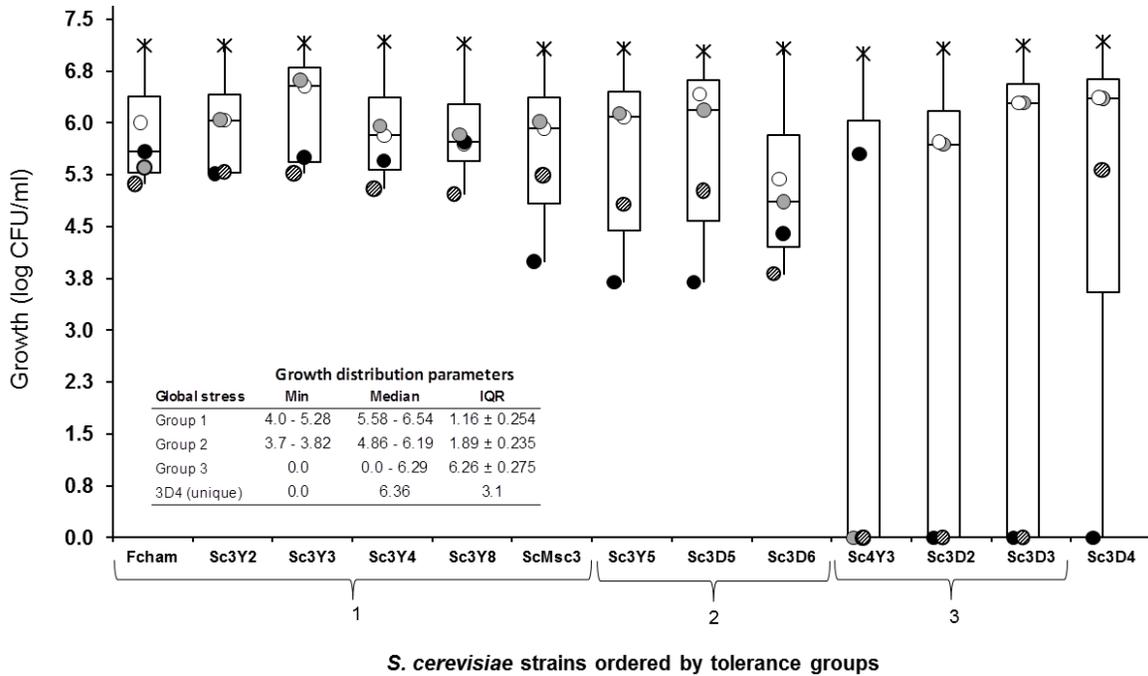


Figura 31. Análisis global tipo box plot de la tolerancia de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* del mezcal que comparan el crecimiento promedio alcanzado en medios sólidos en las siguientes condiciones: YPD normal (estrellas negras), YPD más etanol al 12% (puntos blancos), YPF, más 9% de etanol (puntos grises), YP más 8% de etanol (puntos rayas) y YP más 500 g/L de fructosa sin etanol (puntos negros). Los valores que describen la distribución de cada grupo de tolerancia y el caso único se presentan en la parte superior derecha de la figura. Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces, se presentan valores promedio y la desviación estándar fue siempre menor que 10%. Tomado de De la Torre-González et al. (2016)

Como se puede observar (fig. 31), la tolerancia a los estreses estudiados para las cepas de *S. cerevisiae* de mezcal, expresado como el crecimiento combinado alcanzado en las condiciones analizadas, se pueden clasificar en 3 grupos y un comportamiento único como lo demuestra su cuadro de distribuciones de la siguiente manera: levaduras en el grupo 1 (cepas Sc3Y2, Sc3Y3, Sc3Y4, Sc3Y8, ScMSC3 y cepa control Fermichamp) obtenido buenos resultados en los cuatro estreses probados y tenía el rango más bajo intercuartílico (IQR) y más altos valores mínimos, que corresponde al más robusto crecimiento (en forma) de estas cepas; levaduras en el grupo 2 (incluyendo levaduras Sc3Y5, Sc3D5 y Sc3D6) fueron similares a la anterior, pero tuvo una menor tolerancia a la alta concentración de fructosa; grupo 3 levaduras (Sc3D3, Sc3D2 y Sc4Y3) fueron tolerantes al etanol en presencia de glucosa o fructosa, pero no al etanol sin hexosa, y tenían una baja tolerancia a la alta concentración de fructosa; y finalmente, como un caso individual, la cepa Sc3D4 era tolerante al etanol con o sin la presencia de cualquier hexosa, mostrando un alto valor de crecimiento media de 6.36, similar al grupo 1, pero era muy sensible a la concentración de alta fructosa. Todo esto indica una alta diversidad fenotípica de las cepas de *S. cerevisiae* de mezcal en términos de tolerancia a etanol y fructosa.

De la evaluación de tolerancia a los diferentes estrés impuestos por el tipo de azúcar y etanol presente en el medio realizado para todo el cepario, se seleccionaron 26 cepas, manteniendo representantes de alta y baja tolerancia de las 10 especies de la colección, y se dividió en dos grandes grupos, *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, con el fin de utilizarlas en las fermentaciones. Se evaluaron inicialmente la cepa control (Sc Fermichamp), Sc3Y4 y Sc3Y8 evaluando crecimiento y consumo de azúcares en medio sintético y luego en el sustrato real. En primer lugar se presentan los resultados en el modelo del vino, en primer lugar en el medio sintético M3, con el cual además se seleccionaron aquellas cepas que se utilizaron para los cultivos mixtos, y que se probaron posteriormente en jugo de uva. En el segundo modelo, de mezcal (tequila) se utilizó el medio sintético M2, y con cultivos mixtos se realizaron las fermentaciones en mosto de *Agave tequilana* var Weber azul.

VII.8 Caracterización de las levaduras en medio sintético M3 y en jugo de uva

VII.8.1 Producción de metabolitos en medio sintético tipo uva (M3)

El medio sintético M3 (200 g/l, glucosa-fructosa 1:1) se utilizó para evaluar las características de la producción de etanol, glicerol, ácido acético, biomasa, consumo de azúcares y liberación de CO₂. Las cepas inicialmente evaluadas mostraron un carácter típico glucofilico puesto que es este azúcar el primero en mostrar un mayor consumo en comparación con el de la fructosa. La cepa control Fermichamp mostró una menor residualidad de la fructosa presente en el medio, mientras que los aislamientos Sc3Y4 y Sc3Y8 aun que presentan un buen consumo de dicho azúcar, mostraron una mayor residualidad en comparación con la cepa control. En cuanto a la producción de otros metabolitos ambas cepas mostraron comportamiento similar entre ella.

En general más del 90% de los azúcares es consumido a las 72 h por la cepa control mientras que para las otras cepas se presenta cerca de las 96 h (fig. 32). Sin embargo, al inicio de la fermentación dado la diferencia de consumo de azúcares durante el proceso fermentativo, se observa una mayor discrepancia G/F la cual se ve reducida una vez que la glucosa comienza a ser limitante en el medio, mostrando al final de la fermentación una similaridad en la fructosa residual así como en la producción de etanol.

En general, la cepa Sc3Y4 mostró un mejor perfil fermentativo que la Sc3Y8 puesto que presenta la menor residualidad en los azúcares presentes en el medio al final de la fermentación. Con base en los resultados obtenidos en dichas cinéticas se tomo como punto final 96 h para poder comparar todas y cada una de las 25 diferentes cepas obteniendo los resultados mostrados el cuadro 11.

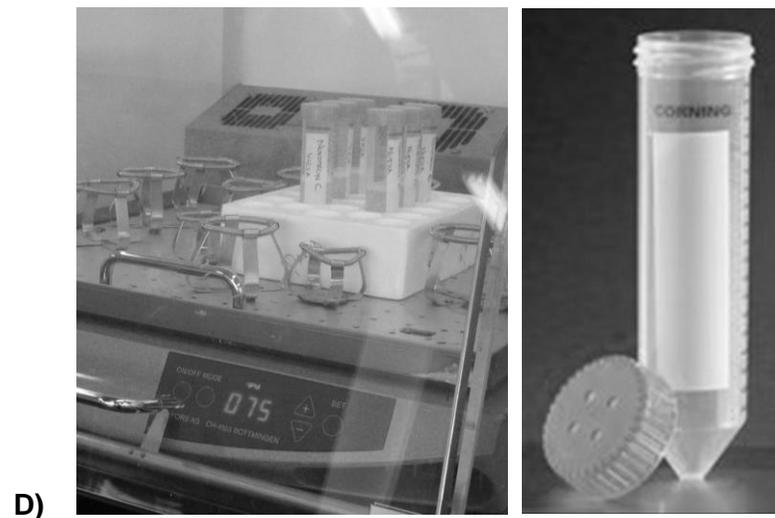
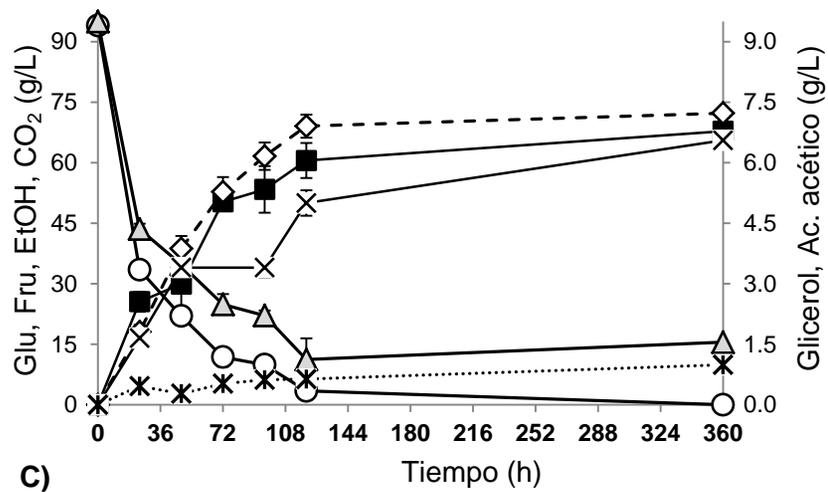
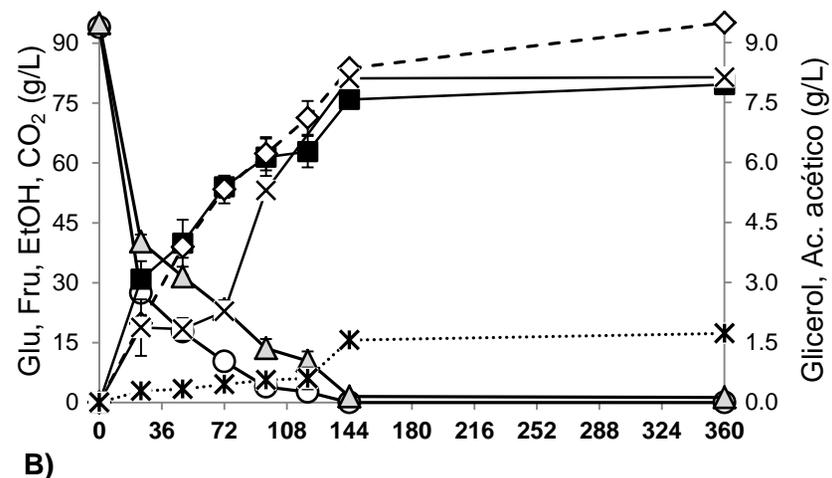
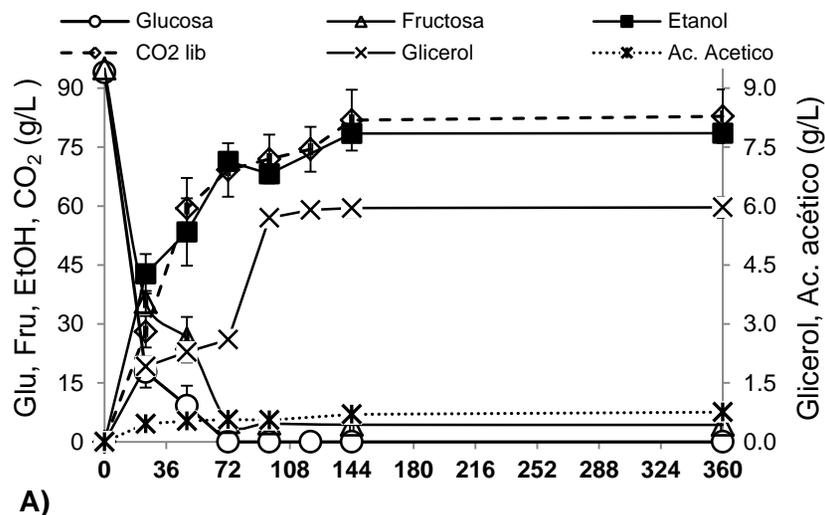


Figura 32. Cinética de la fermentación en mosto de vino sintético (M3) en minibioreactores de 50 mL de 3 cepas de *Saccharomyces*: A) Fermichamp, B) Sc 3Y4 y C) Sc 3Y8, D) Sistema físico utilizado para las minifermentaciones mostrando el detalle de la tapa con los orificios de aireación.

Cuadro 11. Consumo de azúcares y producción de metabolitos primarios de todas las cepas a las 96 h de fermentación en medio M3, 200 g/L de azúcares iniciales (G/F=1:1).

Cepa	Glucosa	Fructosa	Etanol	CO ₂	Glicerol	Ac. Acetico	Peso seco
<i>S. cerevisiae</i>							
	g l ⁻¹						
3D4	0.44 ± 0.63	6.49 ± 5.59	66.0 ± 2.80	89.4 ± 7.31	6.93 ± 0.25	0.5 ± 0.03	5.42 ± 0.17
3D5	1.14 ± 1.61	8.98 ± 10.01	65.1 ± 4.86	90.0 ± 7.99	6.30 ± 0.17	0.3 ± 0.10	5.73 ± 0.13
3Y2	29.9 ± 3.88	54.8 ± 3.08	38.0 ± 0.18	49.8 ± 1.95	3.30 ± 0.18	0.0 ± 0.00	6.91 ± 1.65
3D6	0.34 ± 0.48	6.61 ± 2.68	68.4 ± 7.10	90.7 ± 1.42	8.15 ± 0.46	0.5 ± 0.03	5.85 ± 0.17
1D1	4.97 ± 2.60	28.0 ± 7.18	57.7 ± 3.72	75.3 ± 2.80	7.63 ± 0.16	0.6 ± 0.06	4.95 ± 0.27
Mosca3	0.00 ± 0.00	2.66 ± 0.49	67.9 ± 0.37	94.0 ± 0.46	6.95 ± 0.19	0.3 ± 0.06	5.74 ± 0.15
4Y3	0.00 ± 0.00	3.59 ± 2.87	67.2 ± 0.22	92.9 ± 0.59	7.35 ± 0.13	0.3 ± 0.01	5.65 ± 0.08
3D2	1.15 ± 0.32	12.5 ± 1.73	65.4 ± 1.20	88.3 ± 1.97	8.34 ± 0.10	0.9 ± 0.01	5.64 ± 0.08
3Y3	9.90 ± 14.0	21.7 ± 23.4	58.8 ± 13.5	75.8 ± 19.2	7.27 ± 1.04	0.8 ± 0.09	4.88 ± 0.45
3Y5	9.87 ± 6.70	26.9 ± 9.66	57.7 ± 7.34	72.2 ± 11.6	6.69 ± 0.12	0.5 ± 0.27	4.54 ± 0.30
3Y4	3.90 ± 1.36	13.5 ± 2.34	61.4 ± 4.68	83.0 ± 11.4	2.67 ± 0.11	0.5 ± 0.03	3.93 ± 0.43
3Y8	9.92 ± 1.47	22.1 ± 1.28	53.3 ± 5.79	84.5 ± 4.36	2.63 ± 0.24	0.6 ± 0.20	3.79 ± 0.19
Fermichamp	0.00 ± 0.00	4.65 ± 1.72	67.2 ± 1.38	97.7 ± 5.76	2.55 ± 0.01	0.5 ± 0.07	5.97 ± 0.27
<i>K. marxianus</i>							
4D3	30.2 ± 24.2	51.6 ± 17.8	34.5 ± 17.2	53.6 ± 24.2	5.29 ± 2.39	0.5 ± 0.49	4.83 ± 0.18
1D5	33.2 ± 0.52	57.2 ± 3.88	29.8 ± 2.09	46.0 ± 2.48	5.77 ± 0.67	0.2 ± 0.16	6.64 ± 0.55
1Y9	12.2 ± 12.9	34.8 ± 16.6	45.3 ± 17.2	66.5 ± 19.4	6.23 ± 1.90	0.5 ± 0.29	5.11 ± 0.61
<i>T. delbrueckii</i>							
1AN9	7.14 ± 5.25	27.8 ± 10.3	50.6 ± 7.59	77.9 ± 6.52	6.62 ± 0.71	0.9 ± 0.17	4.48 ± 0.47
1AN2	59.1 ± 3.03	67.9 ± 4.67	20.0 ± 3.06	27.4 ± 4.41	3.77 ± 0.40	0.0 ± 0.00	6.89 ± 0.80
1AN1	35.2 ± 3.93	58.3 ± 4.53	31.2 ± 0.19	37.4 ± 2.58	2.87 ± 0.03	0.0 ± 0.00	8.15 ± 0.41
<i>P. kluyveri</i>							
4D6	37.0 ± 4.81	60.8 ± 7.74	25.2 ± 2.85	34.7 ± 0.49	5.37 ± 0.69	0.2 ± 0.03	6.15 ± 0.49
<i>P. mexicana</i>							
1AN3	25.9 ± 4.92	51.4 ± 3.63	39.7 ± 3.70	49.6 ± 6.52	2.85 ± 0.20	0.0 ± 0.00	5.86 ± 0.76
<i>P. guillemondii</i>							
1Y12	83.0 ± 0.40	83.0 ± 0.44	6.28 ± 0.21	6.70 ± 1.32	0.42 ± 0.04	0.0 ± 0.00	7.35 ± 0.95
<i>Z. bailli</i>							
3Y1	46.2 ± 17.7	0.64 ± 0.31	56.3 ± 1.95	66.6 ± 9.95	8.35 ± 0.14	0.3 ± 0.02	6.42 ± 0.62
<i>C. lusitaniae</i>							
4Y4	24.8 ± 12.4	48.6 ± 10.8	40.0 ± 7.01	49.3 ± 11.7	3.03 ± 0.47	0.0 ± 0.00	6.18 ± 0.98
<i>C. parasilopsis</i>							
1Y7	45.8 ± 0.16	64.0 ± 0.34	18.9 ± 0.01	28.6 ± 5.09	5.74 ± 0.18	0.2 ± 0.00	7.75 ± 1.35
<i>R. mucilaginosa</i>							
P12-R	70.8 ± 19.6	76.2 ± 7.56	11.6 ± 13.9	13.3 ± 9.85	1.35 ± 1.91	0.5 ± 0.03	4.97 ± 1.27

De acuerdo a los datos analizados de las diferentes fermentaciones procesadas, observamos la gran variedad en los perfiles fermentativos de cada una de las diversas levaduras probadas, observando diversos grupos de consumo o residualidades de azúcares. Claramente se aprecian aquellas con alta capacidad fermentativa en la asimilación de los azúcares en el medio, tal es el caso de la mayoría de las cepas *S. cerevisiae* mientras que para las no-*Saccharomyces* se observa que aun bajo las mismas condiciones de fermentación no resultan buenas consumidoras de azúcares y por tanto se observa una baja producción de etanol. Sin embargo, cabe resaltar la alta capacidad de la cepa Zb3Y1 en consumo de fructosa, mostrando un carácter completamente fructofílico.

Tomando en cuenta la similitud del medio sintético aquí analizado con las concentraciones de azúcares presentes en los jugos de uva para la elaboración del vino, se realizó un análisis de cada uno de los datos de consumo y residualidad de azúcar así como la producción de los otros metabolitos presentes para seleccionar aquellas cepas con mejores características en consumo y producción para la evaluación en mosto real (jugo de uva), para dicha evaluación se seleccionaron aquellas cepas que presentaron el mejor perfil fermentativo dentro de las primeras 96 h además de las concentraciones y tipos de compuestos volátiles identificados en la fermentación.

De manera conjunta se realizó un análisis de varianza para corroborar de manera estadística la gran variedad en los perfiles fermentativos de cada una de las diversas levaduras analizadas, observando diversos grupos de consumo o residualidades de azúcares. Claramente se aprecian aquellas con alta capacidad fermentativa en la asimilación de los azúcares en el medio o aquellas mayormente productoras de metabolitos primarios, como puede observarse en las tablas siguientes.

La prueba de Tukey (apéndice 2) nos mostro que las diferencias significativas existieron en la mayoría de las cepas y especies evaluadas en los diferentes consumos y producción de metabolitos primarios, en los que se puede apreciar cepas como especies de alta, media y baja producción o consumo, según sea el caso en evaluación.

VII.8.2 Caracterización de los compuestos volátiles en medio tipo uva M3

En este trabajo inicialmente se evaluó la producción de compuestos volátiles para la cepa control (Fermichamp) y la Sc3Y4 en comparación con algunas cepas de uso industrial (cuadro 12) para observar la variedad y cantidad de compuestos teniendo así que se observaron 18 compuestos identificados y reportados en diversas bebidas alcohólicas como tequila, mezcal, sotol y vino (Lachenmaier *et al.*, 2006; Vera-Guzmán *et al.*, 2009; Molina-Guerro *et al.*, 2007). No obstante para la evaluación de las muestras del M3 y jugos de uva se centró en aquellos compuestos de interés en vino, debido a la similitud del

medio empleado en las fermentaciones realizadas. Se destacan los compuestos de ésteres encontrados puesto que su presencia en bebidas alcohólicas contribuye fuertemente a la generación de olores fuertes, dulces, florales y afrutados. Los componentes más abundantes fueron el butirato de etilo para el caso de algunas cepas de *Saccharomyces* y el fenil etil acetato para las no-*Saccharomyces*. Es posible atribuir que la variedad de ésteres identificados sean producto del metabolismo de las levaduras, puesto que la cantidad o concentración de cada compuesto vario dependiendo de la cepa empleada, destacando que la única diferencia entre procesos fermentativos fue la cepa utilizada.

Otra parte importante lo constituyen los alcoholes identificados de los cuales, algunos de ellos han sido reportados en la literatura como compuestos descriptores de aromas manejando notas aromáticas florales o frutales. El compuesto mayoritario de este grupo es el alcohol isoamílico, compuesto principal de los alcoholes superiores (Molina-Guerrero *et al.*, 2007).

Cuadro 12. Compuestos volátiles identificados en cepas nativas e industriales en el medio M3.

Compuesto	Cepa					
	Sc3Y4	Sc3Y8	Fermichamp	ICV D47	Bourgovin RC212	PE-2
Ácidos (g L⁻¹)						
Ácido acético	1.54 ± 0.08	0.47 ± 0.06	0.69 ± 0.02	0.74 ± 0.009	0.55 ± 0.05	0.54 ± 0.004
Alcoholes (mg L⁻¹)						
Butanol	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.01	1.97 ± 1.21	0.88 ± 1.24	2.45 ± 3.32	0.005 ± 0.007
Isobutanol	33.425 ± 7.58	51.44 ± 2.34	33.245 ± 2.86	13.24 ± 6.56	28.41 ± 2.38	8.86 ± 0.007
Alcohol isoamílico	84.12 ± 11.92	72.655 ± 37.42	99.745 ± 3.93	58.13 ± 9.49	65.78 ± 1.07	41.87 ± 1.78
1-Pentanol	6.38 ± 0.02	6.375 ± 0.10	6.55 ± 0.14	6.52 ± 0.19	6.55 ± 0.12	6.39 ± 0.00
1-Hexanol	1.355 ± 0.03	1.235 ± 0.007	1.75 ± 0.09	1.75 ± 0.10	1.71 ± 0.04	1.72 ± 0.07
1-Feniletanol	11.03 ± 0.70	17.895 ± 3.10	17.97 ± 1.01	10.79 ± 0.33	8.88 ± 4.27	10.88 ± 1.14
Aldehídos (mg L⁻¹)						
Acetaldehído	5.27 ± 0.42	5.185 ± 3.62	10.2 ± 4.24	35.47 ± 0.99	31.37 ± 3.91	28.87 ± 4.92
Ésteres (mg L⁻¹)						
Acetato de amilo	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.365 ± 0.51	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Acetato de etilo	0.275 ± 0.05	0.00 ± 0.00	2.015 ± 2.84	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Acetato de etilo fenilo	0.51 ± 0.05	0.46 ± 0.08	0.49 ± 0.05	0.81 ± 0.01	0.75 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Acetato de hexilo	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.08	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.14	0.00 ± 0.00
Acetato de isobutilo	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Acetato de pentilo	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Butirato de etilo	4.165 ± 1.49	6.56 ± 0.62	10.8 ± 1.01	11.96 ± 4.53	11.87 ± 0.34	4.94 ± 0.48
Caproato de etilo	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.3 ± 0.42	0.00 ± 0.00
Decanoato de etilo	0.12 ± 0.05	0.14 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.22 ± 0.07	0.25 ± 0.19	0.14 ± 0.20
Octanoato de etilo	0.02 ± 0.01	0.13 ± 0.05	0.01 ± 0.0	0.005 ± 0.007	0.015 ± 0.007	0.065 ± 0.02

Cuadro 13. Perfil de compuestos volátiles de todas las cepas a las 96 h de fermentación en medio M3, 200 g/L de azúcares iniciales (G/F=1:1).

G[enero	Alcohol isoamilico	Acetato de isoamilo	Fenil etil acetato	etil Decanoato de etilo	Octanoato de etilo	Hexanoato de etilo	Butirato de etilo
	(mg/L)						
				(µg/L)			
<i>Saccharomyces</i>							
Fermichamp	74.0 ± 4.24	43.0 ± 2.8	76.5 ± 23.3	13.0 ± 5.0	49.5 ± 17.7	59.0 ± 8.5	ND
Sc3Y2	47.5 ± 4.9	D	12.5 ± 4.95	D	D	ND	ND
Sc3Y3	62.5 ± 24.7	25.5 ± 19.1	28.0 ± 1.4	7.5 ± 2.12	31.0 ± 1.4	53.5 ± 14.85	ND
Sc3Y4	66.0 ± 1.4	36.0 ± 2.8	49.0 ± 4.2	21.0 ± 1.73	58.0 ± 0.01	73.5 ± 6.4	ND
Sc3Y5	52.5 ± 12.0	25.0 ± 14.1	123.5 ± 4.95	8.5 ± 0.71	15.0 ± 7.1	48.5 ± 16.3	ND
Sc3Y8	49.0 ± 4.2	D	16.0 ± 1.4	D	D	ND	ND
ScMsc3	59.5 ± 21.9	28.0	187.5 ± 40.3	7.5 ± 4.95	77.0 ± 8.0	76.0 ± 9.0	ND/D
Sc3D6	92.0 ± 7.1	42.0 ± 1.4	32.0 ± 12.7	9.0 ± 2.83	35.5 ± 12.0	69.0 ± 7.1	215 ± 8
Sc3D5	78.0 ± 8.5	27.0 ± 1.4	35.5 ± 12.0	12.0 ± 4.24	83.0 ± 14.1	82. ± 8.5	205 ± 8
Sc3D4	112.0 ± 0.7	46.5 ± 2.12	42.5 ± 3.5	15.5 ± 4.95	74.5 ± 19.1	81.0 ± 8.5	0.0
Sc3D2	67.5 ± 9.2	32.0 ± 2.83	47.0 ± 9.9	10.0 ± 0.01	48.0 ± 1.4	55.0 ± 4.2	0.0
Sc4Y3	74.0 ± 1.4	30.5 ± 0.71	25.5 ± 16.3	13.5 ± 6.36	71.0 ± 18.4	85.5 ± 0.7	230 ± 8
<i>Kluyveromyces</i>							
Km4D3	60.5 ± 27.6	33.0 ± 0.0	1693 ± 574	D	2.0 ± 0.01	ND	ND
Km1D5	15.0 ± 1.41	1774 ± 588	2422 ± 186	D	5.5 ± 0.71	ND	ND
Km1Y9	79.5 ± 23.3	23.5 ± 19	2772 ± 743	D	2.0 ± 0.01	ND	ND
<i>Torulaspora</i>							
Td1AN9	75.5 ± 9.2	13.5 ± 0.7	2594 ± 395	D	D	ND	ND
Td1AN2	44.0 ± 21.2	ND	100.0 ± 13	D	3.0 ± 0.01	ND	ND
Td1AN1	31.0 ± 4.2	ND	5.0 ± 1.0	D	D	ND	ND
<i>Pichia</i>							

Pk4D6	11.0 ± 0.0	414 ± 136	4754 ± 821	D	2.0 ± 0.01	ND	ND
Pm1AN3	41.0 ± 5.7	ND	19.5 ± 3.5	D	D	ND	ND
Pg1Y12	15.5 ± 0.7	ND	1.0 ± 0.0	D	D	ND	ND
<hr/>							
Candida							
Cp1Y7	ND	353 ± 64.3	5211 ± 452	D	2.0 ± 0.01	ND	ND
<hr/>							
Clavispora							
Cl4Y4	45.5 ± 4.95	ND	13.0 ± 6.0	D	D	ND	ND
<hr/>							
Rhodotorula							
Rm roja	21 ± 0.0	ND	11.6 ± 9.8	D	2.0 ± 0.01	ND	ND
<hr/>							
Zygosaccharomyces							
Zb3Y1	61.0 ± 2.8	12.0 ± 4.2	142.5 ± 36.1	D	D	ND	ND

En el análisis del cuadro 13 se observa una variabilidad en la concentración de cada uno de los compuestos identificados de las cepas estudiadas, observando que los valores encontrados entre las cepas son variados aun entre las cepas de la misma especie.

La concentración de ácido acético fue mayor para la cepa Sc3Y3, Sc3Y4, Sc3D2 y Td1AN9 mientras que para las otras cepas fue muy similar; dicho compuesto volátil resulta ser de gran impacto en el sabor del producto final.

El alcohol isoamílico resultó en general en concentraciones mayores para las cepas del grupo *Saccharomyces* que para las no-*Saccharomyces*, mostrando que aun entre cepas de la misma especie pueden presentarse valores distintos entre las diferentes cepas de levaduras aquí estudiadas. Por otra parte en el caso de las cepas no-*Saccharomyces* pareciera mostrar una concentración más similar puesto que los valores de dicho compuesto se mantienen en concentraciones que van de entre 40 y 70 mg/L a excepción de las cepas Km1D5 y Pg1Y12 puesto que presentan valores de 15 mg/L de dicho compuesto.

Por otra parte, en busca de una interpretación gráfica, se elaboró un análisis de componentes principales (ACP) a partir de las variables originales. Dando como resultado para el análisis de las cepas de la especie *S. cerevisiae* una varianza total igual a 5 provocado por la estandarización de las variables. De los diferentes puntos de varianza original el primer componente explica 4.28 que prácticamente representa el 61% de la varianza original. El segundo componente explica 1.53 (22%) de la varianza original (fig. 33). Los otros componentes explican porcentajes significativamente más bajos en comparación con los dos primeros, observándose la relación estrechamente ligada del primer componente con el hexanoato, octanoato y decanoato de etilo.

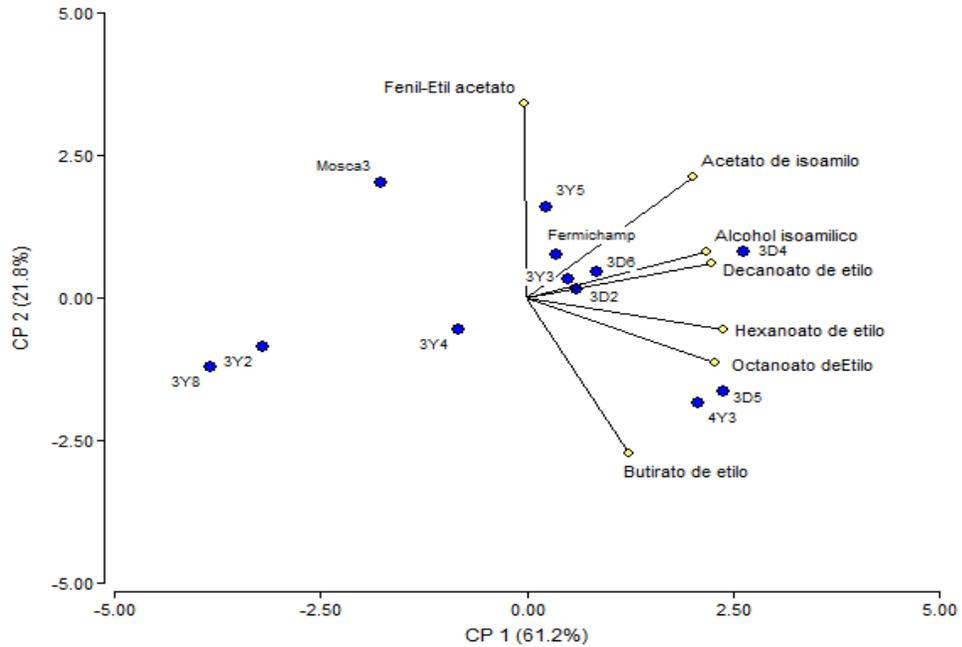


Figura 33. Analisis de los componentes principales (ACP) de la fermentación en medio M3 en mini biorreactores de 50 mL de las distintas cepas de *S. cerevisiae* analizadas.

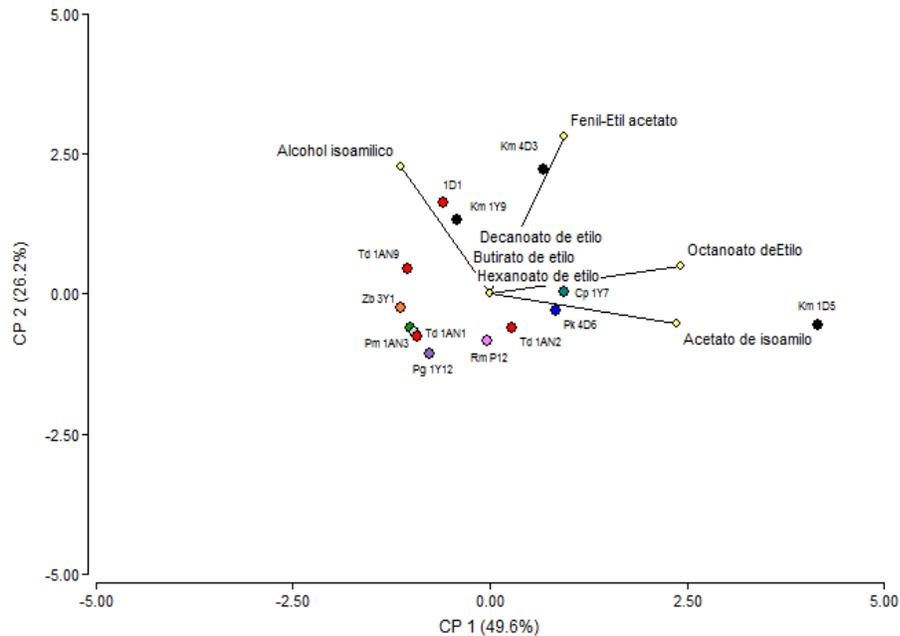


Figura 34. Analisis de los componentes principales (ACP) de la fermentación en medio M3 en mini biorreactores de 50 mL de las distintas cepas de no-*Saccharomyces* analizadas. Los colores representan las diferentes especies analizadas.

Las elevadas concentraciones de estos compuestos son una característica positiva en las cepas analizadas, por los aromas o sabores que dichos compuestos producen en las bebidas. De igual manera, también lo es el acetato de isoamilo, ya que a concentraciones elevadas genera aromas agradables en la bebida. En general se observa que la mayoría de las cepas se agrupan en el cuadrante superior

derecho de la figura 34 correlacionados también con el primer componente de variación. El segundo componente de variación corresponde al fenil etil acetato, compuesto caracterizado por los aromas florales en bebidas. El resto de variables explican poco de la variabilidad global del sistema.

VII.8.3 Caracterización de metabolitos en jugo de uva

Con base en los resultados observados en la evaluación de las diferentes cepas en el medio sintético M3 se seleccionaron un total de 7 cepas teniendo dos grupos: *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* a las cuales se les evaluaron las características de la producción de etanol, glicerol, ácido acético, biomasa, consumo de azúcares y liberación de CO₂. Para las cepas de *S. cerevisiae* seleccionadas se observaron comportamientos similares (fig. 35), no obstante la cepa Fermichamp mostró una mayor velocidad en el consumo de ambos azúcares presentando una menor residualidad alrededor de las 72 h, mientras que el resto de los aislados como Sc3Y4, Sc3Y8 y Sc3Y3 requieren más tiempo siendo este entre 120 y 144 h. Al final de la fermentación (360 horas) las cuatro cepas mostraron un rendimiento similar así como una residualidad de entre 10 y 12 g de azúcares totales.

En cuanto a los parámetros cinéticos en la primera evaluación, Fermichamp y Sc3Y4 fueron las que mayor cantidad de biomasa produjeron durante las primeras horas seguidas de la Sc3Y8 y Sc3Y3. Sin embargo, al final de la fermentación la biomasa fue similar para los 3 aislados del mezcal mostrando valores de entre 7 y 7.5 g, mientras que la Fermichamp mantuvo valores mayores a los de estas cepas alcanzando un valor de 11 g. En cuanto a etanol, las 4 cepas mostraron un mejor rendimiento dentro de las primeras 72 y 96 h puesto que en las horas siguientes del proceso fermentativo dicho rendimiento se ve afectado y en caída.

La cepa Fermichamp es la que mayor cantidad de etanol produce alcanzando valores alrededor de los 80 g/L, seguida de la Sc3Y4 y Sc3Y8 con valores de 67 g/L y finalmente la Sc3Y3 con un valor de 64 g/L. En cuanto a la producción de ácido acético así como de glicerol los valores observados fueron similares en las 4 cepas analizadas.

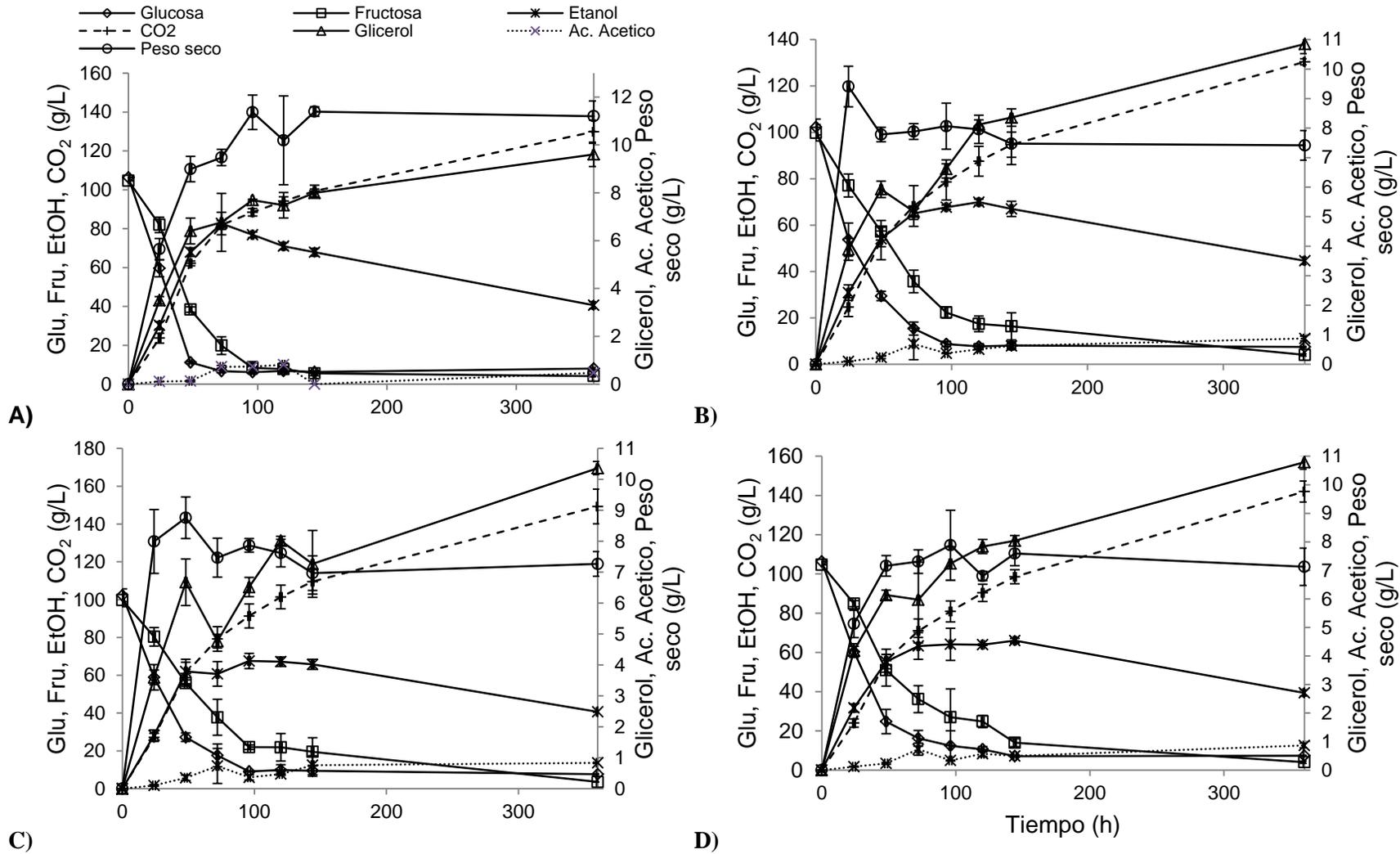


Figura 35. Cinética de la fermentación en jugo de uva roja en mini biorreactores de 50 mL de 4 cepas de *Saccharomyces*: A) Fermichamp, B) Sc3Y4, C) Sc3Y8 y D) Sc3Y3.

Las cepas no-*Saccharomyces* evaluadas mostraron un carácter típico glucofilico, observado un consumo general del 90% de la glucosa alrededor de las 96 h, a excepción de la cepa Zb3Y1 la cual presenta un carácter fructofilico mostrando un consumo del 90% de fructosa cerca de las 96 h (fig. 36C), mientras que las cepas Km1Y9 y Td1AN9 requieren mas tiempo siendo este entre 144 y 360 h (fig 36A y 36B). Al final de la fermentación las cepas Km1Y9 y Td1AN9 mostraron un rendimiento similar así como una residualidad de entre 10 y 11 g de azucares totales, mientras que la Zb3Y1 presento una residualidad de 8 g de glucosa.

En cuanto a los parámetros cinéticos, Zb3Y1 fue la que mayor cantidad de biomasa produjo durante el proceso fermentativo seguida de la Td1AN9 y la Km1Y9 que fue la cepa que menor cantidad de biomasa presento. Sin embargo, al final de la fermentación la biomasa fue similar para la cepa de Km1Y9 y Td1AN9 con valores de entre 5.5 y 6 g, mientras que la Zb3Y1 mantuvo valores mayores a los de estas cepas alcanzando un valor de 9 g. En cuanto a etanol, las 3 cepas mostraron un mejor rendimiento dentro de las primeras 72 y 96 h puesto que en las horas siguientes del proceso fermentativo dicho rendimiento se ve afectado y en caída.

La cepa Km1Y9 fue la que mayor cantidad de etanol produce alcanzando valores alrededor de los 70 g/L, seguida de la Td1AN9 y Zb3Y1 con valores de 60 g/L. En cuanto a la producción de glicerol los valores observados fueron similares en las 3 cepas analizadas. Sin embargo, en cuanto a la producción de acido acético las cepas Km1Y9 y Td1AN9 presentan concentraciones similares de alrededor de 0.50 g/L mientras que la producción de Zb3Y1 es mas bajo dando un valor de 0.17 g/L.

De acuerdo a los valores obtenidos durante el proceso fermentativo de cada una de las cepas analizadas, se observo un mejor rendimiento fermentativo dentro de las primeras 72 y 96 h puesto que conforme el proceso continua en las horas siguientes, el rendimiento se ve afectado mostrando una caída en la concentración del etanol.

Tomando en cuenta los resultados y debido al análisis de los mismos, se observó que dicho efecto en el rendimiento en los metabolitos puede estar ligado a la aireación que se presenta por los orificios presentes en el mini-bioreactor Corning puesto que la liberación de CO₂ se mantiene en manera creciente conforme el tiempo avanza lo que puede estar proporcionando una transferencia mayor de oxígeno y propiciando un sistema aerobio mas que anaerobio, lo cual repercute en el proceso fermentativo por lo cual se realizó un análisis a un punto (144 h) bajo mas mismas condiciones, pero solo manejando un orificio del mini-bioreactor Corning y asegurar un sistema en condiciones fermentativas.

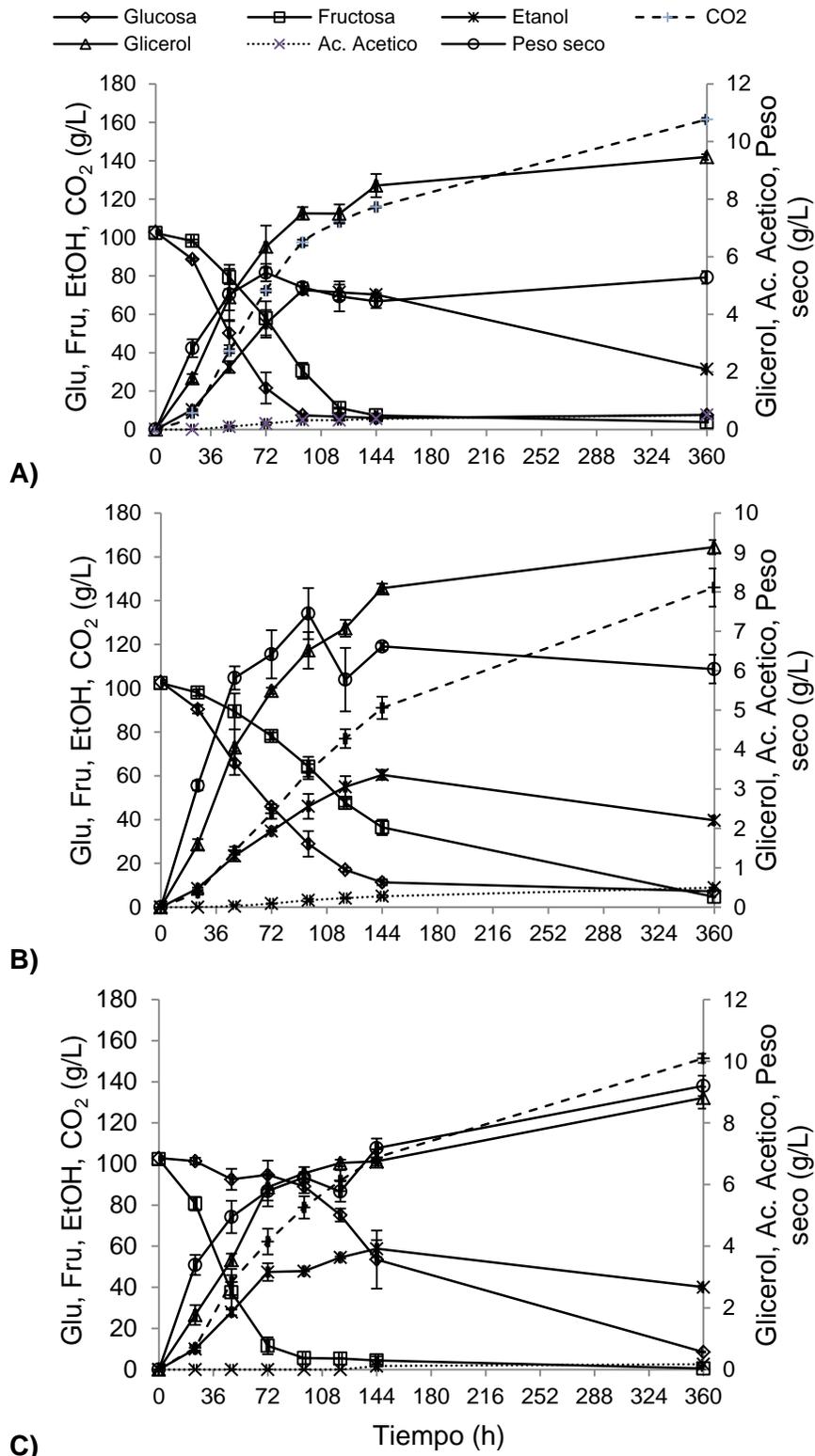


Figura 36. Cinética de la fermentación en jugo de uva roja en mini biorreactores de 50 mL de 3 cepas de *Saccharomyces*: A) Km1Y9, B) Td1AN9 y C) Zb3Y1.

En el consumo de azúcares presentes en el medio (Cuadro 14) se observaron comportamientos similares, no obstante la cepa Fermichamp mostró una mayor velocidad en el consumo de ambos azúcares presentando una menor residualidad alrededor, mientras que el resto de los aislados como Sc3Y4, Sc3Y8 y Sc3Y3 requieren más tiempo. Al momento de muestreo (144 h) las cuatro cepas mostraron un rendimiento similar así como una residualidad de entre 35 g de azúcares totales mostrando comportamientos similares a los observados en el análisis realizado bajo las mismas condiciones en el sistema con los cuatro orificios del mini-bioreactor Corning hasta dentro de las primeras 144 h, tomando en cuenta la cantidad de azúcares iniciales en los medios.

En cuanto a los parámetros cinéticos, Fermichamp fue la que mayor cantidad de biomasa produjo, seguida por la Sc3Y8. Sin embargo, al final de la fermentación la biomasa fue similar para los 3 aislados de *S. cerevisiae* del mezcal mostrando valores de entre 6 y 6.5 g, mientras que la Fermichamp mantuvo valores mayores a los de estas cepas alcanzando un valor de 9 g. En cuanto a etanol, las 4 cepas mostraron un mejor rendimiento (cuadro 15) que el observado en el sistema con cuatro orificios.

Fermichamp en conjunto con la Sc3Y4 y Sc3Y8 muestran ser las de mayor cantidad de etanol producido, alcanzando valores alrededor de los 113 g/L, seguidas de la Km1Y9 y Sc3Y3 con valores cercanos a los 100 g/L. En cuanto a la producción de ácido acético fue Fermichamp y Zb3Y1 las que mostraron una menor cantidad de dicho compuesto, seguidas por la Td1AN9 y finalmente la Sc3Y3, Sc3Y4 y Sc3Y8 que fueron las que mayor concentración alcanzaron mostrando valores de 0.7 g/L. En cuanto al glicerol los valores observados fueron similares en la mayoría de las cepas con valores cercanos a 10 g/L y solo la cepa Zb3Y1 mostró la menor cantidad de glicerol alcanzando valores de 7.8 g/L.

Cuadro 14. Consumo de azúcares y producción de metabolitos primarios de todas las cepas a las 144 h de fermentación en jugo de uva roja, 248 g/L de azúcares iniciales (G/F=1:1).

Cepa	Glucosa	Fructosa	Etanol	CO ₂	Glicerol	Ac. Acético	Peso seco
Fcham	8.90 ± 0.30	10.5 ± 2.26	113.9 ± 1.83	94.0 ± 1.26	9.11 ± 0.17	0.2 ± 0.04	9.0 ± 0.34
Sc3Y3	13.0 ± 1.70	24.0 ± 4.55	101.6 ± 5.46	79.6 ± 3.39	10.2 ± 1.08	0.7 ± 0.20	6.2 ± 0.71
Sc3Y4	13.9 ± 1.19	27.4 ± 2.25	113.0 ± 12.2	85.2 ± 3.39	10.0 ± 0.89	0.8 ± 0.06	6.0 ± 0.17
Sc3Y8	12.5 ± 0.47	23.6 ± 0.74	113.2 ± 9.63	85.3 ± 2.00	10.0 ± 0.80	0.8 ± 0.07	6.9 ± 0.42
Td1AN9	20.6 ± 1.93	42.0 ± 3.54	84.41 ± 2.41	66.3 ± 3.05	8.65 ± 0.35	0.5 ± 0.01	4.7 ± 0.15
Km1Y9	9.12 ± 0.42	10.5 ± 5.16	105.5 ± 2.25	89.2 ± 3.56	9.91 ± 0.01	0.7 ± 0.01	3.6 ± 0.31
Zb3Y1	63.3 ± 5.71	2.85 ± 0.05	92.16 ± 4.06	72.2 ± 1.28	7.80 ± 0.50	0.3 ± 0.03	6.3 ± 0.32

Cuadro 15. Rendimientos de las diferentes cepas analizadas a las 144 h de fermentación en jugo de uva roja, 248 g/L de azúcares iniciales (G/F=1:1).

Cepa	Y _{EtOH/s}	Y _{gly/s}	Y _{x/s}
Fcham	0.50	0.04	0.04
Sc3Y3	0.44	0.04	0.03
Sc3Y4	0.55	0.05	0.03
Sc3Y8	0.54	0.05	0.03
Td1AN9	0.42	0.04	0.02
Km1Y9	0.43	0.04	0.01
Zb3Y1	0.46	0.04	0.03

De manera conjunta se realizó un análisis de varianza para corroborar de manera estadística la gran variedad en los perfiles fermentativos de cada una de las diversas levaduras analizadas, observando diversos grupos de consumo o residualidades de azúcares. Claramente se aprecian aquellas con alta capacidad fermentativa en la asimilación de los azúcares en el medio o aquellas mayormente productoras de metabolitos primarios, como puede observarse en las tablas siguientes.

El test de Tukey (apéndice 2) nos mostro que las diferencias significativas existieron en la mayoría de las cepas y especies evaluadas en los diferentes consumos y producciones de metabolitos primarios, en los que se puede apreciar cepas como especies de alta, media y baja producción o consumo, según sea el caso en evaluación.

En general las cepas de la especie *Saccharomyces* presentaron un crecimiento exponencial durante las primeras horas de fermentación, manteniendo un porcentaje de viabilidad celular arriba del 90% durante las primeras 72 h de fermentación en jugo de uva, debido a que es a partir de este punto cuando se observa un decaimiento en la viabilidad de cada una de las cepas a excepción de la cepa control Fermichamp la cual parece no verse afectada durante el proceso puesto que mantiene una viabilidad arriba del 90% aun después de las 144 h de fermentación.

En el caso de las cepas no-*Saccharomyces* presentaron un patrón de crecimiento exponencial similar a las cepas *Saccharomyces* observando también una pérdida de viabilidad después de las 72 h, no obstante la cepa Zb3Y1 mostró una alta resistencia a las condiciones del proceso fermentativo puesto que al igual que la Fermichamp no se ve afectada en su viabilidad hasta después de las 120 h. Tomando en cuenta las condiciones de viabilidad celular que resultaron similares en el jugo de uva y tomando en cuenta la importancia que esto presenta en el proceso fermentativo se decidió trabajar las pruebas de mezcla de las diferentes cepas a evaluar.

VII.8.4 Caracterización de las mezclas de levaduras en jugo de uva

Las mezclas evaluadas mostraron un buen perfil fermentativo, observado un consumo general del 80% de los azúcares alrededor de las 144 h para las mezclas con las cepas de la especie *S. cerevisiae* aisladas del mezcal, a excepción de la cepa control (Fermichamp) la cual presenta un consumo del 95% de los azúcares presentes.

En general, las diferentes mezclas de las cepas aisladas de mezcal mostraron una similaridad en cuanto a la residualidad, tanto de fructosa como de glucosa, presentes en el medio. Mientras que la Fermichamp presentó un mejor perfil fermentativo en cada una de las mezclas con las cepas No-*S. cerevisiae* puesto que se observó la menor residualidad en los azúcares presentes en el medio al final de la fermentación (Cuadro 16).

Cabe mencionar que también se observó un incremento en la concentración de etanol en comparación con la producción obtenida en la evaluación individual de cada cepa. Mientras que en la producción o liberación de CO₂ se observó una reducción considerable. No obstante, dichos cambios, no se pueden atribuir directamente a la mezcla puesto que se trabajó con un hoyo como válvula de escape en lugar de los 4 disponibles por el mini-bioreactor para originar un sistema más anaerobio y permitir una tendencia de producción de metabolitos más que de crecimiento o biomasa. Sin embargo, se observó una mayor producción de biomasa en la cepa control con sus mezclas alcanzando valores alrededor de los 8.5 g/L, mientras que en las otras mezclas con las *S. cerevisiae* aisladas del mezcal presentaron valores alrededor de entre 5 y 6.5 g/L.

En el caso de la viabilidad presentada por las cepas en las mezclas realizadas, se observó un aproximado del 50% al término de la fermentación, no obstante se pudo apreciar el predominio de las cepas *S. cerevisiae* sobre las no-*S. cerevisiae* a pesar de la diferencia en el inóculo empleado al inicio del proceso fermentativo, puesto que al evaluar el crecimiento en placa fueron las de mayor número e incluso en algunos casos las únicas que mostraron crecimiento aun en diluciones muy bajas, constatando la baja o nula presencia de las cepas no-*S. cerevisiae* al término de la fermentación.

Con base en los resultados obtenidos en dichas fermentaciones se seleccionaron aquellas mezclas con mejor perfil fermentativo, así como las de la cepa control, para poder evaluar la cinética del proceso fermentativo de cada mezcla y evaluar la interacción entre las especies o cepas evaluadas. Sin embargo, se optó por tomar en cuenta además del perfil fermentativo las características buscadas para la elaboración del vino, dentro de las cuales una alta producción de ácido acético resulta indeseable por lo que se optó por eliminar aquellas mezclas con una alta producción de dicho metabolito.

De acuerdo a las características observadas en las diferentes mezclas analizadas se analizó a manera de cinética la mezcla de las cepas *S. cerevisiae* Sc3Y4, Sc3Y8 y Fermichamp con la cepa *T. delbrueckii* 1AN9 bajo las mismas condiciones a las ya analizadas para observar la interacción que pudiera resultar entre las cepas durante el proceso fermentativo.

Cuadro 16. Consumo de azúcares y producción de metabolitos primarios de todas las mezclas a las 144 h de fermentación en jugo de uva roja, 200 g/L de azúcares iniciales (G/F=1:1).

Sacc-noSacc	Glucosa	Fructosa	Etanol	CO ₂	Glicerol	Ac. acético	Peso seco
	g/l						
Fcham-Td1AN9	3.4 ± 2.61	7.5 ± 2.70	82.2 ± 1.14	92.9 ± 1.62	7.9 ± 0.34	0.3 ± 0.06	8.6 ± 0.40
Fcham-Km1Y9	3.5 ± 2.74	6.8 ± 1.76	84.5 ± 2.29	94.5 ± 3.92	8.1 ± 0.24	0.4 ± 0.09	8.4 ± 0.31
Fcham-Zb3Y1	3.8 ± 3.03	7.8 ± 4.10	82.1 ± 0.97	91.8 ± 2.96	4.8 ± 1.05	1.2 ± 0.49	8.3 ± 0.64
Sc3Y3-Td1AN9	9.2 ± 1.65	24.9 ± 4.66	75.7 ± 1.74	86.4 ± 2.45	8.4 ± 0.35	1.2 ± 0.21	5.9 ± 0.17
Sc3Y3-Km1Y9	11.4 ± 3.40	31.9 ± 7.08	73.4 ± 6.47	77.1 ± 1.99	7.6 ± 1.06	1.2 ± 0.44	5.4 ± 0.19
Sc3Y3-Zb3Y1	14.4 ± 5.98	17.9 ± 6.14	79.1 ± 3.93	84.4 ± 5.92	6.3 ± 1.98	1.2 ± 0.56	6.5 ± 0.62
Sc3Y4-Td1AN9	11.3 ± 2.28	30.0 ± 4.63	73.3 ± 1.70	78.9 ± 3.82	7.5 ± 0.12	0.5 ± 0.15	5.6 ± 0.32
Sc3Y4-Km1Y9	9.2 ± 3.50	25.0 ± 8.92	76.4 ± 3.85	81.3 ± 4.06	7.1 ± 0.37	0.8 ± 0.34	5.1 ± 0.32
Sc3Y4-Zb3Y1	20.8 ± 4.97	23.6 ± 5.14	71.8 ± 4.02	78.4 ± 5.81	5.0 ± 1.20	1.3 ± 0.81	5.2 ± 0.28
Sc3Y8-Td1AN9	15.4 ± 8.20	35.8 ± 14.30	70.0 ± 7.76	76.4 ± 11.14	7.8 ± 0.28	0.9 ± 0.36	5.6 ± 0.30
Sc3Y8-Km1Y9	9.8 ± 2.27	27.7 ± 6.08	75.9 ± 1.03	80.9 ± 5.63	7.4 ± 0.35	1.0 ± 0.31	5.5 ± 0.37
Sc3Y8-Zb3Y1	17.3 ± 5.23	23.0 ± 4.84	81.6 ± 6.96	79.6 ± 5.45	7.4 ± 1.00	0.7 ± 0.42	6.2 ± 0.57

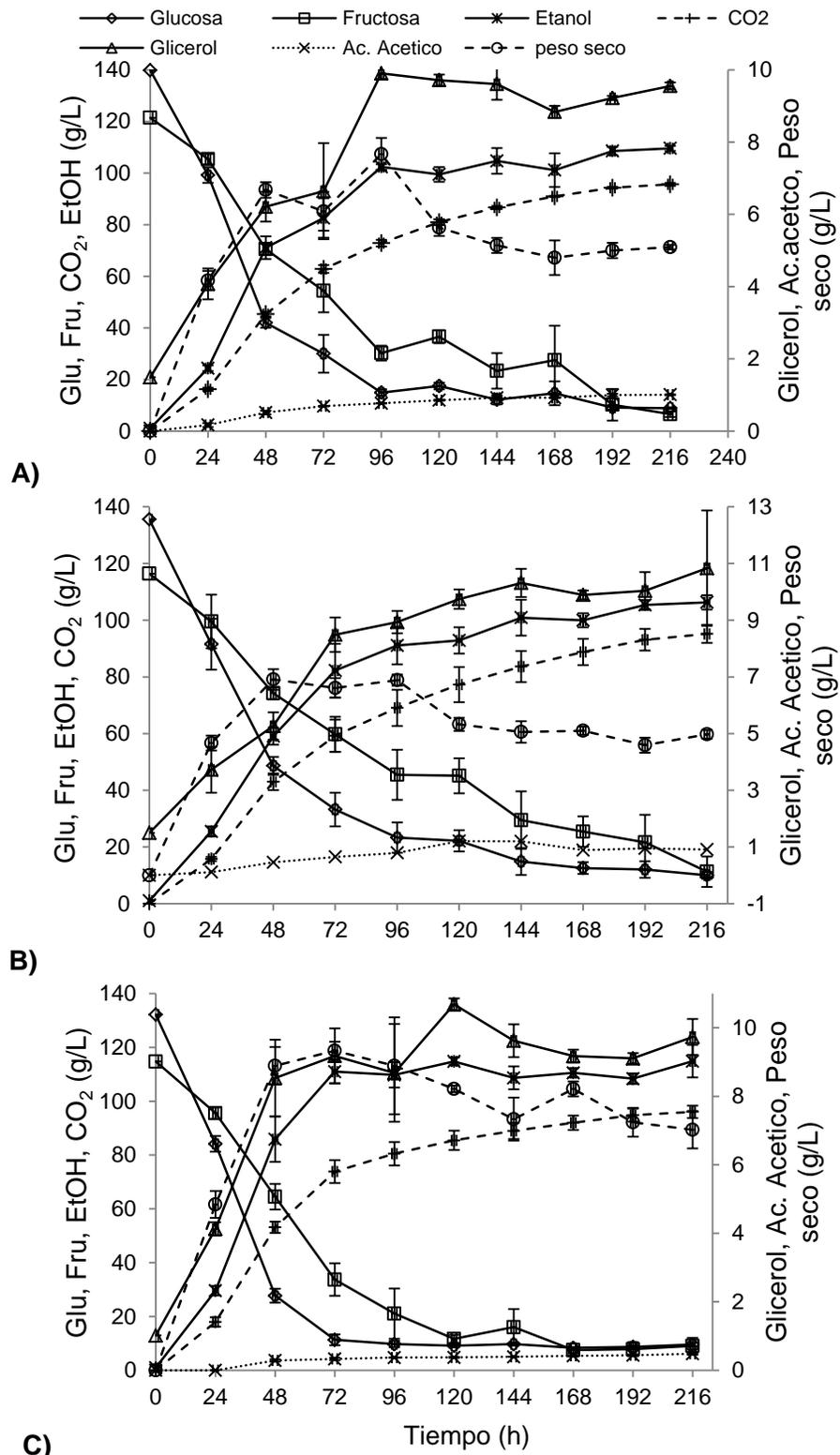


Figura 37. Cinética de la fermentación en jugo de uva roja en mini biorreactores de 50 mL de las 3 mezclas: A) Sc3Y4-Td1AN9, B) Sc3Y8-Td1AN9 y C) Fermichamp-Td1AN9.

Las mezclas evaluadas mostraron un perfil fermentativo más lento, como era de esperarse, en comparación con los datos de las cepas de manera individual. Observado un consumo general del 80% de los azúcares alrededor de las 144 h para las mezclas con las cepas de la especie *S. cerevisiae* aisladas del mezcal, a excepción de la cepa control (Fermichamp) la cual presenta un consumo del 95% de los azúcares presentes.

En general, las diferentes mezclas de las cepas aisladas de mezcal mostraron una similaridad en cuanto a la residualidad, tanto de fructosa como de glucosa, presentes en el medio. Mientras que la Fermichamp presentó un mejor perfil fermentativo en la mezcla con la cepa *No-Saccharomyces* puesto que se observó la menor residualidad en los azúcares presentes en el medio al final de la fermentación (Figura 37).

Todas las fermentaciones en mezcla presentaron una similaridad en la concentración de etanol (9.8-11%) al igual que las individuales, a excepción de la cepa *T. delbrueckii* la cual presenta valores más bajos (8.5%). Por otra parte en la producción o liberación de CO₂ en comparación con la producción obtenida en la evaluación individual de cada cepa los valores resultaron muy similares (90 g/L). Sin embargo, al tomar en cuenta otros aspectos de importancia en el proceso fermentativo, las diferencias puntuales resultaron darse en la concentración de glicerol y ácido acético al observar un ligero incremento en dichos metabolitos cuando el proceso fermentativo es llevado a cabo por las mezclas que cuando se da de manera individual de cada levadura.

De manera conjunta se realizó un análisis de varianza para corroborar de manera estadística la gran variedad en los perfiles fermentativos de cada una de las diversas levaduras analizadas, observando diversos grupos de consumo o residualidades de azúcares. Claramente se aprecian aquellas con alta capacidad fermentativa en la asimilación de los azúcares en el medio o aquellas mayormente productoras de metabolitos primarios, como puede observarse en las tablas siguientes.

El test de Tukey (apéndice 2) nos mostró las diferencias significativas que existen en las diversas mezclas evaluadas en los diferentes consumos y producciones de metabolitos primarios, en los que se puede apreciar mezclas de alta, media y baja producción o consumo, según sea el caso en evaluación, permitiendo con ello una selección de aquellas mezclas con características tecnológicamente deseables.

La población total de levaduras analizadas de manera individual y en mezcla presentó un crecimiento similar cercano a 10⁸ cel/mL, dicho crecimiento de la población es alcanzado durante las primeras 24 – 48 h. Sin embargo, se observó que la sobrevivencia de la cepa *T. delbrueckii* no sobrepasa a las 24 – 48 h la cual a este tiempo se ve superada por la presencia y el crecimiento de la cepa *S. cerevisiae* la cual termina por gobernar el sistema fermentativo hasta el final de la fermentación.

La comparación entre las cuentas obtenidas de ambos medios (WLN medio no selectivo y WLD medio diferencial) muestra claramente que al inicio del proceso fermentativo la mayoría de la población total pertenece a la cepa no-*Saccharomyces*, pero que conforme avanza el tiempo en el proceso es *S. cerevisiae* quien domina y se mantiene hasta el fin de la fermentación.

En producción de biomasa es la cepa control en mezcla la que muestra una mayor producción, alcanzando valores alrededor de los 8.7 g/L, mientras que en las otras mezclas con las *S. cerevisiae* aisladas del mezcal presentaron valores alrededor de entre 5 y 6.5 g/L.

En el caso de la viabilidad presentada por las cepas en las mezclas realizadas, se observó un aproximado del 50% al término de la fermentación, no obstante se pudo apreciar el predominio de las cepas *S. cerevisiae* sobre las No-*S. cerevisiae* a pesar de la diferencia en el inóculo empleado al inicio del proceso fermentativo, puesto que al evaluar el crecimiento en placa fueron las de mayor número e incluso en algunos casos las únicas que mostraron crecimiento aun en diluciones muy bajas, constatando la baja o nula presencia de las cepas no-*Saccharomyces* al término de la fermentación (Figura 38).

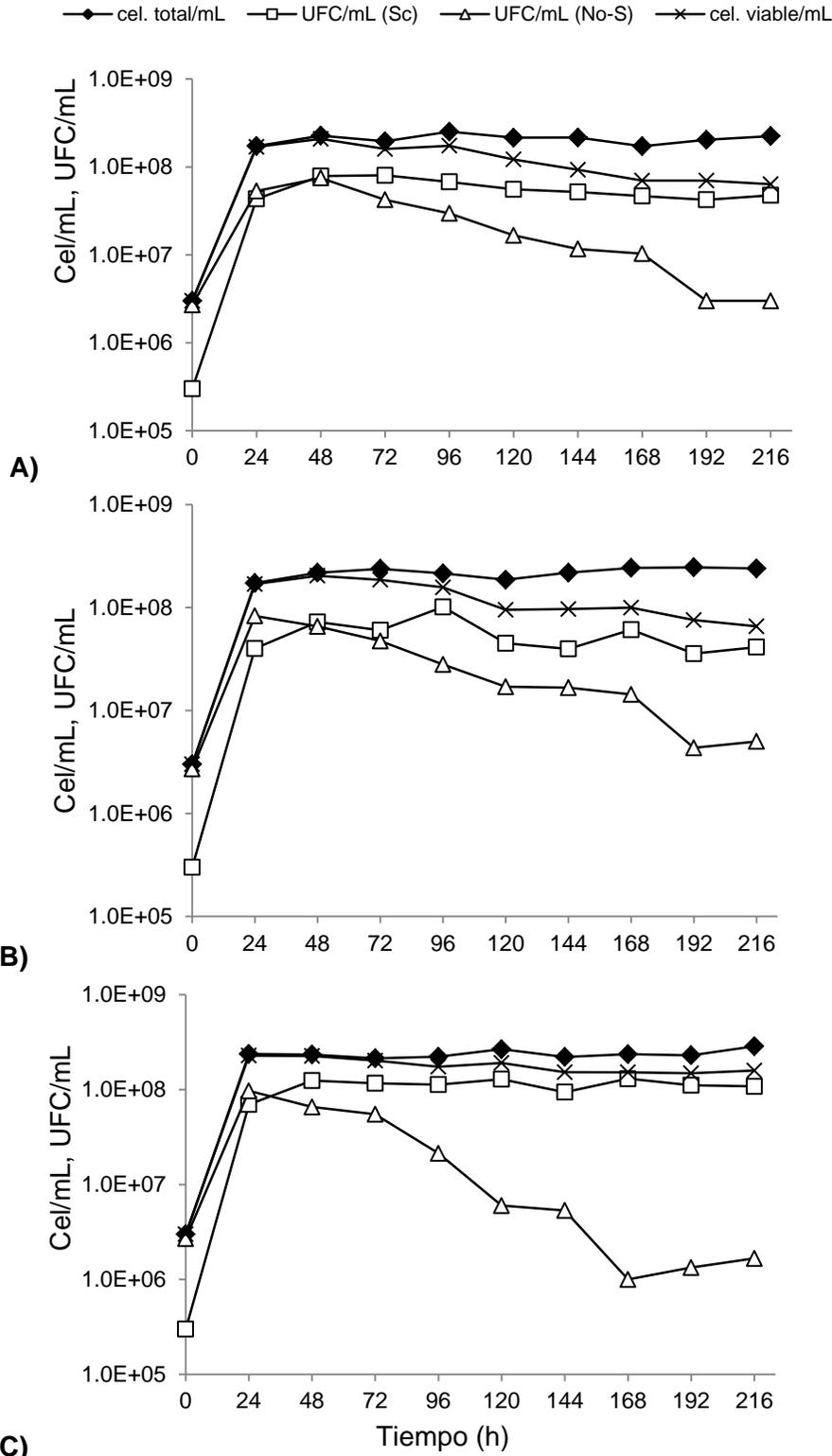


Figura 38. Viabilidad de la cinética de la fermentación en jugo de uva roja en mini biorreactores de 50 mL de las 3 mezclas: A) Sc3Y4-Td1AN9, B) Sc3Y8-Td1AN9 y C) Fermichamp-Td1AN9.

Tomando en cuenta la importancia de los aromas y sabores de la bebida dados mayormente por el proceso metabólico de las levaduras que participan en el proceso fermentativo, evaluamos y observamos que la viabilidad de cada una de las cepas de forma individual resultan mayores en comparación con la obtenida cuando se utilizan en mezcla. Se observó una viabilidad del 50% en las mezclas al término de la fermentación.

VII.8.5 Caracterización de los compuestos volátiles en jugo de uva

Las características de una bebida suelen estar ligadas a la composición del producto así como los compuestos volátiles que suelen producir una sensación de aroma y sabor.

Las muestras de las diferentes fermentaciones de cada una de las cepas aquí utilizadas fueron analizadas por triplicado obteniendo un error experimental promedio de cada uno de los resultados para cada cepa. En el cuadro 17 se presentan los compuestos identificados en las fermentaciones individuales de las cepas analizadas. En la primera columna se presenta el género de las diferentes cepas evaluadas. En las columnas consecutivas se muestra la cantidad promedio de cada compuesto y su desviación estándar.

En este trabajo inicialmente se evaluó la producción de compuestos volátiles para la cepa control (fermichamp) y la Sc3Y4. No obstante, para la evaluación de las muestras en jugo de uva se centralizó en aquellos compuestos de interés en vino. En el cuadro se destacan los compuestos de ésteres encontrados puesto que su presencia en bebidas alcohólicas contribuye fuertemente a la generación de olores dulces, florales y afrutados. Los componentes más abundantes fueron el butirato de etilo para el caso de algunas cepas de *Saccharomyces* y el fenil etil acetato para las no-*Saccharomyces*. Es posible atribuir que la variedad de ésteres identificados sean producto del metabolismo de las levaduras, puesto que la cantidad o concentración de cada compuesto varío dependiendo de la cepa empleada, destacando que la única diferencia entre procesos fermentativos fue la cepa utilizada.

Cuadro 17. Perfil de compuestos volátiles de las cepas seleccionadas a las 144 h de fermentación en jugo de uva roja.

Cepa	Alcoholes (mg/L)			Esters (µg/L)			
	Alcohol isomilico	Acetato de isoamilo	Hexanoato de etilo	Fenil etil acetato	Butirato de etilo	Decanoato de etilo	Octanoato de etilo
Sc Fermichamp	174 ± 4.95	111 ± 9.19	40 ± 2.12	133 ± 14.14	ND	133 ± 2.12	61 ± 4.94
Sc3Y3	77 ± 4.51	D	38 ± 3.51	70 ± 16.52	ND	140 ± 5.29	64 ± 4.16
Sc3Y4	78 ± 0.58	D	33 ± 2.31	63 ± 5.69	ND	103 ± 9.29	63 ± 2.08
Sc3Y8	82 ± 4.0	D	45 ± 10.4	82 ± 20.52	ND	115 ± 27.47	63 ± 2.65
Km1Y9	131 ± 6.0	30 ± 11.2	D	5069 ± 291.16	ND	39 ± 3.61	38 ± 1
Td1AN9	143 ± 90	45 ± 14.2	16 ± 1.53	3349 ± 166.78	ND	32 ± 0.58	D
Zb3Y1	213 ± 200	D	15	139 ± 9.07	ND	32 ± 2.08	34 ± 0

De manera general independientemente de las diversas rutas de formación de esteres como lo son la reacción de acetil-CoA con alcoholes y por manera enzimática de las levaduras, en ambos medios probados en esta investigación, los esteres encontrados presentaron diferencias significativas en tipo y cantidad de los mismos. Encontrando en mayor composición el acetato de isamilo, octanoato de etilo así como el fenil etil acetato, compuestos de importancia por sus características favorables en bebidas como el vino.

Por otra parte, el resultado del Analisis de Componentes Principales (ACP) de los diversos compuestos volátiles producto de las levaduras no-*saccharomyces* presente en la figura 44 dio como resultado una varianza total igual a 5 provocado por la estandarización de las variables. Donde los diferentes puntos de varianza original del primer componente explican 1.98 que prácticamente representa el 50% de la varianza original. El segundo componente explica 1.05 (26%) de la varianza original. Los otros componentes explican porcentajes significativamente más bajos en comparación con los dos primeros. Teniendo así, que los dos primeros ejes explican el 76% de la variabilidad acumulada; el primero de ellos estuvo estrechamente relacionado con las elevadas concentraciones de octanoato de etilo y acetato de isoamilo.

Las elevadas concentraciones de estos compuestos incrementan la atención en las cepas analizadas por los aromas o sabores que dichos compuestos producen en la bebida. En general observamos que la mayoría de las cepas se agrupan en el cuadrante inferior de la figura 39. El segundo eje de variación corresponde al fenil etil acetato, que es caracterizado por los aromas florales en bebidas, observado normalmente en cepas no-*Saccharomyces*.

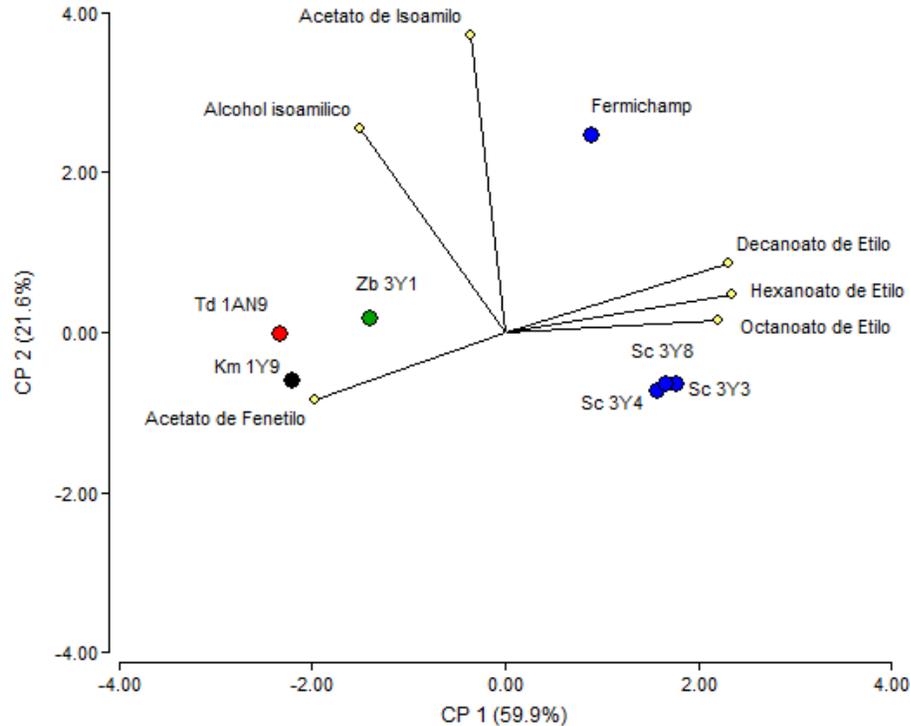


Figura 39. Analisis de los componentes principales (ACP) de la fermentación en jugo de uva roja en minibiorreactores de 50 mL de las distintas cepas de analizadas de manera individual. Los colores representan las diferentes especies analizadas.

En jugo de uva encontramos que de los diferentes puntos de varianza original el primer componente explica el 60% de la varianza original. El segundo componente explica 22% de la varianza original (fig. 39). Los otros componentes explican porcentajes significativamente más bajos en comparación con los dos primeros. Observando la relación estrechamente ligada del primer componente con las diversas concentraciones de hexanoato, octanoato y decanoato de etilo. Teniendo entonces que el ACP de los diversos compuestos volátiles producto de las levaduras de las diferentes especies presenta en conjunto con los dos primeros componentes una explicación del 82% de la variabilidad acumulada.

Cuadro 18. Perfil de compuestos volátiles de las mezclas a las 144 h de fermentación en jugo de uva roja.

Cepas	Alcoholes (mg/L)			Esteres (µg/L)			
	Alcohol Isoamilico	Acetato de Isoamilo	Hexanoato de etilo	Fenil etil acetato	Butirato de etilo	Decanoato de etilo	Octanoato de etilo
Fecha-1Y9	153 ± 10.79	239 ± 7.64	19 ± 5.29	948 ± 83.65	ND	51 ± 10.15	D
Fecha-1AN9	174 ± 47.12	188 ± 8.02	23 ± 6.51	719 ± 100.54	ND	49 ± 14.36	D
Fecha-3Y1	102 ± 15.82	94 ± 19.30	21 ± 8.19	82 ± 5.29	ND	43 ± 5.03	D
3Y3-1Y9	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
3Y3-1AN9	93 ± 3.79	D	3 ± 0	811 ± 761.28	ND	116 ± 18.38	ND
3Y3-3Y1	46 ± 7.55	17 ± 2.12	11 ± 8.48	72 ± 10.58	ND	27 ± 2.08	D
3Y4-1Y9	88 ± 4.36	D	12 ± 2.52	1246 ± 74.67	ND	115 ± 24.54	63 ± 17.67
3Y4-1AN9	84 ± 6.24	D	9 ± 5.65	610 ± 9.19	ND	122 ± 24.74	ND
3Y4-3Y1	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
3Y8-1Y9	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
3Y8-1AN9	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
3Y8-3Y1	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP

ND, no detectado; NP, no procesado

Cuadro 19. Perfil de compuestos volátiles de las mezclas de levaduras a las 144 h de fermentación en jugo de uva roja.

Cepas	Alcoholes (mg/L)		Esters (µg/L)				
	Alcohol Isoamilico	Acetato de isoamilo	Hexanoato de etilo	Fenil etil acetato	Butirato de etilo	Decanoato de etilo	Octanoato de etilo
Fecha-1AN9	141 ± 18.77	55 ± 9.89	23 ± 3.51	543 ± 92.38	ND	105 ± 16.52	41 ± 8.32
3Y4-1AN9	93 ± 3.21	D	33 ± 7	475 ± 34.85	ND	84 ± 11.53	37 ± 8.50
3Y8-1AN9	85 ± 9.07	D	26 ± 2.31	544 ± 8	ND	102 ± 16.52	33 ± 4

En el caso de las mezclas empleadas para el proceso de fermentación, la evaluación de las muestras analizadas en en jugo de uva se centró en aquellos compuestos de interés en vino, debido a la similaridad del medio empleado en las fermentaciones realizadas. En el cuadro 18 se destacan los compuestos de ésteres encontrados puesto que su presencia en bebidas alcohólicas contribuye fuertemente a la generación de olores dulces, florales y afrutados. Los componentes más abundantes fueron el acetato de isoamilo así como el fenil etil acetato para las mezclas aquí analizadas.

Otro compuesto que atrajo atención, fueron las concentraciones de alcohol isoamílico (cuadro 18 y cuadro 19), el cual se ha reportado en la literatura como uno de los que constituyen como compuestos descriptores de aromas manejando notas aromáticas florales o frutales.

Los resultados mostraron que las fermentaciones individuales resultan con una mayor producción de compuestos volátiles en comparación con las mezclas, en las cuales se presentan valores menores de compuestos volátiles.

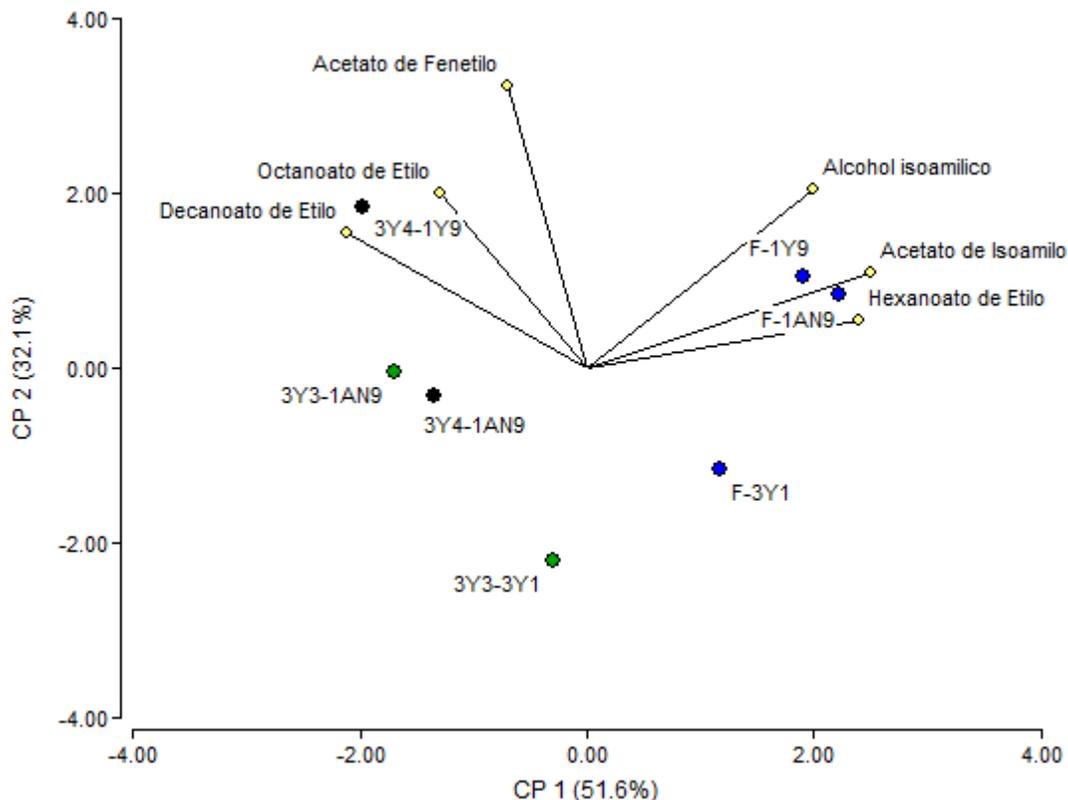


Figura 40. Análisis de los componentes principales (ACP) de la fermentación en jugo de uva rojo en minibioreactores de 50 mL de las distintas mezclas de cepas de analizadas.

El resultado del Análisis de Componentes Principales (ACP) de los diversos compuestos volátiles producto de las mezclas de levaduras se presenta en la figura 40. Los dos primeros ejes explicaron el

83.7% de la variabilidad acumulada; el primero de ellos estuvo estrechamente relacionado con las elevadas concentraciones de acetato de isoamilo y hexanoato de etilo.

VII.9 Caracterización de las levaduras en medio sintético de mosto (M2) y en mosto de Agave tequilana

Se evaluaron las mismas características evaluadas en el medio sintético tipo uva (M3), haciendo uso de las la cepa control (Fermichamp), Sc3Y4 y Sc3Y8 para evaluación del crecimiento y consumo de azúcares.

Las cepas inicialmente evaluadas mostraron un carácter típico glucofilico puesto que es este azúcar el primero en mostrar un mayor consumo en comparación con el de la fructosa. En general mas del 90% de los azúcares es consumido a las 48 h por las tres cepas evaluadas (Fig. 41).

En general, la cepa Sc3Y4 mostró un mejor perfil fermentativo que la Sc3Y8, después de nuestra cepa control la Fermichamp, puesto que fue la que menor residualidad presento en los azúcares presentes en el medio al final de la fermentación. En cuanto a la producción de otros metabolitos las cepas mostraron comportamiento similar entre ellas. Tomando en cuenta los resultados de residualidad de azúcares presentes en el medio, liberación de CO₂ y el peso seco observado se tomo como punto final de fermentación las 48 h para comparación de las 25 cepas diferentes, obteniendo los resultados mostrados en el cuadro 20.

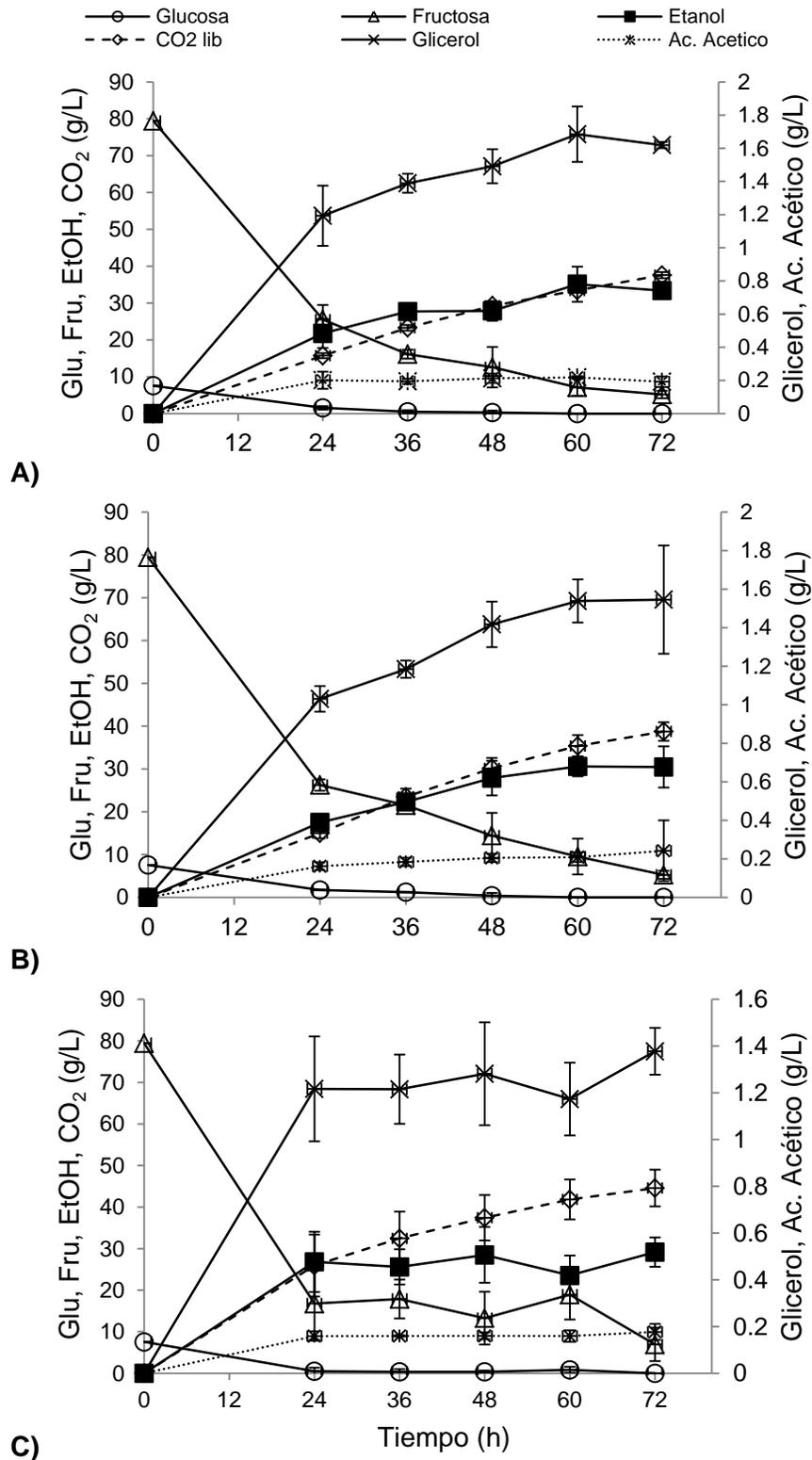


Figura 41. Cinética de la fermentación en mosto de Agave sintético (medio M2) en minibioreactores de 50 mL de 3 cepas de *Saccharomyces*: A) Sc3Y4, B) Sc3Y8 y C) Fermichamp.

Cuadro 20. Consumo de azúcares y producción de metabolitos primarios de todas las cepas a las 48 h de fermentación en medio M2, 100 g/L de azúcares iniciales (G/F=1:9).

Cepa	Glucosa	Fructosa	Etanol	CO ₂	Glicerol	Ac. Acetico	Peso seco
	g/l						
<i>S. cerevisiae</i>							
3D4	0.0 ± 0.0	11.9 ± 4.50	29.4 ± 5.10	57.7 ± 4.19	1.80 ± 0.26	0.4 ± 0.18	3.8 ± 0.20
3D5	0.0 ± 0.0	16.9 ± 1.26	25.1 ± 0.60	52.2 ± 2.15	1.52 ± 0.17	0.2 ± 0.17	3.8 ± 0.13
3Y2	1.4 ± 0.0	23.7 ± 1.41	23.4 ± 1.49	52.2 ± 7.91	0.99 ± 0.03	0.2 ± 0.10	3.2 ± 0.34
3D6	0.0 ± 0.0	15.4 ± 2.36	25.6 ± 1.52	50.7 ± 2.12	1.57 ± 0.15	0.3 ± 0.10	4.4 ± 0.13
Mosca3	0.0 ± 0.0	9.90 ± 4.80	29.5 ± 3.62	56.7 ± 6.79	1.58 ± 0.24	0.1 ± 0.11	4.4 ± 0.24
4Y3	0.0 ± 0.0	12.8 ± 0.92	25.2 ± 1.21	55.7 ± 1.10	1.43 ± 0.05	0.2 ± 0.10	4.2 ± 0.25
3D2	0.5 ± 0.4	12.8 ± 6.48	26.8 ± 6.18	50.4 ± 7.80	1.46 ± 0.31	0.3 ± 0.12	3.2 ± 0.64
3Y3	0.0 ± 0.0	14.8 ± 0.78	27.7 ± 1.15	49.9 ± 0.50	1.67 ± 0.03	0.4 ± 0.08	3.3 ± 0.04
3Y5	0.6 ± 0.0	15.9 ± 0.09	27.4 ± 0.35	48.6 ± 1.03	1.63 ± 0.04	0.3 ± 0.01	2.8 ± 0.10
3Y4	0.0 ± 0.0	12.4 ± 0.86	26.3 ± 2.20	53.7 ± 0.50	1.46 ± 0.02	0.2 ± 0.01	3.2 ± 0.17
3Y8	0.0 ± 0.0	10.8 ± 0.40	29.7 ± 1.70	60.2 ± 2.21	1.48 ± 0.13	0.3 ± 0.12	3.0 ± 0.25
Fermichamp	0.2 ± 0.5	10.8 ± 8.01	29.8 ± 6.01	59.3 ± 7.76	1.34 ± 0.25	0.2 ± 0.09	4.8 ± 0.52
<i>K. marxianus</i>							
4D3	0.2 ± 0.4	19.6 ± 2.50	23.7 ± 1.60	47.9 ± 0.23	1.99 ± 0.20	0.4 ± 0.02	2.8 ± 0.04
1D5	0.0 ± 0.0	7.13 ± 2.83	28.9 ± 0.96	59.1 ± 1.15	1.96 ± 0.10	0.3 ± 0.09	2.9 ± 0.23
1Y9	0.0 ± 0.0	3.43 ± 1.83	33.2 ± 2.19	57.5 ± 3.19	2.22 ± 0.10	0.3 ± 0.05	3.1 ± 0.22
<i>T. delbrueckii</i>							
1AN9	0.0 ± 0.0	8.27 ± 5.47	29.4 ± 3.66	53.6 ± 5.38	1.94 ± 0.20	0.2 ± 0.02	3.0 ± 0.31
1AN2	2.0 ± 0.3	28.6 ± 1.94	15.8 ± 1.45	40.5 ± 0.99	1.21 ± 0.09	0.1 ± 0.02	3.0 ± 0.13
1AN1	4.6 ± 0.1	44.7 ± 0.45	5.09 ± 0.19	30.4 ± 3.00	0.65 ± 0.04	0.1 ± 0.01	2.2 ± 0.13
1D1	0.0 ± 0.0	3.64 ± 4.24	33.5 ± 2.73	65.4 ± 5.35	2.23 ± 0.10	0.2 ± 0.04	3.1 ± 0.05
<i>P. kluyveri</i>							
4D6	1.6 ± 0.0	30.9 ± 0.83	14.4 ± 1.47	35.9 ± 2.35	1.13 ± 0.15	0.2 ± 0.07	2.2 ± 0.06
<i>P. mexicana</i>							
1AN3	1.9 ± 0.2	27.9 ± 1.54	17.7 ± 1.60	49.5 ± 10.7	0.59 ± 0.03	0.1 ± 0.01	2.7 ± 0.36
<i>P. guillermondii</i>							
1Y12	5.5 ± 0.2	46.4 ± 1.63	1.79 ± 0.29	23.8 ± 0.13	0.22 ± 0.02	0.1 ± 0.02	2.3 ± 0.19
<i>Z. bailli</i>							
3Y1	5.0 ± 0.4	7.11 ± 2.51	29.5 ± 2.65	53.8 ± 4.22	1.64 ± 0.10	0.1 ± 0.01	3.6 ± 0.31
<i>C. lusitaniae</i>							
4Y4	0.0 ± 0.0	7.55 ± 2.15	36.0 ± 2.90	56.6 ± 7.40	0.82 ± 0.03	0.1 ± 0.02	3.1 ± 0.26
<i>C. parasilopsis</i>							
1Y7	1.3 ± 0.1	28.0 ± 0.69	15.6 ± 1.07	41.2 ± 0.74	1.29 ± 0.03	0.2 ± 0.01	1.9 ± 0.07
<i>R. mucilaginosa</i>							
P12-R	1.0 ± 0.3	20.9 ± 3.72	21.5 ± 4.07	46.2 ± 1.91	1.55 ± 0.09	0.2 ± 0.01	2.6 ± 0.10

Los datos analizados de las diferentes fermentaciones procesadas, mostraron la gran variedad en los perfiles fermentativos de cada una de las diversas levaduras probadas, observando diversos grupos de consumo o residualidades de azúcares. Claramente se aprecian aquellas con alta capacidad fermentativa en la asimilación de los azúcares en el medio, tal es el caso de la mayoría de las cepas *S. cerevisiae* mientras que para las no-*Saccharomyces* se observó que aun bajo las mismas condiciones de fermentación no resultan buenas consumidoras de azúcares y por tanto se observa una baja producción de etanol. Sin embargo, algo que cabe resaltar es la alta capacidad de las cepas Sc1D1, Km1Y9, Sc1D5, Zb3Y1 y Cl4Y4 en consumo de fructosa, mostrando un carácter completamente fructofílico. Sin embargo, podríamos atribuir dicho carácter a las condiciones en las que fueron aisladas o al medio en el que se encontraban puesto que como se ha mencionado, los mostos de agave normalmente mantienen una mayor relación en contenidos de fructosa que de glucosa.

De manera conjunta se realizó un análisis de varianza para corroborar de manera estadística la gran variedad en los perfiles fermentativos de cada una de las diversas levaduras analizadas, observando diversos grupos de consumo o residualidades de azúcares. Claramente se aprecian aquellas con alta capacidad fermentativa en la asimilación de los azúcares en el medio o aquellas mayormente productoras de metabolitos primarios, como puede observarse en las tablas siguientes.

El test de Tukey (apéndice 3) nos mostro que las diferencias significativas existieron en la mayoría de las cepas y especies evaluadas en los diferentes consumos y producciones de metabolitos primarios, en los que se puede apreciar cepas como especies de alta, media y baja producción o consumo, según sea el caso en evaluación.

VII.9.1 Caracterización de los compuestos volátiles en medio sintético tipo agave (M2).

La calidad de una bebida alcohólica se ve sujeta a ciertos factores subjetivos tales como la aceptación del consumidor en función de las características que percibe del producto. Dichas características suelen estar ligadas a la composición del producto como lo son los componentes volátiles que suelen producir una sensación de aroma y sabor.

Las muestras de las diferentes fermentaciones de cada una de las cepas aquí utilizadas fueron analizadas por triplicado obteniendo un error experimental promedio de cada uno de los resultados para cada cepa. En el cuadro 21 se presentan los compuestos identificados en las fermentaciones individuales de las cepas analizadas. En la primera columna se presenta el género de las diferentes cepas evaluadas. En las columnas consecutivas se muestra la cantidad promedio de cada compuesto y su desviación estándar.

En este trabajo inicialmente se evaluó la producción de compuestos volátiles para la cepa testigo (Fermichamp) y la cepa Sc3Y4 para observar la variedad y cantidad de compuestos reportados en diversas bebidas alcohólicas como tequila, mezcal, sotol y vino (Lachenmaier *et al.*, 2006; Vera-Guzmán *et al.*, 2009; Molina-Guero *et al.*, 2007). Sin embargo, para la evaluación de las muestras del medio M2 y mosto de agave se centró en aquellos compuestos de interés en bebidas destiladas, debido a la similaridad del medio empleado en las fermentaciones realizadas. Se destacan los ésteres encontrados puesto que su presencia en bebidas alcohólicas contribuye fuertemente a la generación de olores dulces, florales y afrutados. Los componentes más abundantes fueron el butirato de etilo para el caso de algunas cepas de *Saccharomyces* y el fenil etil acetato para las cepas no-*Saccharomyces*. Es posible atribuir que la variedad de ésteres identificados sean producto del metabolismo de las levaduras, puesto que la cantidad o concentración de cada compuesto vario dependiendo de la cepa empleada, destacando que la única diferencia entre procesos fermentativos fue la cepa utilizada.

Otra parte importante lo constituyen los alcoholes identificados de los cuales, algunos de ellos han sido reportados en la literatura como compuestos descriptores de aromas manejando notas aromáticas florales o frutales.

Cuadro 21. Perfil de compuestos volátiles de todas las cepas a las 96 h de fermentación en medio M2, 100 g/L de azúcares iniciales (G/F=1:9).

Cepa	2-metil-1-butanol	Butirato de etilo	de Aceato de isoamilo	de Hexanoato de etilo	de Acetato de hexilo	de Octanoato de etilo	de Fenil etil acetato	Dodecanoato de etilo
<i>S. cerevisiae</i>								
μg/l								
Sc 3D4	250 ± 10	2 ± 0.1	7 ± 1	8 ± 0.5	ND	25 ± 1	35 ± 4	6 ± 2
Sc 3D5	260 ± 30	2 ± 0.2	4 ± 1	4 ± 0.5	ND	25 ± 2	33 ± 3	6 ± 1
Sc 3Y2	290 ± 0.2	2 ± 0.5	3 ± 1	0.5 ± 0.2	ND	9 ± 1	46 ± 23	ND
Sc 3D6	230 ± 30	3 ± 0.2	7 ± 1	6 ± 0.8	ND	22 ± 2	47 ± 28	4 ± 0.3
Sc Mosca3	260 ± 10	2 ± 0.1	5 ± 1	4 ± 0.8	ND	24 ± 1	36 ± 6	3 ± 1
Sc 4Y3	250 ± 40	2 ± 0.3	5 ± 1	5 ± 0.7	ND	22 ± 1	33 ± 4	4 ± 1
Sc 3D2	340 ± 40	3 ± 0.5	7 ± 2	6 ± 0.8	ND	38 ± 5	31 ± 4	21 ± 4
Sc 3Y3	400 ± 30	3 ± 0.3	14 ± 5	7 ± 0.7	ND	30 ± 4	59 ± 30	18 ± 1
Sc 3Y5	380 ± 20	3 ± 0.2	9 ± 1	9 ± 1.2	ND	24 ± 0.9	36 ± 10	4 ± 2
Sc 3Y8	290 ± 10	2 ± 0.1	4 ± 0.3	4 ± 0.5	ND	21 ± 4	24 ± 3	5 ± 0.9
Fermichamp	280 ± 50	2 ± 0.1	9 ± 4	4 ± 0.02	ND	20 ± 3	49 ± 20	7 ± 1
Sc 3Y4	290 ± 10	2 ± 0.1	5 ± 0.4	5 ± 0.5	ND	29 ± 1	33 ± 9	5 ± 2
Sc 3Y4	280 ± 30	2 ± 0.1	3 ± 2	4 ± 0.2	ND	18 ± 3	34 ± 10	3 ± 1
Sc 3Y4	360 ± 40	2 ± 0.1	5 ± 4	4 ± 0.2	ND	ND	28 ± 3	4 ± 0.5
Sc 3Y4	270 ± 20	2 ± 0.1	6 ± 1	5 ± 0.3	ND	21 ± 1	42 ± 3	4 ± 0.3
PE-2	350 ± 50	2 ± 0.1	7 ± 5	3 ± 0.04	ND	28 ± 2	85 ± 60	4 ± 2
<i>K. marxianus</i>								
Km 4D3	460 ± 20	1 ± 0.2	15 ± 0.5	1 ± 0.1	ND	2 ± 0.1	1425 ± 180	2 ± 0.4
Km 1D5	510 ± 30	1 ± 0.8	378 ± 47	0.2 ± 0.1	ND	2 ± 0.5	1412 ± 110	2 ± 0.6
Km 1Y9	400 ± 30	1 ± 0.2	12 ± 3	0.2 ± 0.03	ND	2 ± 0.1	1215 ± 150	ND
<i>T. delbrueckii</i>								
Td 1AN9	410 ± 20	1 ± 0.3	118 ± 69	0.2 ± 0.05	ND	2 ± 0.2	1291 ± 320	4 ± 0.6
Td 1AN2	260 ± 20	0.4 ± 0.1	291 ± 30	1 ± 0.04	0.3 ± 0.1	3 ± 0.4	1185 ± 120	2 ± 0.4
Td 1AN1	390 ± 20	1 ± 0.05	2 ± 0.2	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Pichia sp.</i>								
Pk 4D6	180 ± 20	ND	204 ± 20	ND	ND	1 ± 0.2	1229 ± 80	ND
Pk P12g	190 ± 10	0.4 ± 0.1	214 ± 20	0.7 ± 0.02	ND	9 ± 2	1241 ± 290	3 ± 1

Pm 1AN3	340 ± 70	2 ± 0.3	10 ± 4	0.2 ± 0.1	ND	ND	45 ± 30	1 ± 0.03
Pg 1Y12	320 ± 20	1 ± 0.1	3 ± 1	0.3 ± 0.2	ND	ND	22 ± 10	ND
<i>Z. bailii</i>								
Zb 3Y1	280 ± 20	1 ± 0.2	1 ± 1	0.1 ± 0.04	ND	1 ± 0.1	147 ± 10	2 ± 0.1
<i>Candida sp.</i>								
Cl 4Y4	310 ± 60	2 ± 0.3	9 ± 10	0.3 ± 0.2	ND	ND	33 ± 30	ND
Cp 1Y7	230 ± 20	0.3 ± 0.04	167 ± 10	0.1 ± 0.01	ND	1 ± 0.04	1345 ± 110	1 ± 0.3
<i>R. mucilaginosa</i>								
Rm P12r	300 ± 3	1 ± 0.1	8 ± 4	3 ± 0.2	ND	16 ± 1	491 ± 100	5 ± 1

De manera similar que para jugo de uva, se elaboro un análisis de componentes principales (ACP) a partir de las variables originales para las muestras analizadas en M2. Dando como resultado para el análisis de las cepas de la especie *S. cerevisiae* una varianza total igual a 5 provocado por la estandarización de las variables. De los diferentes puntos de varianza original el primer componente explica el 56% de la varianza original. El segundo componente explica 20% de la varianza original (fig. 42). Los otros componentes explican porcentajes significativamente más bajos en comparación con los dos primeros.

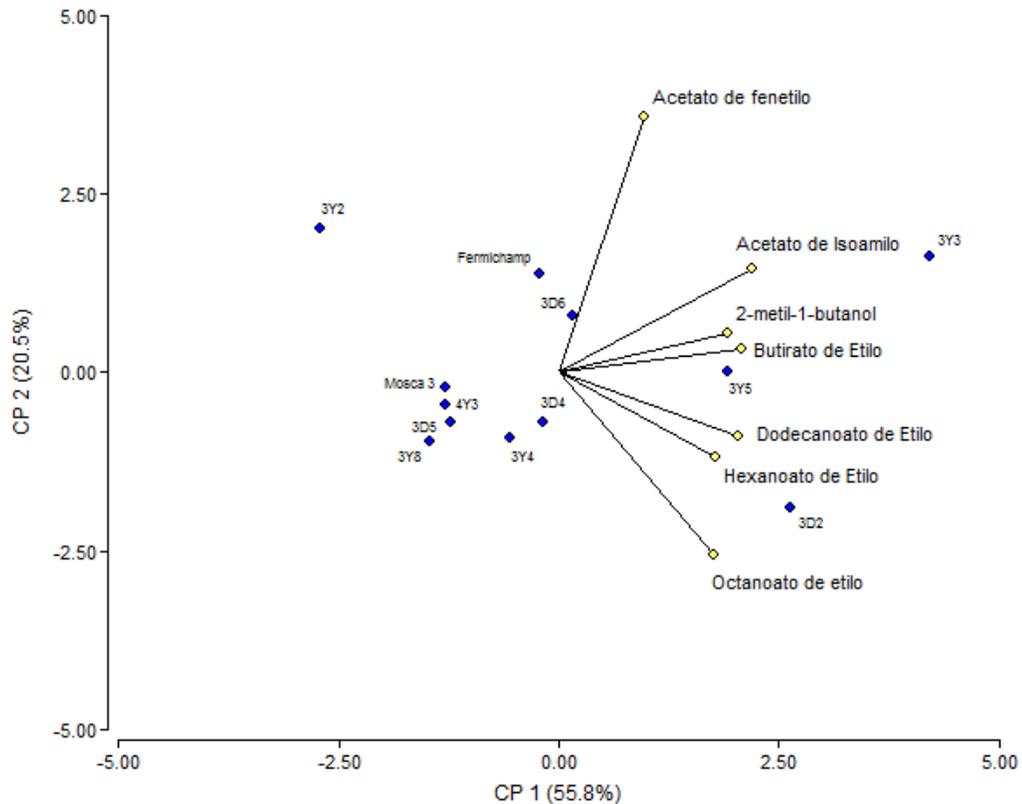


Figura 42. Analisis de los componentes principales (ACP) de la fermentación en medio M2 en mini biorreactores de 50 mL de las distintas cepas de *S. cerevisiae* analizadas.

En general observamos que la mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* se agrupan en el cuadrante izquierdo de la figura 42 algo separadas del primer eje de variación. El segundo eje de variación corresponde al fenil etil acetato, caracterizado por los aromas florales en bebidas en el cual pocas cepas fueron cercanas a este. El resto de variables explican poco de la variabilidad global del sistema.

El resultado del Analisis de Componentes Principales (ACP) de los diversos compuestos volátiles producto de las levaduras de la especie no-*Saccharomyces* se presenta en la figura 43. Los dos

primeros ejes explicaron el 62.4% de la variabilidad acumulada; el primero de ellos estuvo estrechamente relacionado con el hexanoato, octanoato y dodecanoato de etilo.

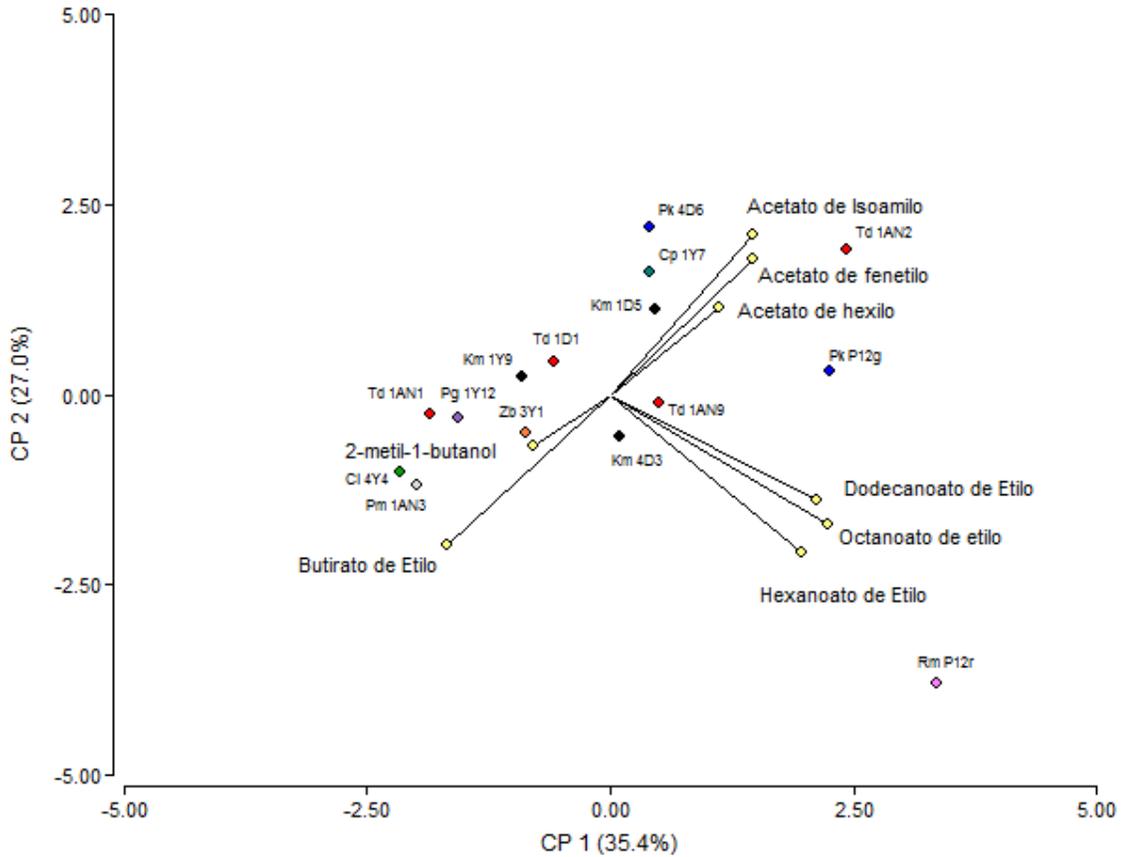


Figura 43. Analisis de los componentes principales (ACP) de la fermentación en medio M2 en mini biorreactores de 50 mL de las distintas cepas de no-*Saccharomyces* analizadas.

De manera general observamos que la mayoría de las cepas de no-*Saccharomyces* se agrupan o distribuyen mejor en los cuadrantes superiores de la figura 43 algo separadas del primer eje de variación. Sin embargo, mostrando su mayor capacidad de producción, en comparación con las cepas de *S. cerevisiae*, de estos compuestos importantes en la producción de bebidas por sus diversos aromas y sabores que pueden otorgar al producto final.

VII.9.2 Caracterización de las levaduras en mosto de agave

Las cepas evaluadas mostraron un carácter típico fructofílico, observado un consumo general del 90% de la fructosa alrededor de las 96 h, a excepción de la cepa Fermichamp la cual presenta un carácter de consumo nulo para ambos azúcares presentes en el mosto de agave, mostrando una residualidad del 98% tanto de fructosa como de glucosa a las 96 h (cuadro 22). Por otra parte en cuanto al consumo de

glucosa, además de la Fermichamp, solo la cepa Zb 3Y1 fue la que presentó residualidad al término del proceso fermentativo, puesto que el resto de las cepas, *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, consumieron en su totalidad dicho azúcar.

En el consumo de azúcares presentes en el mosto (cuadro 22) se observaron comportamientos similares, no obstante la cepa Fermichamp resalto por su nulo consumo de ambos azúcares presentando una mayor residualidad, mientras que el resto de los aislados como Sc 3Y4, Sc 3Y8 y Sc 3Y3 destacaron y confirmaron su capacidad de asimilación de ambos azúcares en este tipo de medio, debido posiblemente a la similaridad del medio del cual fueron aisladas. Al final de la fermentación (96 horas) las tres cepas mostraron un rendimiento similar así como una residualidad de entre 3.3 g de azúcares totales mostrando comportamientos similares a los observados en el análisis realizado bajo las mismas condiciones en jugo de uva roja.

En cuanto a los parámetros cinéticos, Fermichamp, Td1AN9 y Km1Y9 fueron las que menor cantidad de biomasa produjeron durante las primeras horas seguidas de la Zb3Y1 y las cepas de *Saccharomyces* 3Y3, 3Y4 y 3Y8 que resultaron las mas productoras de biomasa. Al final de la fermentación la biomasa fue similar mostrando valores de entre 8.9 y 9 g, mientras que la Fermichamp mantuvo valores menores a los de estas cepas alcanzando un valor final de 3.3 g.

En cuanto a etanol, las 6 cepas aisladas de los mostos de mezcal, mostraron un mejor rendimiento y por encima de la cepa control (Fermichamp) puesto que el rendimiento de dicha cepa es igual a cero en comparación con las otras que es muy cercano a los teóricos para procesos fermentativos.

Debido al consumo nulo de la cepa Fermichamp la cantidad de etanol que produjo resulto de 0 g/L, seguida de las cepas de nuestro cepario Sc 3Y4, Sc 3Y8, Sc 3Y3, Km 1Y9, Td 1AN9 y Zb 3Y1 con valores cercanos a los 60 g/L. En cuanto a la producción de ácido acético fue Fermichamp la que mostró una menor cantidad de dicho compuesto, seguida por la Zb 3Y1, Sc 3Y3, Sc, 3Y4, Sc 3Y8 y finalmente la Km 1Y9 y Td 1AN9 resultaron las que mayor concentración alcanzaron mostrando valores de 0.7 a 0.8 g/L. En cuanto a valores del glicerol, los observados fueron similares en la mayoría de las cepas a excepción de Fermichamp (por su baja producción 0 g/L) y Zb 3Y1 que mostro la mayor concentración de dicho metabolito con valores de 7 g/L, mientras que las otras cepas alcanzaron un valor de entre 4 a 4.5 g/L.

Cuadro 22. Consumo de azúcares y producción de metabolitos primarios de todas las cepas a las 96 h de fermentación en mosto de *Agave tequilana*, 107 g/L de azúcares iniciales (G/F=1:9).

Cepa	Glucosa	Fructosa	Etanol	CO ₂	Glicerol	Ac. Acético	Peso seco
	g/L						
Fcham	11.7 ± 1.36	93.6 ± 6.12	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.77	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	3.3 ± 0.16
Sc3Y3	0.00 ± 0.00	3.26 ± 0.08	50.2 ± 1.35	55.5 ± 1.96	4.43 ± 0.23	0.13 ± 0.05	8.9 ± 0.18
Sc3Y4	0.00 ± 0.00	2.97 ± 0.04	47.6 ± 0.55	55.9 ± 0.89	4.53 ± 0.17	0.17 ± 0.02	9.0 ± 0.20
Sc3Y8	0.00 ± 0.00	3.15 ± 0.03	46.8 ± 1.21	59.1 ± 0.98	4.39 ± 0.23	0.17 ± 0.07	8.9 ± 0.22
Td1AN9	0.00 ± 0.00	8.17 ± 1.58	52.5 ± 0.68	57.3 ± 1.35	4.06 ± 0.23	0.71 ± 0.08	5.7 ± 0.45
Km1Y9	0.00 ± 0.00	2.19 ± 0.03	55.8 ± 0.72	61.4 ± 0.47	4.23 ± 0.10	0.82 ± 0.08	4.8 ± 0.12
Zb3Y1	1.75 ± 3.02	3.33 ± 1.92	49.3 ± 4.84	51.3 ± 1.42	7.10 ± 0.31	0.08 ± 0.05	9.2 ± 0.14

Cuadro 23. Rendimientos de las diferentes cepas analizadas a las 96 h de fermentación en mosto de *Agave tequilana*, 107 g/L de azúcares iniciales (G/F=1:9).

Cepa	YEtOH/S	Ygly/s	Yx/s
Fcham	0.00	0.00	0.00
Sc3Y3	0.49	0.04	0.04
Sc3Y4	0.46	0.04	0.04
Sc3Y8	0.45	0.04	0.04
Td1AN9	0.53	0.04	0.05
Km1Y9	0.53	0.04	0.04
Zb3Y1	0.49	0.07	0.07

En general las cepas de la especie *Saccharomyces* presentaron un comportamiento eficiente durante la fermentación, manteniendo un rendimiento muy cercano a los teóricos, debido a que es en estas cepas donde se observa un valor de 0.45 a 0.49 a excepción de la cepa control Fermichamp, la cual tiene un rendimiento de 0 aun después de las 96 h de fermentación.

En el caso de las cepas no-*Saccharomyces* presentaron un rendimiento similar a las cepas *Saccharomyces* observando también valores de entre 0.49 y 0.53, destacando su alta resistencia a las condiciones del proceso fermentativo bajo estas condiciones y medio, puesto que la Fermichamp se ve afectada en su totalidad hasta después de las 96 h. Tomando en cuenta las condiciones de viabilidad celular que resultaron para la cepa control así como su nula producción y consumo de azúcares en el medio y tomando en cuenta de la importancia que esto presenta en el proceso fermentativo se decidió trabajar solamente con las diferentes cepas de *Saccharomyces* y las no-*Saccharomyces* aisladas de los mostos de mezcal para las pruebas en mezcla de las diferentes cepas.

VII.9.3 Caracterización de los cultivos mixtos en mosto de agave

Las mezclas evaluadas mostraron un buen perfil fermentativo, observado un consumo general del 95 al 97% de los azúcares alrededor de las 96 h para las mezclas con las cepas de la especie *S. cerevisiae* aisladas del mezcal, a excepción de la mezcla de Td 1AN9 con la cepa control (Fermichamp) la cual presenta un consumo del 90% de los azúcares presentes. No obstante, dicha mezcla evaluada sigue presentando un alto rendimiento en el proceso fermentativo aun y cuando es menor en comparación con el resto de las mezclas analizadas.

En general, las diferentes mezclas de las cepas aisladas de mezcal mostraron una similitud en cuanto a la residualidad de fructosa como de glucosa, presentes en el medio. Mientras que las mezclas de Fermichamp con la Zb 3Y1 y con la Td 1AN9 resultaron las de mayor residualidad en glucosa para el primer caso y fructosa para el segundo. Sin embargo, siguen siendo dichas mezclas analizadas, al igual que el resto de estas, mezclas con un buen perfil fermentativo mostrado en su consumo como rendimiento individual de cada una de ellas al final de la fermentación (cuadro 24). Por otra parte, cabe mencionar que se observó una producción e incluso un incremento en la concentración de etanol en comparación con la producción obtenida en la evaluación individual de cada cepa. Mientras que en la producción o liberación de CO₂ se observó una producción similar a excepción de la mezcla Sc3Y3-Km1Y9 que incrementó notablemente en comparación con el resto de las mezclas e incluso con las individuales (cuadro 22). Sin embargo, se observó una producción similar de biomasa en la cepa control con sus mezclas como en las otras mezclas con las *S. cerevisiae* aisladas del mezcal que presentaron valores alrededor de entre 5.5 y 9 g/L.

En el caso de la viabilidad de las cepas en las mezclas realizadas, ésta fue de aproximadamente del 90% al término de la fermentación, no obstante algo que marcó estos análisis fue que no se observó el predominio de las cepas *S. cerevisiae* sobre las No-*Saccharomyces* a pesar de la capacidad de dichas cepas en este tipo de proceso fermentativo, puesto que al evaluar el crecimiento en placa fueron las de menor número e incluso en algunos casos las únicas que no mostraron crecimiento aún en diluciones muy bajas, constatando la baja o nula presencia de las cepas *S. cerevisiae* al término de la fermentación.

Con base en los resultados obtenidos en dichas fermentaciones se seleccionaron aquellas mezclas con mejor perfil fermentativo, para poder evaluar la cinética del proceso fermentativo de cada mezcla y evaluar la interacción entre las especies o cepas evaluadas (cuadro 22). Sin embargo, se optó por eliminar el uso de la cepa control Fermichamp por su nulo crecimiento en mosto de agave, posiblemente debido a su origen de aislamiento o uso (vino). Se analizaron la mezcla de las cepas *S. cerevisiae* Sc3Y3, Sc3Y4 y Sc3Y8 con la cepa *T. delbrueckii* 1AN9.

En la evaluación de la cinética de las mezclas, se observó un perfil fermentativo similar al de la evaluación a un punto (96 h), como era de esperarse, en comparación con los datos de las cepas de manera individual. Observando un consumo general del 95 al 97% de los azúcares alrededor de las 96 h para las mezclas con las cepas de la especie *S. cerevisiae* aisladas del mezcal.

En general, las diferentes mezclas de las cepas *Saccharomyces* con las No-*Saccharomyces* aisladas de mezcal mostraron una residualidad similar, tanto de fructosa como de glucosa, presentes en el medio al final de la fermentación (Figura 44).

Cuadro 24. Consumo de azúcares y producción de metabolitos primarios de todas las mezclas a las 96 h de fermentación en mosto de *Agave tequilana*, 107 g/L de azúcares iniciales (G/F=1:1).

Sacc-no Sacc	Glucosa	Fructosa	Etanol	CO ₂	Glicerol	Ac. acético	Peso seco
	g/L						
Fcham-Td1AN9	0.00 ± 0.00	9.41 ± 1.39	52.8 ± 2.40	51.4 ± 1.35	4.72 ± 0.12	0.37 ± 0.17	5.5 ± 0.36
Fcham-Km1Y9	0.00 ± 0.00	2.13 ± 0.27	55.2 ± 1.76	55.8 ± 2.81	6.30 ± 1.61	0.66 ± 0.51	6.1 ± 0.79
Fcham-Zb3Y1	5.52 ± 3.64	2.44 ± 0.46	46.6 ± 2.23	47.8 ± 1.04	6.51 ± 0.38	0.11 ± 0.08	8.3 ± 0.18
Sc3Y3-Td1AN9	0.00 ± 0.00	3.09 ± 0.20	52.6 ± 4.12	57.6 ± 1.18	7.56 ± 2.29	0.85 ± 0.54	6.1 ± 1.29
Sc3Y3-Km1Y9	0.00 ± 0.00	1.78 ± 0.03	52.8 ± 0.83	75.6 ± 11.1	5.06 ± 0.10	0.11 ± 0.04	5.1 ± 1.36
Sc3Y3-Zb3Y1	0.00 ± 0.00	2.67 ± 0.06	48.6 ± 0.49	50.5 ± 2.78	4.53 ± 0.04	0.10 ± 0.01	9.3 ± 0.33
Sc3Y4-Td1AN9	0.00 ± 0.00	2.75 ± 0.13	51.7 ± 0.64	55.5 ± 1.36	5.85 ± 0.17	1.35 ± 0.24	6.6 ± 0.17
Sc3Y4-Km1Y9	0.00 ± 0.00	1.79 ± 0.02	52.3 ± 1.02	59.8 ± 1.09	5.05 ± 0.05	0.10 ± 0.06	5.5 ± 0.80
Sc3Y4-Zb3Y1	0.00 ± 0.00	2.78 ± 0.16	50.1 ± 0.39	54.5 ± 1.43	4.55 ± 0.13	0.09 ± 0.03	9.0 ± 0.43
Sc3Y8-Td1AN9	0.00 ± 0.00	3.13 ± 0.21	53.5 ± 2.03	64.2 ± 9.12	6.22 ± 0.15	1.02 ± 0.47	6.3 ± 0.45
Sc3Y8-Km1Y9	0.00 ± 0.00	1.79 ± 0.02	52.8 ± 1.28	64.1 ± 1.04	5.89 ± 1.89	0.24 ± 0.17	6.7 ± 1.43
Sc3Y8-Zb3Y1	0.00 ± 0.00	2.94 ± 0.18	49.9 ± 0.86	52.0 ± 1.89	4.58 ± 0.04	0.11 ± 0.01	9.2 ± 0.34

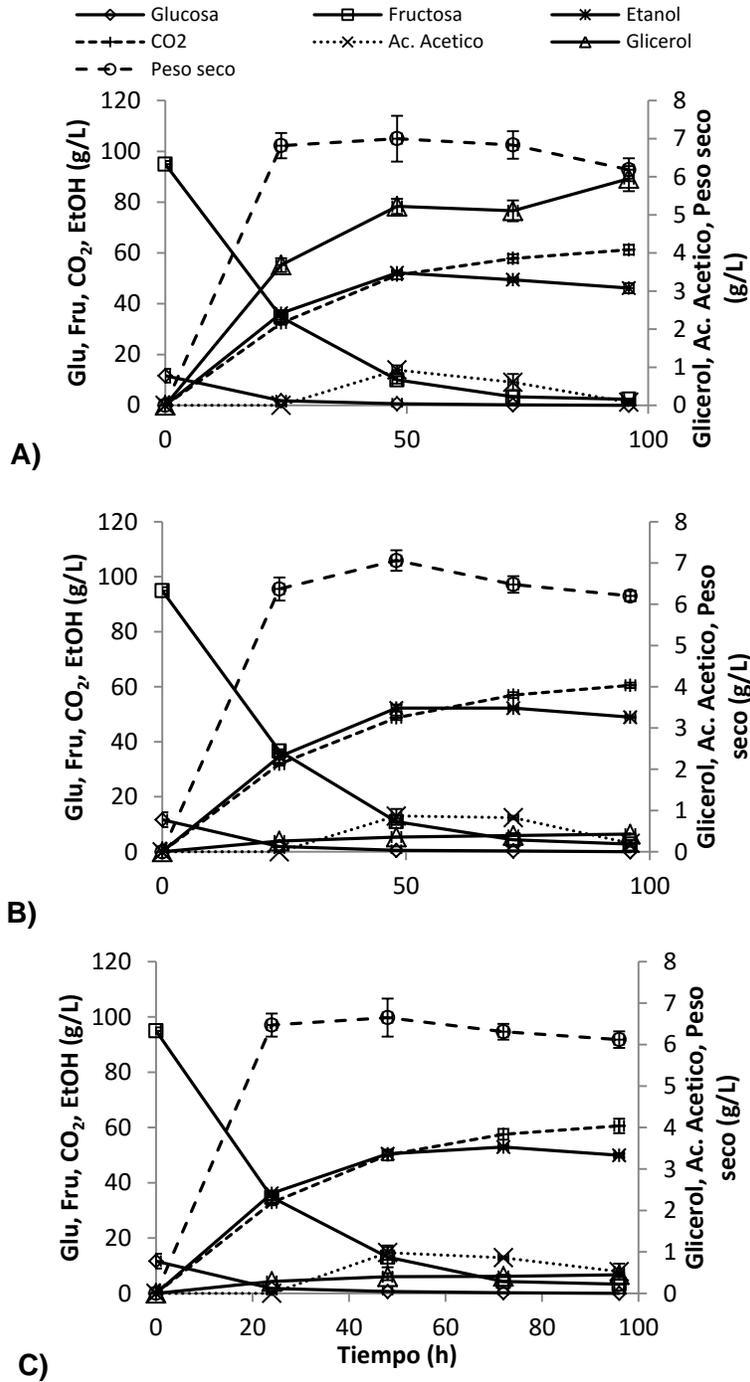


Figura 44. Cinética de la fermentación en mosto de agave en minibiorreactores de 50 mL de las 3 mezclas: a) 3Y3-1AN9, b) 3Y4-1AN9 y c) 3Y8-1AN9. En línea punteada están aquellas mediciones para el eje secundario.

Todas las fermentaciones mixtas fueron similares en la concentración de etanol alcanzada (46 a 49 g/L) y similares con las fermentaciones individuales, a excepción de la cepa *K. marxianus* 1Y9 la cual presenta valores mas altos (55 g/L). Por otra parte en la producción de CO₂ en comparación con la producción obtenida en la evaluación individual de cada cepa los valores resultaron muy similares (55 a 60 g/L), a excepción de la mezcla entre Sc 3Y3 y Km 1Y9 que alcanzo valores de 75 g/L, siendo este el valor mas alto observado de todas las mezclas e incluso de manera individual de cada una de las cepas aquí analizadas. Sin embargo, al tomar en cuenta otros aspectos de importancia en el proceso fermentativo, las diferencias puntuales resultaron darse en la concentración de glicerol y ácido acético al observar un ligero incremento en dichos metabolitos cuando el proceso fermentativo es llevado a cabo por las mezclas que cuando se da de manera individual de cada levadura.

De manera conjunta se realizó un análisis de varianza para corroborar de manera estadística la gran variedad en los perfiles fermentativos de cada una de las diversas levaduras analizadas, observando diversos grupos de consumo o residualidades de azúcares. Claramente se aprecian aquellas con alta capacidad fermentativa en la asimilación de los azúcares en el medio o aquellas mayormente productoras de metabolitos primarios, como puede observarse en el apéndice 3, en donde el la prueba Tukey mostró las diferencias significativas que existen en las diversas mezclas evaluadas en los diferentes consumos y producciones de metabolitos primarios, en los que se puede apreciar mezclas de alta, media y baja producción o consumo, según sea el caso en evaluación, permitiendo con ello una selección de aquellas mezclas con características tecnológicamente deseables.

La población total de levaduras analizadas de manera individual y mixtas presentó un crecimiento similar cercano a 10⁸ cel/mL, dicho crecimiento de la población es alcanzado durante las primeras 24-48 h, y en el caso de la viabilidad presentada por las cepas en las mezclas realizadas, se observó que la sobrevivencia de la cepa *T. delbrueckii* se mantiene aun con la presencia y el crecimiento de la cepa *S. cerevisiae* la cual termina decaer hasta el final de la fermentación en comparación de la cepa *T. delbrueckii*, puesto que al evaluar el crecimiento en placa fueron las de menor número, e incluso en algunos casos, fueron las únicas que no mostraron crecimiento aun en diluciones muy bajas, constatando la baja o nula presencia de las cepas al término de la fermentación (Figura 45). La comparación entre las cuentas obtenidas de ambos medios (WLN medio no selectivo y WLD medio diferencial) muestra claramente que al inicio del proceso fermentativo la mayoría de la población total pertenece a la cepa no-*Saccharomyces*, y que conforme avanza el proceso es la cepa de *S. cerevisiae* la que incrementa durante las primeras 24 h para mantenerse hasta el final de la fermentación.

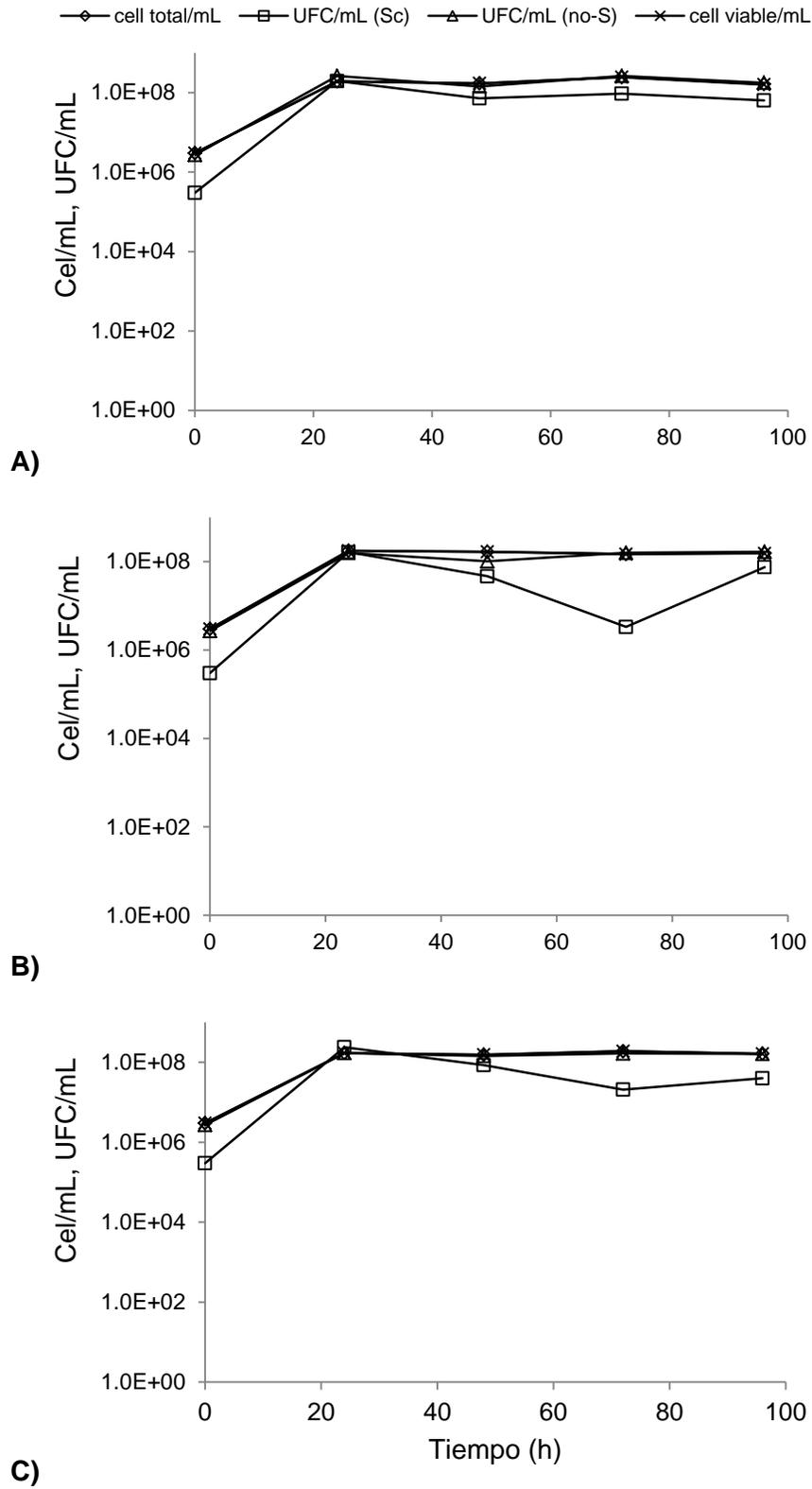


Figura 45. Viabilidad de la cinética de la fermentación en mosto de agave en minibiorreactores de 50 mL de las 3 mezclas analizadas: A) Sc3Y3-Td1AN9, B) Sc3Y4-Td1AN9 y C) Sc3Y8-Td1AN9.

Tomando en cuenta la importancia de los aromas y sabores de la bebida dados mayormente por el proceso metabólico de las levaduras que participan en el proceso fermentativo, se observó que la viabilidad de cada una de las cepas de forma individual resultan mayores en comparación con la obtenida cuando se utilizan en mezcla, a excepción de la cepa control fermichamp la cual no mostro crecimiento alguno en mosto de agave. Sin embargo, observamos una viabilidad en las mezclas realizadas, de un aproximado del 90-95% al término de la fermentación, característica posiblemente dada a que dichas cepas fueron aisladas de un medio similar.

VII.9.4 Caracterización de los compuestos volátiles en mosto de agave

De manera similar que en el medio sintético, las muestras de las diferentes fermentaciones de cada una de las cepas aquí utilizadas fueron analizadas por triplicado obteniendo un error experimental promedio de cada uno de los resultados para cada cepa.

Una vez realizada la evaluación de las muestras en mosto de agave se centró en aquellos compuestos de interés en bebidas destiladas, debido a la similaridad del medio empleado en las fermentaciones realizadas. En el cuadro 25 se destaca los compuestos de ésteres encontrados puesto que su presencia en bebidas alcohólicas contribuye fuertemente a la generación de olores dulces, florales y afrutados. Los componentes más abundantes fueron el butirato de etilo para el caso de algunas cepas de *Saccharomyces* y el fenil etil acetato para las no-*Saccharomyces*. Es posible atribuir que la variedad de ésteres identificados sean producto del metabolismo de las levaduras, puesto que la cantidad o concentración de cada compuesto vario dependiendo de la cepa empleada, destacando que la única diferencia entre procesos fermentativos fue la cepa utilizada.

Cuadro 25. Perfil de compuestos volátiles de las cepas seleccionadas a las 96 h de fermentación en mosto de agave.

Cepa	2-metil-1-butanol	Butirato de etilo	Acetato de isoamilo	Hexanoato de etilo	Octanoato de etilo	Fenil etil acetato	Dodecanoato de etilo
				$\mu\text{g/l}$			
Sc 3Y3	200 \pm 10	4 \pm 0.5	6 \pm 0.9	6 \pm 0.4	15 \pm 1	14 \pm 1	2 \pm 0.1
Sc 3Y4	220 \pm 3	3 \pm 0.2	4 \pm 0.1	5 \pm 0.01	15 \pm 2	17 \pm 0.1	2 \pm 0.1
Sc 3Y8	230 \pm 30	3 \pm 0.3	5 \pm 1	6 \pm 0.06	16 \pm 1	18 \pm 2	2 \pm 0.3
Fermichamp	230 \pm 60	ND	ND	ND	ND	7 \pm 0.3	ND
Td 1AN9	180 \pm 20	1 \pm 0.2	24 \pm 0.4	1 \pm 0.5	ND	369 \pm 30	1 \pm 0.4
Km 1Y9	260 \pm 80	0.5 \pm 0.1	9 \pm 1	0.8 \pm 0.3	ND	329 \pm 30	ND
Zb 3Y1	260 \pm 10	2 \pm 0.1	1 \pm 0.2	ND	ND	17 \pm 1	1 \pm 0.1

ND: no detectado

Diferencias significativas fueron observadas en los diferentes procesos de fermentación en los azúcares consumidos, producción de metabolitos primarios y en los diversos compuestos volátiles. Por otra parte, los análisis de componentes principales (ACP) de los diversos compuestos volátiles producto de las levaduras evaluadas se presenta en la figura 46. Los dos primeros ejes explicaron el 90 % de la variabilidad acumulada; el primero de ellos estuvo estrechamente relacionado con elevadas concentraciones de butirato, hexanoato, octanoato y dodecanoato de etilo. Los análisis de los compuestos volátiles de las diversas cepas indican claramente la mayor producción de butirato, hexanoato, octanoato y decanoato de etilo para las cepas de *S. cerevisiae* separándolas de la cepa control y de las no-*Saccharomyces*.

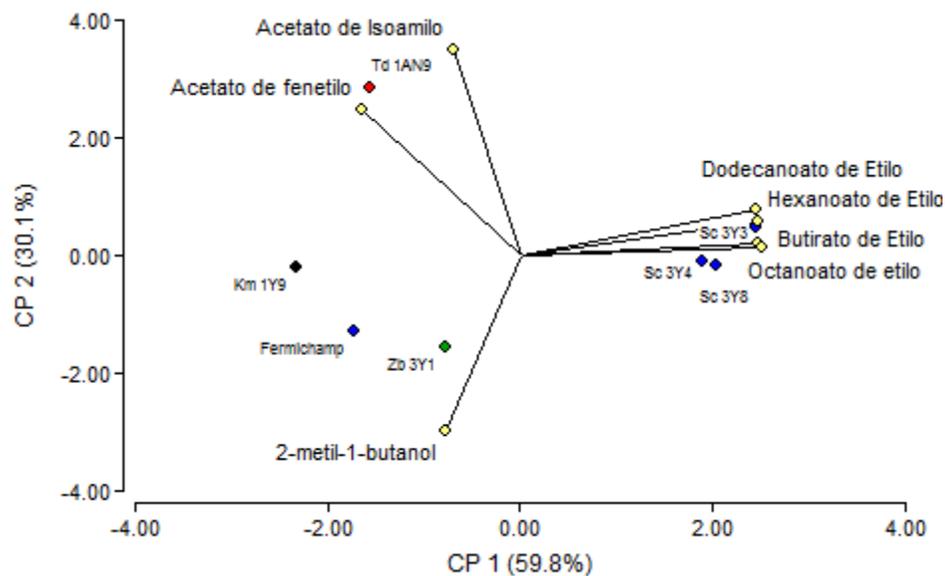


Figura 46. Análisis de los componentes principales (ACP) de la fermentación en mosto de agave en minibioreactores de 50 mL de las distintas cepas analizadas.

En este primer ACP se observó que las tres cepas de la especie *S. cerevisiae* aisladas del mezcal estaban siendo determinadas por las concentraciones o producción de butirato, hexanoato, octanoato y dodecanoato de etilo, volátiles pertenecientes a la lista de aromas de interés en bebidas alcohólicas, debido a sus notas frutales.

Cuadro 26. Perfil de compuestos volátiles de las mezclas de levaduras a las 96 h de fermentación en mosto de agave.

Cepa	2-metil-1-butanol	Butirato de etilo	Acetato de isoamilo	Hexanoato de etilo	Octanoato de etilo	Fenil etil acetato	Dodecanoato de etilo
				$\mu\text{g/l}$			
3Y3-1AN9	270 \pm 10	2 \pm 0.2	13 \pm 2	3 \pm 1	12 \pm 0.4	141 \pm 4	2 \pm 1
3Y3-1Y9	250 \pm 4	2 \pm 0.5	14 \pm 3	2 \pm 0.3	8 \pm 2	283 \pm 30	1 \pm 0.5
3Y3-3Y1	220 \pm 10	2 \pm 0.1	3 \pm 0.1	ND	ND	21 \pm 0.1	1 \pm 0.2
3Y4-1AN9	250 \pm 30	2 \pm 0.2	15 \pm 2	2 \pm 0.1	11 \pm 0.2	133 \pm 10	1 \pm 1
3Y4-1Y9	260 \pm 10	2 \pm 0.6	14 \pm 3	2 \pm 0.1	9 \pm 0.03	315 \pm 50	2 \pm 1
3Y4-3Y1	220 \pm 4	2 \pm 0.3	3 \pm 0.2	ND	ND	19 \pm 2	2 \pm 0.4
3Y8-1AN9	260 \pm 10	2 \pm 0.4	15 \pm 4	2 \pm 0.02	11 \pm 2	133 \pm 3	1 \pm 0.1
3Y8-1Y9	240 \pm 10	1 \pm 0.7	14 \pm 2	2 \pm 0.05	8 \pm 1	273 \pm 10	1 \pm 0.2
3Y8-3Y1	200 \pm 10	2 \pm 0.1	3 \pm 0.2	ND	ND	21 \pm 1	2 \pm 1
Fecha-1AN9	190 \pm 20	1 \pm 0.1	27 \pm 4	0.7 \pm 0.1	10 \pm 0.03	290 \pm 10	2 \pm 0.1
Fecha-1Y9	240 \pm 10	1 \pm 0.3	13 \pm 10	0.8 \pm 0.2	4 \pm 2	288 \pm 40	1 \pm 0.1
Fecha-3Y1	220 \pm 10	1 \pm 0.2	1 \pm 0.1	ND	ND	16 \pm 2	1 \pm 0.2

ND, no detectado

Cuadro 27. Perfil de compuestos volátiles en mosto de agave durante las cinéticas de crecimiento de las mezclas de levaduras seleccionadas.

Cepa	2-metil-1-butanol	Butirato de etilo	Acetato de isoamilo	Hexanoato de etilo	Octanoato de etilo	Fenil etil acetato	Dodecanoato de etilo
	µg/l						
3Y3-1AN9-24h	200 ± 1	1 ± 0.04	24 ± 3	2 ± 0.03	ND	259 ± 1	2 ± 0.1
3Y4-1AN9-24h	210 ± 10	1 ± 0.1	18 ± 1	2 ± 0.1	15 ± 0.2	252 ± 1	2 ± 0.1
3Y8-1AN9-24h	220 ± 20	1 ± 0.01	17 ± 1	2 ± 0.2	12 ± 1	246 ± 10	1 ± 1
3Y3-1AN9-48h	270 ± 10	1 ± 0.1	19 ± 1	2 ± 0.1	14 ± 1	225 ± 10	2 ± 1
3Y4-1AN9-48h	280 ± 2	1 ± 0.01	18 ± 1	2 ± 0.04	13 ± 0.2	253 ± 1	2 ± 0.02
3Y8-1AN9-48h	260 ± 10	2 ± 1	18 ± 2	3 ± 1	14 ± 2	216 ± 20	2 ± 1
3Y3-1AN9-72h	280 ± 3	1 ± 0.04	22 ± 0.3	2 ± 0.1	13 ± 0.3	215 ± 4	2 ± 1
3Y4-1AN9-72h	290 ± 2	1 ± 0.1	16 ± 1	2 ± 0.1	14 ± 1	197 ± 20	2 ± 0.1
3Y8-1AN9-72h	280 ± 10	1 ± 0.1	17 ± 1	2 ± 0.1	13 ± 0.2	207 ± 2	2 ± 0.2
3Y3-1AN9-96h	270 ± 20	2 ± 0.2	20 ± 4	3 ± 0.1	16 ± 0.1	215 ± 30	2 ± 1
3Y4-1AN9-96h	300 ± 2	2 ± 0.2	19 ± 0.04	3 ± 0.03	15 ± 0.3	199 ± 4	2 ± 0.2
3Y8-1AN9-96h	300 ± 4	2 ± 0.1	16 ± 2	3 ± 0.1	15 ± 2	184 ± 10	3 ± 1

ND, no detectado

Dentro de la evaluación de las muestras analizadas en mosto de agave se centralizo en aquellos compuestos de interés en bebidas destiladas, debido a la similaridad del medio empleado en las fermentaciones realizadas. En el cuadro 26 se destacan los compuestos de ésteres encontrados puesto que su presencia en bebidas alcohólicas contribuye fuertemente a la generación de olores dulces, florales y afrutados. Los componentes más abundantes fueron el 2-metil-1-butanol así como el fenil etil acetato para las mezclas aquí analizadas. Es posible atribuir que la variedad de ésteres identificados sean producto del metabolismo en conjunto de las levaduras, puesto que la cantidad o concentración de cada compuesto vario dependiendo de la mezcla empleada.

Otra parte importante que atrajo atención, fueron las concentraciones crecientes que se presentaron conforme avanzaba el proceso fermentativo (cuadro 27), del 2-metil-1-butanol el cual se ha reportado en la literatura como uno de los que constituyen como compuestos descriptores de aromas manejando notas aromáticas florales o frutales.

En el caso de las mezclas empleadas para el proceso de fermentación en mosto de agave, los resultados mostraron que las fermentaciones individuales resultan con una mayor producción de compuestos volátiles en comparación con las mezclas, en las cuales se presentan valores menores de compuestos volátiles. Una vez analizado el proceso fermentativo de las diferentes mezclas, el resultado del Analisis de Componentes Principales (ACP) de los diversos compuestos volátiles producto de las levaduras en mezcla se presenta en la figura 47. Los dos primeros ejes explicaron el 73.7% de la variabilidad acumulada; el primero de ellos estuvo estrechamente relacionado con las elevadas concentraciones de hexanoato de etilo y octanoato de etilo.

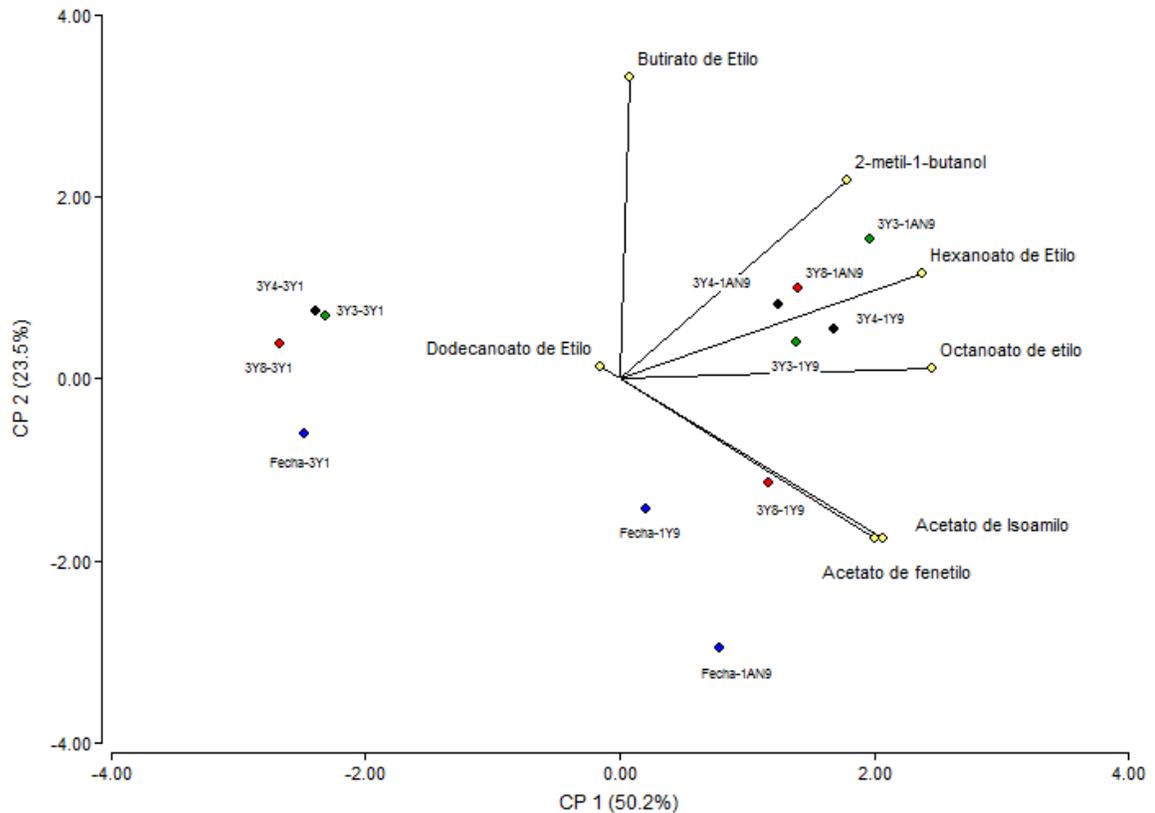


Figura 47. Analisis de los componentes principales (ACP) de la fermentación en mosto de agave en minibioreactores de 50 mL de las distintas mezclas de levaduras analizadas.

Debido al elevado contenido en acetato de fenetilo dado por la cepa Td 1AN9, se decidió seleccionar a ésta cepa y excluir el resto de cepas no-*Saccharomyces* y repetir el proceso fermentativo para dar seguimiento de la cinética. Así mismo, se decidió por excluir la cepa control Fermichamp por su crecimiento nulo en mosto de agave para las pruebas posteriores.

VIII.DISCUSIÓN

VIII.1 Tolerancia al etanol

Las levaduras son industrialmente importantes debido a su basto uso en la elaboración de alimentos como el pan y bebidas alcohólicas como lo son la cerveza, vino, tequila y actualmente en la producción de combustibles como lo es el bio-etanol. Algunas especies como *S. cerevisiae* presentan una compleja red que le permite sentir, responder y adaptarse a los cambios que se presentan en su medio. Sin embargo, las rutas de la regulación metabólica así como los mecanismos de adaptación a las condiciones extremas que se presentan en procesos fermentativos aún no suelen ser comprendidos completamente.

El seguimiento de la tolerancia que presentan cada una de las levaduras de las diferentes especies analizadas en medio YPD suplementado con etanol mostró una gran variación en los valores de tolerancia alcanzados. La variación entre las respuestas ante el estrés de las 10 especies de levaduras analizadas en este trabajo podría estar relacionada a diferentes mecanismos fisiológicos para enfrentar la misma condición de estrés. Se ha reportado evidencia de que ante una misma situación de estrés el número de genes varía entre especies por lo que las mismas condiciones no podrían inducir a las mismas respuestas de diferentes especies. No obstante se reporta también que dichos cambios en la respuesta de tolerancia de las levaduras puede estar ligado a cambios y ruido biológico por lo que dicha respuesta debe ser interpretada con precaución (Tirosch *et al.*, 2011).

Se observó que la especie de mayor tolerancia en este tipo de estrés resultó ser *S. cerevisiae*, con algunas diferencias dependiendo de la cepa, mostrando valores de hasta un 15% de tolerancia coincidiendo con reportes por otros autores que mencionan que al final de la fermentación donde las concentraciones de etanol en el medio oscila alrededor de 15% se encuentra dominado por las levaduras alcohol-tolerantes como lo son las de la especie *S.cerevisiae* (Pretorius, 2000) así como algunas cepas analizadas por Páez *et al* (2011) que presentan tolerancias de entre 12 y 15% y otras analizadas por Tofalo *et al* (2009) las cuales alcanzaron valores del 14%. Se ha reportado evidencia de que esta especie de levadura suele mostrar una buena eficiencia durante los procesos fermentativos y por ende una alta producción de etanol alcanzando valores cercanos a los 50 g/L (Arrizon *et al.*, 2002) en la producción de tequila, valores que desencadenan los factores para un estrés que en general propicia condiciones adversas a las cuales el organismo tiene que enfrentarse. Sin embargo, también debe considerarse que debido a su capacidad de alta producción de etanol, consecuentemente dicho organismo puede presentar la capacidad de tolerar las condiciones que propician las concentraciones crecientes de etanol durante el proceso fermentativo.

Las cepas aquí analizadas de la especie *S. cerevisiae* mostraron una mejor capacidad de tolerancia a concentraciones crecientes de etanol en comparación con otras cepas de la misma especie reportado por otros autores (Belloch *et al.*, 2008) que mostraron una tolerancia máxima del 10% mientras que algunas de nuestras cepas mostraron una máxima del 15% mostrando un patrón de tolerancia similar a lo reportado por Mehdikhani *et al* (2011) que observa que es a partir de 15% en adelante donde la densidad de la población decrece así como una ausencia de colonias de las cepas analizadas. Mientras que Salvadó *et al* (2011) observaron, al evaluar 6 distintas cepas de vino, el efecto que tiene el etanol a concentraciones crecientes, denotando también que fue a partir de 16% el límite superior.

Por otra parte y de manera coincidente, se observó que las cepas de la colección de LBI alcanzan valores más altos de tolerancia que los alcanzados por cepas industriales o de uso comercial como lo fue el caso de la cepa Fermichamp, tal y como se ha reportado en otras investigaciones tales como la de Bravim *et al* (2010) en la cual se observó que las cepas de laboratorio resultaron ser más tolerantes a concentraciones crecientes de etanol y presión hidrostática que las cepas de uso industrial, sin embargo, éstas últimas fueron más productivas.

Las cepas de las especies no-*Saccharomyces Z. bailli* y *T. delbrueckii* mostraron ser menos tolerantes que las cepas de *S. cerevisiae* a concentraciones crecientes de etanol, mostrando una discrepancia con los resultados observados por Santos *et al.*, (2008) quien observó que las especies no-*Saccharomyces* anteriormente mencionadas resultaron ser de mayor tolerancia que las cepas de *S. cerevisiae* bajo estrés de etanol y ácido acético, no obstante dicha discrepancia observada puede ser atribuida a las diferencias que pueden tener cada una de las diversas cepas de cada especie. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación son similares a los de Pina *et al.* (2004 b y c) y Tofalo *et al.* (2009) quienes observaron que fue *T. delbrueckii* y *Z. bailli* las especies que mayor sensibilidad mostraron a concentraciones crecientes de etanol.

VIII.2 Tolerancia a la fructosa

Se ha reportado que *S. cerevisiae* puede crecer de manera oxidativa en fuentes de carbono no fermentativas tales como piruvato, lactato, acetato y etanol (Marks *et al.*, 2008). El paro de fermentación debido a las altas concentraciones residuales de fructosa en la parte final del proceso fermentativo suele producir pérdidas importantes, por lo que la búsqueda de cepas de levaduras con la capacidad de preferencia y tolerancia a dicho azúcar es un objetivo de alta importancia para la industria alcohólica en general (Arroyo-López *et al.*, 2009). La levadura *S. cerevisiae* suele optar por la producción y acumulación intracelular de glicerol para mantener un equilibrio durante la presión osmótica que puede presentarse (Hohmann, 2002). Diferentes autores han reportado variación en el crecimiento de levaduras de acuerdo a la concentración de azúcar (Carrasco *et al.*, 2001); mientras que otros indican cómo la tasa

de crecimiento y la capacidad fermentativa de *S. cerevisiae* resulta afectada a medida que la concentración inicial de azúcar en el medio incrementa por encima de los 200 g/L (Belloch *et al.*, 2008). Como era de esperarse, las cepas de especies no-*Saccharomyces* mostraron características osmotolerantes, pero la capacidad de crecimiento de las diferentes cepas analizadas de la especie *S. cerevisiae*, que no suelen ser consideradas osmotolerantes, de la colección de LBI-CBG, mostraron un comportamiento similar de tolerancia a altas concentraciones de fructosa.

De las especies analizadas, una disminución general y variada en el crecimiento de cada una de ellas fue observada a concentraciones crecientes de fructosa tal y como se reportado para otros azúcares como lo es la glucosa (Tofalo *et al.* 2009). No obstante ha sido ya reportado por otros autores que hay cepas capaces de crecer en concentraciones de fructosa mayores al 40% (Belloch *et al.*, 2008, Páez *et al.*, 2011), otras, aisladas de diversos procesos industriales con máxima tolerancia de 59 a 63% (Arroyo-López *et al.*, 2009). La capacidad de crecimiento de las diversas levaduras no-*Saccharomyces* analizadas de la colección de LBI mostro una alta tolerancia a las altas concentraciones de azúcar, similar a lo ya reportado por otros autores quienes hacen mención de la capacidad de crecimiento a concentraciones del 90% de glucosa como es el caso de *Zygosaccharomyces rouxii* (Leandro *et al.*, 2011). Por otra parte, la especie *Z. bailli* de la colección de LBI mostró una alta tolerancia a las concentraciones crecientes de azúcar coincidiendo con lo ya observado por Martorell *et al.* (2007) y Tofalo *et al.* (2009) quienes mencionan que es conocido que cepas de la especie *Z. bailli* poseen características fisiológicas inusuales como la resistencia a ambientes ácidos y de osmotolerancia extremos (72% glucosa). De manera similar se observó una alta tolerancia en la cepa del género *Candida* alcanzando un máximo de 80%, tal y como se ha reportado por otros autores que hacen mención de que dicha especie suele tolerar concentraciones entre 72 y 90% de azúcar (Arroyo-López *et al.*, 2009).

En general la mayoría de las cepas analizadas de la colección LBI-CBG mostraron ser levaduras osmotolerantes considerando que aquellas levaduras con la capacidad de crecer a concentraciones mayores del 60% de azúcar suelen ser consideradas como osmotolerantes y osmófilas basado en la acumulación de altas concentraciones de solutos tales como glicerol o trehalosa (Arroyo-López *et al.*, 2009).

VIII.3 Análisis global de la tolerancia al estrés en levaduras

VIII.4 Minifermentaciones

Actualmente, es bien conocido que son las levaduras no-*Saccharomyces* las que podemos encontrar al inicio de la mayoría de los procesos fermentativos. Sin embargo, a pesar de la baja tolerancia a los

diferentes tipos de estrés a los cuales se ven sometidas hacia el final de la fermentación, se conoce también que son capaces de influir de manera positiva en el perfil sensorial final de una bebida, por lo que resulta de gran interés el conocer los perfiles que estas levaduras pueden mostrar bajo distintas relaciones de azúcar.

VIII.5 Caracterización de las levaduras en medio sintético tipo uva (M3)

De acuerdo a lo observado, la mayoría de las cepas *Saccharomyces* de la colección LBI-CBG mostraron una alta velocidad para completar el proceso fermentativo, incluso superior que la cepa testigo (Fermichamp) en los distintos medios utilizados mostrando que alrededor de los primeros cuatro días la residualidad de azúcares totales en el medio resultaba ser menos a 1 g/L (Sc3Y4), mientras que otras cerca de 3 g/L siendo el caso de la Sc mosca3. Estudios anteriores (Andorra *et al.*, 2012) presentan resultados similares en los cuales bajo una concentración de 170 g/L de azúcares (glucosa/fructosa) las cepas de *S. cerevisiae* requieren 7 días para terminar el proceso fermentativo obteniendo una residual menor a 2 g/L. No obstante, algo que cabe resaltar es la capacidad de las cepas analizadas, puesto que aun a concentraciones mayores de azúcares (200 g/L) muestran una residualidad y cantidad menor de tiempo en el proceso fermentativo que las de estos autores.

Por otra parte de igual forma que lo reportado por Andorra *et al.*, (2012), algunas de las especies no-*Saccharomyces* de la colección LBI-CBG requieren menos tiempo para consumir los azúcares del medio, y con una producción de etanol y glicerol final de alrededor de 70 g/L.

Con respecto a la concentración celular alcanzada, éstas fueron similares a lo reportado por Andorra *et al.*, (2012) teniendo valores cercanos a 10^8 cel/mL. Observando de manera general una relación parecida entre el conteo en microscopio de células viables así como las UFC/mL obtenidas en las placas de WLN y WLD.

VIII.5.1 Caracterización de los compuestos volátiles en medio sintético tipo uva (M3)

Las concentraciones de algunos alcoholes superiores tales como el 1-hexanol y el 1-pentanol resultaron ser muy similares entre las diversas cepas nativas e industriales aquí estudiadas (cuadro 12), concordando con otros datos reportados, aunque en el producto final, que presentan concentraciones muy similares de los compuestos anteriormente mencionados, tal es el caso de Vera-Guzman *et al.*, (2009) y De León-Rodríguez *et al.*, (2008). Mientras que las concentraciones de alcohol isoamílico fueron más variadas entre las levaduras nativas e industriales como se ha reportado en otros estudios en bebidas como mezcal, sotol, raicilla, tequila, entre otros (De León-Rodríguez *et al.*, 2008) siendo éste uno de los compuestos volátiles deseados en las bebidas puesto que presenta un aroma frutal. Se

observó también que dichos valores en el alcohol isoamílico como en el isobutanol fueron similares a los reportados por Arellano *et al.*, (2008) que alcanzan valores cercanos a los 100 mg/L y 40 mg/L respectivamente bajo la temperatura de 35 °C. No obstante, dichos valores fueron más cercanos en el caso de las levaduras nativas que en las de uso industrial, observando un 35% menos en su concentración para el caso del alcohol isoamílico, mientras que para el isobutanol solo una cepa de uso industrial mostro una producción similar puesto que las otras 2 resultaron ser 3 veces menores en sus valores de dicho compuesto. En general, podríamos considerar que la presencia de los diversos alcoholes identificados son resultado de la fermentación por las levaduras, principalmente el etanol, que como ya se ha reportado suele ser el más abundante (Molina-Guerrero *et al.*, 2007).

Las concentraciones de acetato de etilo fueron variadas entre las cepas nativas, mientras que en las industriales no se encontró dicho compuesto. Sin embargo, las concentraciones observadas en las cepas nativas (*S. cerevisiae*) presentan valores similares a los reportados por Arellano *et al.*, (2008) que se mantienen en bajas cantidades (5 mg/L) lo cual se consideraría aceptable puesto que se ha demostrado que ha concentraciones mayores de 150 mg/L suele volverse un compuesto indeseable en las bebidas. Podemos asociar nuestras cepas como buenas candidatas para su uso en la elaboración de bebidas debido a su baja concentración de dicho compuesto, además de resaltar la producción de, que la mayoría de los ésteres fueron etil los cuales son asociados con el bouquet y agradables sabores frutales, los cuales han sido ya reportados en diversas bebidas alcoholicas tales como el tequila, whisky, coñac y otras (De León-Rodríguez *et al.*, 2006).

VIII.6 Caracterización de las levaduras en jugo de uva

Anteriormente, la industria vinícola solía tener toda su atención sobre las diversas levaduras *S. cerevisiae* por su alta capacidad fermentativa, ignorando con ello el posible uso o capacidades que pudieran presentar las levaduras no-*Saccharomyces* en el proceso fermentativo. Uno de los objetivos de esta investigación fue el observar el perfil fermentativo así como el efecto en la producción de aromas de las diversas cepas aisladas del mezcal en un medio como el mosto de uva, tanto de manera individual como en mezcla. Andorra *et al.*, (2010) analizaron algunas levaduras de manera individual y en mezcal, y donde observaron, que fue el cultivo puro acaba antes el proceso fermentativo a diferencia de las mezclas de levaduras utilizadas, que requerían de más tiempo. Dichos resultados son similares a los obtenidos en éste trabajo, incluyendo las concentraciones de etanol alcanzadas (entre 9.5 y 11 %). No obstante y de manera coincidente con lo reportado por Andorra *et al.*, (2010), la diferencia más puntual se observó en el incremento en la cantidad de glicerol y ácido acético en las mezclas en comparación con los datos obtenidos en los cultivos puros.

Todas las cepas inoculadas comenzaron simultáneamente la fermentación, a las pocas horas, sin embargo, es hasta después de las primeras 24 h donde se puede observar las diferentes capacidades fermentativas de cada cepa evaluada, teniendo cepas con consumos rápidos y algunas con bajos, tal y como se ha reportado por otros autores que han empleado diversas cepas en mostos de uva tal es el caso de Orlic *et al.*, (2007) el cual presenta diferencias en el consumo de azúcares en sus cepas mostrando consumos de 16 días y otras de hasta 24 días.

Por otra parte, la mayoría de las cepas *S. cerevisiae* mostraron una alta producción de etanol así como algunas diferencias entre ellas coincidiendo con lo reportado por Orlic *et al.*, (2007), mientras que las no-*Saccharomyces* mantuvieron producciones más bajas en comparación con las de *S. cerevisiae* e incluso mostraron fermentaciones inconclusas mostrando altas residualidad de azúcares, tal fue el caso de *T. delbrueckii*. De igual forma se observaron rangos de producción de glicerol entre 7 y 10 g/L, así como en mayores cantidades el etanol y el CO₂ liberado reportados como unos de los componentes más abundantes en las fermentaciones de jugo de uva (Barros Lopes *et al.*, 2000).

La comparación entre las concentraciones celulares obtenidas en ambos medios (WLN medio no selectivo y WLD medio diferencial) muestra claramente que al inicio del proceso fermentativo la mayoría de la población total pertenece a la cepa no-*Saccharomyces*, pero que conforme avanza el tiempo en el proceso es *S. cerevisiae* quien predomina y se mantiene hasta el final de la fermentación, similar a lo reportado por Andorra *et al.*, (2010). No obstante, a diferencia del porcentaje presente de la cepa no-*Saccharomyces* empleada por estos autores (<1%), la cepa Td 1AN9 aislada del mezcal representa aún entre 10 y 15% de viabilidad al final de la fermentación.

Es conocido que las levaduras no-*Saccharomyces* predominan el inicio de la fermentación para después desaparecer por la alta capacidad fermentativa de *S. cerevisiae*, no obstante también se debe tomar en cuenta la interacción levadura – levadura que puede presentarse en el proceso lo cual puede tener una alta influencia en las cepas analizadas. Los resultados aquí presentados muestran que la presencia de *S. cerevisiae* reduce la capacidad de crecimiento de la otra especie en mezcla, como es observado también por Andorra *et al.* (2010) y por Pérez-Nevado *et al.* (2006), al igual que Nissen *et al.*, (2003) se concluye de manera preliminar que la muerte temprana de *T. delbrueckii* y *K. marxianus* en presencia de *S. cerevisiae* en mezcla es debido, no por el efecto tóxico del etanol a éste tiempo, sino por el contacto célula – célula.

VIII.6.1 Caracterización de los compuestos volátiles en jugo de uva

Los ésteres resultaron ser de los compuestos más producidos, encontrando hexanoato, octanoato y decanoato de etilo, tal y como se ha reportado por Jiang *et al.*, (2010). Cabe destacar que al igual que

como se ha mencionado en otras investigaciones las cantidades de los ésteres, depende de cada una de las cepas evaluadas en esta investigación. No obstante, se observaron cantidades mas bajas en las muestras de este estudio en comparación con las de Jiang *et al.*, (2010). Sin embargo, cabe mencionar que la evaluación de dicho estudio se realizó en productos finales o terminados, es decir, el vino añejado, mientras que aquí fue un análisis directamente en las muestras de fermentación. Es tal vez por éste motivo que para el fenil etil acetato los autores reportan valores de las variedades de vino analizadas de entre 30 a un máximo de 310 µg/L, mientras que en los resultados aquí presentados las levaduras no-*Saccharomyces* mostraron valores que iban de 130 a 5069 µg/L de manera individual, y aun en mezcla de cepas se mantienen valores altos, que van de 72 hasta 1246 µg/L, muy por encima de lo reportado por Jiang *et al.* (2010). Este resultado es muy positivo considerando de gran importancia en este estudio por ser uno de los volátiles mas deseados en las bebidas puesto que presenta un aroma floral muy placentero para el consumidor.

Las concentraciones de alcohol isoamilico resultaron ser muy similares entre las diversas cepas de no-*Saccharomyces* aquí estudiadas, concordando con otros datos reportados, aunque al mismo tiempo variadas entre las levaduras *S. cerevisiae* como se ha reportado en otros estudios en bebidas como el vino. (Jiang *et al.*, 2010). Sin embargo, aunque las concentraciones de dicho compuesto fueron variadas es uno de los volátiles deseados en las bebidas puesto que presenta un aroma frutal.

Finalmente las características encontradas en las cepas aquí analizadas resultan de gran importancia debido a la prduccion de acetato de hexilo (manzana, afrutado), caproato y caprilato de etilo (manzana), acetato de isoamilo (banana) y el fenil etil acetato (afrutado, floral), compuestos los cuales resultan de interés y caracteristicos en un buen vino Orlic *et al.*, (2007).

VIII.7 Caracterización de las levaduras en medio sintético tipo agave (M2)

De acuerdo a lo observado, nuestras cepas *Saccharomyces* y no- *Saccharomyces* presentaron una velocidad mayor para completar el proceso fermentativo, incluso que la cepa testigo (Fermichamp) mostrando que alrededor de las primeras 24 h la residualidad de azúcares en el medio resultaba ser menor a 4 g/L como lo presenta la cepa Td1D1 y Km1Y9.

De acuerdo a lo observado, las cepas *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* presentaron una velocidad mayor para completar el proceso fermentativo, incluso mayor que la cepa testigo (Fermichamp) en cuanto a fructosa. La baja capacidad de la cepa testigo para consumir esta azúcar, puede ser debida a las características que presenta el medio de fermentación (mosto tipo agave) que resultan ser estresantes para una cepa de uso comercial y la cual fue aislada de un ambiente, aunque estresante, muy distinto al evaluado en esta investigación.

Estudios anteriores (López-Alvarez *et al.*, 2012) presentan resultados similares en los cuales bajo una concentración de 160 g/L de azúcares (glucosa/fructosa) la cepa de *S. cerevisiae* de pan evaluada mostró una menor eficiencia en el proceso fermentativo, obteniendo una menor producción en etanol y otros metabolitos. Por otra parte, en comparación con lo reportado por López-Alvarez *et al.*, (2012), las cepas no-*Saccharomyces* aquí estudiadas mostraron una mayor concentración de los diversos metabolitos de interés como lo es el etanol, y al mismo tiempo presentaron una mejor eficiencia para terminar con los azúcares presentes en el medio e incluso en algunos casos se aprecia una mayor velocidad de consumo. Se observan diferencias significativas en los niveles de producción de todos los metabolitos al tiempo de muestreo (apéndice 3).

VIII.7.1 Caracterización de los compuestos volátiles en medio sintético tipo agave (M2)

Las concentraciones de algunos alcoholes superiores tales como el 3-metil-1-butanol resultaron ser similares entre las diversas cepas aquí estudiadas, concordando con otros datos reportados, aunque en el producto final destilado. Las concentraciones de alcohol isoamílico fueron las más variables entre las levaduras como se ha reportado en otros estudios en bebidas como mezcal, sotol, raicilla, tequila, etc. (De León-Rodríguez *et al.*, 2008), la presencia de este compuesto es deseable por su aroma frutal.

De manera relevante, dentro de los diferentes compuestos volátiles de alta importancia por el impacto que producen en los aromas y sabores de la bebida se encuentran los ésteres, compuestos los cuales dependerán mayormente de la cepa involucrada en el proceso fermentativo. En tequila han sido reportado 47 distintos ésteres, siendo el más reportado el acetato de etilo, para mezcal se han reportado 18 diferentes, teniendo como mayoritarios hexanoato, octanoato de etilo y el fenil etil acetato (Gschaedler-Mathis *et al.*, 2004; Molina *et al.*, 2007; Arellano *et al.*, 2008), compuestos que también fueron encontrados en este trabajo.

VIII.8 Caracterización de las levaduras en mosto de agave

Tomando en cuenta que la cepa testigo (Fermichamp), empleada normalmente en producción o elaboración de vino, presentó un rendimiento muy bajo en el mosto de agave con altas concentraciones de azúcares (mayoritariamente fructosa), resulta evidente la incapacidad de dicha cepa para ser utilizada como parte del inoculante de un proceso fermentativo que involucra características como las del mosto de agave. En esta investigación, el crecimiento y diferentes rendimientos observados en las diversas levaduras aisladas del mezcal de Tamaulipas se puede atribuir como un resultado del origen de su aislamiento que les ha permitido cierta adaptación a diferentes condiciones de fermentación (Oliva-Hernández *et al.*, 2013) resultados también observados por Arrizon *et al.* (2006).

Las diferencias encontradas en las concentraciones de ácido acético producido por las cepas en medio sintético y el mosto de agave mostró que el uso de mosto real, debido al cocimiento del agave, puede proporcionar otro tipo de compuestos que pueden favorecer o afectar a las levaduras involucradas en el proceso de la fermentación, la cual resulta también un factor importante y lo que termina repercutiendo en la síntesis de este y otros compuestos los cuales influyen en las características y composiciones químicas de los productos finales (Vera-Guzmán *et al.*, 2012).

El uso de cepas aisladas de vino en bebidas de agave resulta complicado, posiblemente como lo mencionan otros autores (Arrizon *et al.*, 2006) debido a que las cepas aisladas de bebidas base agave han pasado por cierta adaptación debido a que inicialmente el agave es cocido liberando compuestos de Maillard o furfural compuestos que suelen resultar tóxicos para las levaduras propiciando con ello ventaja a aquellas cepas aisladas de estas condiciones a diferencia de las de vino que posiblemente solo están sujetas a altas concentraciones de azúcares (otro tipo de estrés) por lo que resultarían afectadas en rendimiento y crecimiento. Por otra parte, si tomamos en consideración que las cepas aisladas de vino presentan un carácter mayormente glucofílico (Bertheles *et al.*, 2004), mientras que el agave por su alto contenido en fructosa propicia a las levaduras una mejor capacidad de asimilación a glucosa como fructosa (Arrizon *et al.*, 2006; Oliva-Hernández *et al.*, 2013).

Por otra parte, de igual forma que lo reportado por López-Alvarez *et al.*, (2012), las cepas no-*Saccharomyces* así como las *Saccharomyces* de la colección LBI-CBG mostraron una alta eficiencia en el proceso fermentativo, teniendo como resultado una mayor concentración de los diversos metabolitos de interés como lo es el etanol, y al mismo tiempo una menor residualidad de los azúcares presentes en el mosto de agave aquí utilizado. Algo que cabe resaltar es el comportamiento de las poblaciones en comparación a lo reportado en mosto de uva, ya que la presencia de *S. cerevisiae* reduce la capacidad de crecimiento de la otra especie en mezcla, al contrario de lo que se reporta en vino (Andorra *et al.*, 2010; Perez-Nevado *et al.*, 2006). En otros estudios, como el de Nissen *et al.* (2003) se afirma que la muerte temprana de *T. delbrueckii* y *K. marxianus* en presencia de *S. cerevisiae* en mezcla es debido, no por el efecto tóxico que genera las altas concentraciones de etanol sino por el contacto célula – célula. Bajo las condiciones y medio aquí analizados se obtuvo que las cepas no-*Saccharomyces* no son afectadas por la presencia de las *S. cerevisiae* empleadas en mezcla, sin embargo, se desconoce a ciencia cierta el motivo de esta diferencia en la capacidad de crecimiento en comparación con lo ya reportado. Sin embargo, cabe resaltar que para el caso de la cepa testigo (Fermichamp) la explicación puede residir en el lugar de aislamiento o el uso que se le da a la cepa (vino), muy diferente al ambiente químico impuesto por el mosto de mezcal, el cual presenta diversos compuestos que se encuentran presentes en la planta y los que se generan por la cocción de la piña, tal y como compuestos de Maillard, metanol y furfural.

La elaboración de las bebidas alcohólicas suele emplear cepas de levaduras selectas. Sin embargo, al emplear una única cepa o especie de levadura, el sabor, aroma o bouquet suelen ser más neutrales que el creado por la contribución de una mezcla o distintas especies y son los compuestos volátiles quienes dan ese aroma o bouquet de las bebidas. Por otra parte, también puede ser reconocido este tipo de característica cuando no se emplea un 100% de la materia prima que normalmente se utilizaría, tal como la uva para el vino o el agave para el tequila o mezcal.

VIII.8.1 Caracterización de los compuestos volátiles en mosto de agave

Siete compuestos volátiles son considerados de gran importancia por sus características de aroma-sabor encontrados en vino, tequila, mezcal, sotol y otros, y éstos fueron seleccionados para cuantificarse en este estudio y determinar la capacidad de de estos compuestos aromáticos producción por las cepas LBI-CBG en diferentes medios sintéticos y medios reales, siendo los compuestos: 2-metil-1-butanol, butirato de etilo, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, fenil etil acetato y decanoato de etilo.

Durante el análisis de compuestos volátiles de nuestra investigación, producto del proceso fermentativo de las diversas cepas, observamos una variabilidad significativa en las concentraciones de los diversos ésteres compuestos considerados como los contribuyentes mayoritarios en la calidad organoléptica de las bebidas de agave. Esto da como resultado que existe un gran potencial del uso de las cepas LBI-CBG por la importancia en el efecto que pueden propiciar en la calidad organoléptica del producto final, características también observadas por otros autores como Arrizon *et al.*, (2006), Díaz-Montaña *et al.*, (2008) y Lopez-Alvarez *et al.*, (2012).

En la producción de alcoholes superiores las cepas LBI-CBG presentaron valores por debajo de los reportados por Lopez-Alvarez *et al.*, (2012). Sin embargo, cabe resaltar que los estudios realizados por dicho autor fueron sobre el destilado final de la fermentación de una cepa de *K. marxianus* y una *S. cerevisiae*, mientras que los aquí presentados son del producto fermentado y aun así se observa una buena producción de las cepas no-*Saccharomyces*, a excepción de la *T. delbruecki* de manera individual que produjo menor cantidad que todas las cepas analizadas. Sin embargo, como lo menciona Lopez-Alvarez *et al.*, (2012) se deberá analizar el producto destilado para obtener mayor compuestos volátiles en concentraciones mayores a las observadas en otras bebidas como el mezcal, vino, whisky o brandy propiciando una mejor calidad organoléptica que los productos obtenidos con cepas de panificación como la que compara por ejemplo Lopez-Alvarez *et al.*, (2012).

De acuerdo a lo reportado por Orlic *et al.* (2007) se conoce que mientras que un alcohol superior no pase de 300 mg/L es considerado positivo su impacto en el aroma deseable de un vino. Sin embargo, si este excediera a 400 mg/L suele ser considerado como un efecto negativo en el producto final (vino). Las cepas LBI-CBG mantuvieron sus valores de este alcohol por debajo de los 300 mg/L, resultando de gran importancia debido a que dicho compuesto resulta ser uno de las más abundantes e incluso suele ser el representante de los alcoholes superiores por el aroma que puede otorgar a la bebida. Por otra parte, las diferencias en las concentraciones de alcoholes superiores nos resulta complicado lograr atribuirlo a algo en específico y puntual, debido a que los estudios en microorganismos de mostos de agave son escasos. El conocimiento acerca de estos organismos es solo lo conocido por los productores, los cuales realizan la fermentación con los microorganismos presentes en el tanque de fermentación o aquellos presentes en las barricas, etc. Sin embargo, debido a este tipo de practicas de elaboración no se conocen con certeza que otros organismos pueden estar involucrados ya que hasta pudieran presentarse algunos no deseables para este proceso (Vera Guzmán *et al.*, 2012).

La producción de diferentes ésteres es de gran importancia por sus características de sabores frutales, se ha visto regulada por el tipo y concentración de los microorganismos presentes en el proceso fermentativo (Vera Guzmán *et al.*, 2012; Lopez-Alvarez *et al.*, 2012), tal como lo reporta Diaz-Montaña *et al.*, 2008 el cual encuentra que durante la fermentación de *Agave tequilana* llevada por *Kloeckera africana* y *K. apiculata* presentaron una mayor producción de acetato de etilo que las concentraciones encontradas por las *S. cerevisiae*, coincidiendo de manera similar con las cepas LBI-CBG, tanto no-*Saccharomyces* como las *S. cerevisiae*.

De manera similar que lo reportado por Díaz-Montaña *et al.* (2008), las cepas de *S. cerevisiae* presenataron mayor producción o concentración de varios compuestos volátiles tales como hexanoato, octanoato y decanoato de etilo en comparación con las no-*Saccharomyces* debido a su baja e incluso nula producción, tal y como lo reportan los mencionados autores para las cepas de *Kloeckera* aisladas de tequila. Mientras que, coincidentemente las cepas no-*Saccharomyces* LBI-CBG resultaron ser buenas productoras de compuestos tales como el fenil etil acetato.

De manera general, se aprecia una variación en la producción del fenil etil acetato cuando comparamos las concentraciones producidas en jugo de uva y mosto de agave, lo cual podría atribuirse, como lo menciona Arrizon *et al.*, (2006), a la dependencia de una mayor producción de alcoholes superiores dependiendo de la cantidad de nitrógeno presente así como los requerimientos específicos de cada cepa involucrada en el proceso fermentativo. Además de contar con la presencia de algunos otros compuestos tales como octanoato y decanoato de etilo también reportados por Lopez-Alvarez *et al.* (2012), y de manera importante resaltando la presencia otros ésteres tales como el butirato de etilo y hexanoato de etilo, entre otros.

Finalmente esta investigación apoya la información reportada por diversos autores como por ejemplo Arrizon *et al.*, (2006) al respecto de que las cepas que han sido aisladas de situaciones estresantes como lo es el proceso de elaboración de bebidas de agave presentan una mejor capacidad de tolerancia a distintos factores ambientales o del proceso de fermentación, corroborado con nuestras cepas estudiadas que previamente fueron seleccionadas por su tolerancia a altas concentraciones de etanol y fructosa.

VIII.9 Propuesta de una metodología para la selección de un inóculo (starter)

El proceso fermentativo para la producción de bebidas alcohólicas suele ser llevado a cabo de manera natural (fermentación espontánea, sin uso de inóculo) por dos o más géneros de levaduras, y que son denominadas de manera global como *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, y las cuales suelen ser consideradas las responsables de la producción de etanol así como de algunos compuestos que producen las características de aroma y sabor de las diversas bebidas. Sin embargo, tradicionalmente la presencia de levaduras no-*Saccharomyces*, debido a la producción de algunos acetatos que en cantidades altas, producen aromas desagradables para las bebidas. Por lo que desde hace ya varios años las industrias alcohólicas han prestado atención en las características positivas que presentan las levaduras del género *Saccharomyces* en la elaboración de bebidas y con ello siendo empleadas como cultivos iniciadores de dichos procesos, haciendo a un lado las no-*Saccharomyces*. Dentro de los últimos años se han observado sin embargo cambios en las características de las diversas materias primas con las que se elaboran las bebidas, observando ya una problemática mayor como sucede con el vino por ejemplo, donde se presentan paros de fermentación debido a la incapacidad de consumir o asimilar la fructosa, lo que propicia una fermentación incompleta y posterior a ello una acidificación de los fermentados. Por lo que en la actualidad la búsqueda y comprensión de nuevas cepas de levaduras capaces de continuar o terminar los procesos fermentativos han resultado ser el objetivo de las industrias de bebidas alcohólicas, resultando ser aquellas no-*Saccharomyces* pues además presentan la capacidad de producir compuestos aromáticos que repercuten positivamente en las bebidas elaboradas. Sin embargo, aun y cuando existen criterios generales para la selección de levaduras a ser empleadas como cultivos iniciadores, existe un número limitado número de cepas de uso comercial en el mercado. Esto resulta en una oportunidad para poder seleccionar aquellas cepas nativas con las características correctas para el proceso fermentativo particular para el cual serán o podrían ser empleadas. Es por tanto que como fruto de esta investigación se proponem criterios de selección de cepas con posible uso dentro de la elaboración de bebidas alcohólicas, tal y como se presenta a continuación (figura 48).

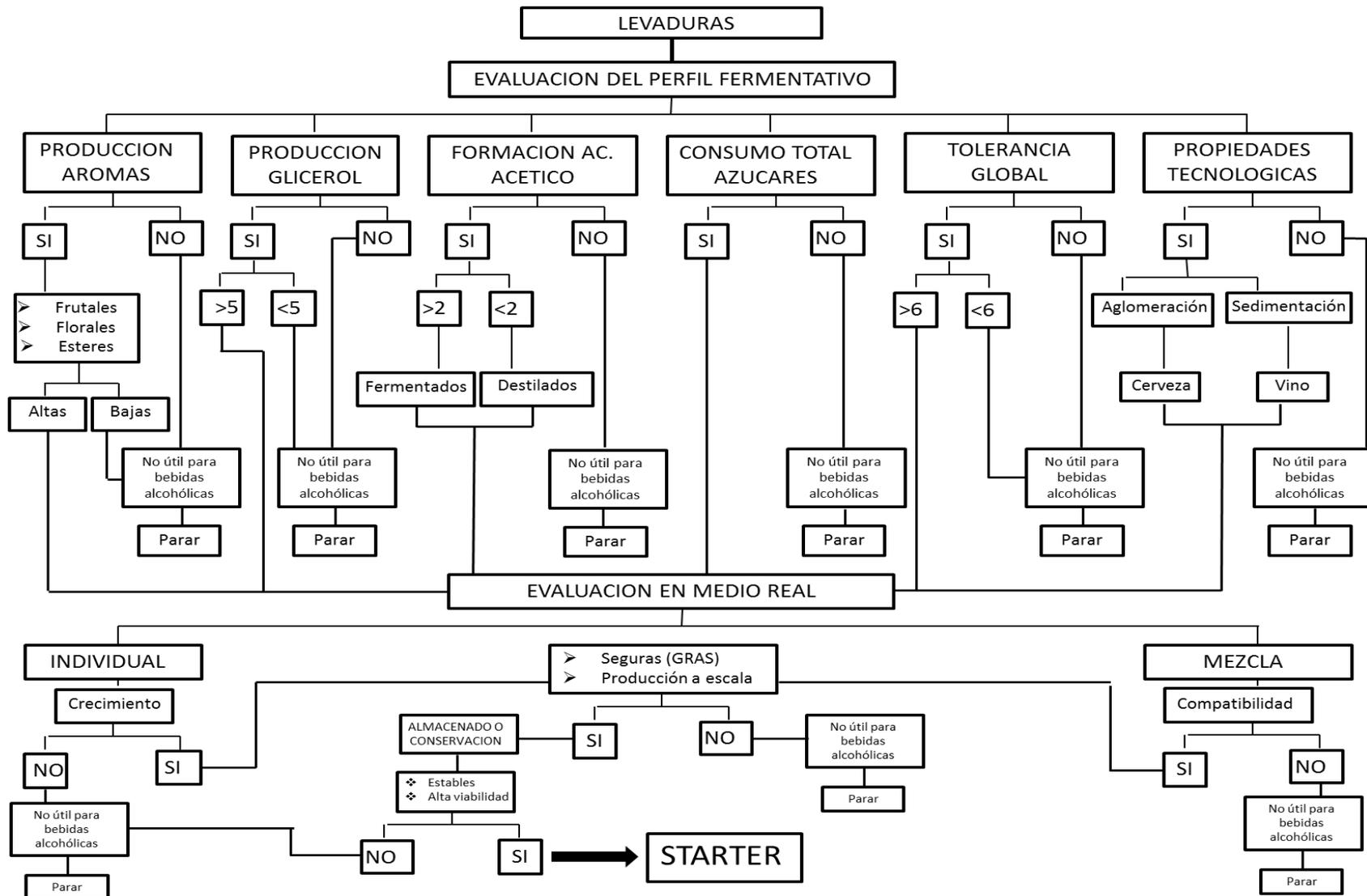


Figura 48. Metodología de selección de levaduras para su empleo en la formulación de un inoculante para la elaboración de bebidas alcohólicas.

La producción de las diferentes bebidas alcohólicas suele ser llevado a cabo por cepas de levaduras selectas. Sin embargo, al emplear una única cepa o especie de levadura, el sabor, aroma o buquet resulta ser más neutral, que el creado por la contribución de una mezcla o distintas especies.

Durante el análisis de las diferentes características de las diversas levaduras de este trabajo, así como el perfil fermentativo, producción, tolerancia, consumos, etc. como algunos criterios de selección, algunos de ellos reportados como importantes por otros autores (Borneman *et al.*, 2009) resultaron en la selección de cepas de gran interés debido a su gran potencial en el uso como cepas en la elaboración de bebidas alcohólicas tanto por las características ya mencionadas como por la importancia en el efecto que pueden propiciar en la calidad organoléptica del producto final, características también observadas por otros autores como Arrizon *et al.*, (2006), Díaz-Montaña *et al.*, (2008) y Lopez-Alvarez *et al.*, (2012).

Las cepas aquí analizadas de la especie *S. cerevisiae* mostraron una mejor capacidad de tolerancia a concentraciones crecientes de etanol en comparación con otras cepas de la misma especie reportado por otros autores (Belloch *et al.*, 2008) que mostraron una tolerancia máxima del 10% mientras que algunas de las cepas aquí estudiadas tuvieron una máxima tolerancia al 15% de etanol, mostrando un perfil de tolerancia similar a lo reportado por Mehdikhani *et al* (2011). Mientras que Salvadó *et al* (2011) observaron, al evaluar 6 distintas cepas de vino, el efecto que tiene el etanol a concentraciones crecientes, notando que también fue a partir de 16 % de concentración de etanol que ya no se observó crecimiento alguno de las cepas analizadas. Observando de manera coincidente valores más altos de tolerancia que los alcanzados por cepas industriales o de uso comercial como lo fue el caso de la cepa Fermichamp, tal y como se ha reportado en otras investigaciones tales como la de Bravim *et al* (2010). Toda esta información fortalece la selección de la tolerancia al etanol como un criterio de gran importancia en la selección de cepas con uso potencial en la elaboración de bebidas.

Finalmente nuestros resultados fortalecen la información ya reportada por diversos autores como Arrizon *et al.*, (2006) al respecto de las cepas aisladas de bebidas de agave, que son fermentaciones muy estresantes, generalmente estas levaduras presentan mejor capacidad de tolerancia a distintos factores ambientales o del proceso de fermentación, tal como se observa para un grupo de cepas aquí estudiadas, en base a los análisis de su tolerancia a altas concentraciones de etanol y fructosa en el medio de fermentación así como la alta y diversa producción de compuestos volátiles, dependiendo del medio de fermentación, resultan ser cepas de gran interés para su posible aplicación industrial futura en la elaboración de las diversas bebidas alcohólicas.

IX. CONCLUSIONES

De forma general, los valores de las diferentes pruebas de cuantificación de la tolerancia al estrés mostraron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en todos los tipos de estrés cuantificados. Así, los análisis estadísticos corroboran las claras diferencias y agrupamiento en base a características de crecimiento y productividad que se observan para las cepas LBI-CBG. Así pues, las cepas de *S. cerevisiae* son las que ofrecen en las primeras pruebas iniciales los porcentajes más altos de tolerancia de todas las cepas analizadas. Por su parte, la cepa control (Fermichamp) tiene una alta (aunque no extrema) tolerancia a la prueba de concentraciones crecientes de fructosa (hasta el 50% de fructosa), relacionado probablemente a su origen de aislamiento durante la producción de vino. La producción de compuestos volátiles aromáticos difiere entre especies y cepa de levadura empleada en el proceso fermentativo. Se identificaron 18 compuestos volátiles principales (> 90%) obtenidos por extracción en fase sólida (SPME) de las fermentaciones individuales de 26 cepas aisladas del mezcal tamaulipeco. Las familias de compuestos con mayor presencia son los alcoholes y los ésteres. Se encontró una gran variabilidad en la concentración de cada uno de los compuestos dependiendo de cada cepa o especie aquí analizada.

Por otra parte, la diversa capacidad de asimilación de azúcares así como los rendimientos individuales de metabolitos primarios así como de compuestos volátiles de cada cepa en particular sugiere un alto potencial en el uso de estas levaduras como inoculantes en la producción de bebidas alcohólicas, probándose en este trabajo dos bebidas de diferente origen y forma de producción, como lo son el vino y el tequila. Sin embargo, para otras fermentaciones específicas será necesaria una valoración de las características tecnológicamente deseables en la bebida en particular para una mejor selección en base al sustrato de la fermentación y cepa de levadura a emplear. Las cepas aquí descritas y analizadas proporcionan un indicativo directo de la influencia de éstas en el proceso fermentativo que repercutirá en la composición final de los diversos compuestos volátiles, dando con ello un enfoque alternativo para su uso en la fermentación de vino y/o tequila, como se ha sido reportado.

En conclusión, las características de todas y cada una de las cepas aquí analizadas pueden ser tomadas en cuenta de acuerdo al esquema de selección propuesto para validar su uso en condiciones reales de industria de producción de bebidas alcohólicas, y comparar su desempeño con los inoculantes que actualmente se emplean, que en muchos casos son levaduras de panificación o remanentes no caracterizados de la fermentación anterior, lo que hace variar las características del fermentado de lote a lote. Los resultados y la propuesta de mezclas específicas de cepas aquí analizadas podrían contribuir en el establecimiento de controles de producción más estrictos en algunas de estas industrias.

X. Perspectivas

Las bebidas alcohólicas, por ser algunas elaboradas de manera artesanal, requieren de un estudio más profundo acerca de las diferentes especies de levaduras así como de los otros microorganismos que se encuentran presentes durante cada una de las etapas de fermentación, ya que si bien en el presente estudio han sido analizadas diversas especies de levaduras, es necesario analizar el conjunto de todas las especies de levaduras que se pueden presentar en este tipo de procesos.

Es recomendable estudiar por cromatografía de gases nuevamente todos los metabolitos secundarios que se sabe están presentes en los diferentes mostos aquí analizados para el caso de bebidas a base de agave un análisis de los destilados y en el caso de vino de su segunda fermentación con las bacterias malolácticas para verificar y ampliar lo ya observado en esta investigación, haciendo seguimiento de ésteres y ácidos orgánicos que son producidos tanto por levaduras como por bacterias, los ácidos acético, láctico, succínico, málico y cítrico, así como también estudiar los alcoholes superiores que pueden presentarse en las etapas iniciales de la fermentación, los cuales se sabe se generan a partir de los restos vegetales y que tienen un fuerte impacto en las características organolépticas del producto final, así como conocer la influencia de otros compuestos químicos que se sabe están presentes en los sustratos naturales (compuestos fenólicos y azufrados, por ejemplo) que también son relevantes para seleccionar a una cepa con un alto grado de tolerancia y buena productividad de etanol y compuestos volátiles secundarios.

Es deseable lograr estandarizar de manera práctica y amigable la metodología de selección de una cepa específica para su implementación como iniciador (*starter*) para la producción de una bebida alcohólica, ya que debido a la caracterización microbiológica de los diversos medios empleados, dependerá de las características organolépticas deseadas en el producto así para poder pre-seleccionar las levaduras que compartan o puedan proveer dichas características a base de su metabolismo, el cual requiere ser estudiado a mayor profundidad, así como los fenómenos biológicos que se presentan al estar dos o más levaduras en contacto durante su uso en un inóculo mixto.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel FW, Fadil M, Nigam P, Banat IM. (1999). Isolation of thermotolerant ethanologenic yeasts and use of selected strains in industrial scale fermentation in an egyptian distillery. *Biotechnology and Bioengineering* 68:5.
- Aguilar-Uscanga B, Arrizon J, Ramírez J, Solís-Pacheco J. (2007). Effect of *Agave tequilana* juice on cell wall polysaccharides of three *Saccharomyces cerevisiae* strains from different origins. *Antonie van Leeuwenhoek* 91:151-157.
- Andorra I., Berradre M., Rozes N., Mas A., Guillamon J. M. Esteve-Zarzoso B. (2010). Effect of pure and mixed culture of the main wine yeast species on grape must fermentations. *Eur Food Research Technology*. 231: 215-224.
- Andorra I., Berradre M., Mas A., Esteve-Zarzoso B., Guillamon J. M. (2012). Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. *LWT- Food Science and Technology*. 49: 8-13.
- Angers B., Castonguay E., Massicotte R. (2010). Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: how to deal with unpredictable conditions until the next generation and after. *Molecular Ecology* 19: 1283-1295.
- Arellano M., Gschaedler A., Alcazar M. Major volatile compounds analysis produced from mezcal fermentation using gas chromatography equipped headspace (GC-MS). *In: Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications*. Bekir Salih and Ömür Çelikbıçak (Editors), InTech Publisher, ISBN 978-953-51-0127-7, 358 pages
- Arellano M., Pelayo C., Remírez J., Rodríguez I. (2008). Characterization of kinetic parameters and formation of volatile compounds during the tequila fermentation by wild yeasts isolated from agave juice. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35 (8): 835-841.
- Arratia Mireles J.M. (2010). Diversidad genética de levaduras involucradas en la fermentación del mezcal Tamaulipeco. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología. Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional. Reynosa. Tamaulipas, México. 103 p.
- Arrizon 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.
- Arrizon J, Fiore C, Acosta G, Romano P, Gschaedler A. (2006). Fermentation behaviour and volatile compound production by agave and grape must yeasts in high sugar *Agave tequilana* and grape must fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek* 89: 181-189.
- Arroyo-López F.N., Querol A., Barrio E. (2009). Application of substrate inhibition model to estimate the effect of fructose concentration on the growth of diverse *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36: 663-669.
- Baleiras Couto M.M., Reizinho R.G., Duarte F.L. (2005). Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-*Saccharomyces* yeast present during red wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 102: 49-56.
- Bhat P. J., Iyer R. S. (2009). Epigenetics of the yeast galactose genetic switch. *Journal of Bioscience* 34(4):513-522.
- Bannam T.L, Johanesen P.A, Salvado Ch.L, Pidot S.J, Farrow K.A, Rood J.I. (2004). The Clostridium perfringens TetA(P) efflux protein contains a functional variant of the Motif A region found in major facilitator super family transport proteins. *Microbiology* 150:127-134.

- Baruffini E., Goffrini P., Donnini C., Lodi T. (2006). Galactose transport in *Kluyveromyces lactis*: major role of the glucose permease Hgt1. FEMS yeast research. 6(8): 1235-1242.
- Barros Lopes, M., Rehman, A., Gockowiak, H., Heinrich, A.J., Langridge, P. & Henschke A.P. (2000). Fermentation properties of a wine yeast over-expressing the *Saccharomyces cerevisiae* glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene (GPD2). Australian Journal of Grape and Wine Research, 6, 208–215.
- Bauer F.F, Pretorius I.S. (2000). Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine. A review. South African Journal of Enology and Viticulture 21:27-51.
- Belloch C, Orlic S, Barrio E, Querol A. (2008). Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. International Journal of Food Microbiology 122 (1-2): 188-195.
- Berthels N. J., Cordero Otero R. R., Bauer F. F., Thevelein J. M., Pretorius I.S. (2004). Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. FEMS yeast research. 4(7): 683-689.
- Berthels N. J., Cordero Otero R. R., Bauer F., Pretorius I. S., Thevelein J. M. (2008). Correlation between glucose/fructose discrepancy and hexokinase kinetic properties in different *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. Applied Microbiology and Biotechnology 77: 1083-1091.
- Berry D.R, Watson D.C. (1987). Production of organoleptic compounds. In: Yeast Biotechnology. Berry D.R, Russell I. and Stewart, G.G. (Eds). Yeast Biotechnology. Allen & Unwin. 345-364.
- Biosca Josep A., Fernandez M. Rosario, Larroy Carolina, González Eva y Pares Xavier. (2002). Descripción y Funciones Metabolicas de las Alcohol deshidrogenasas de *Saccharomyces cerevisiae*. Algunos aspectos de ingeniería metabólica aplicados a la fabricación de la cerveza. Cerveza y Malta XXXIV (3) 195: 27-38.
- Bishop A. L., Rab F. A., Summer R. Avery S. V. (2007). Phenotypic heterogeneity can enhance rare-cell survival in "stress-sensitive" yeast population. Molecular Microbiology 63(2):507-520.
- Blomberg Lennart (2001). Tequila, Mezcal y Pulque, Editorial Diana, Mexico, 2001. Págs. 243 y 244.
- Borneman A.R., Chambers P.J., Pretorius I.S. Chapter 22: Systems biology as a platform for wine yeast strain development. In: Biology of microorganisms in grapes, in must and in wine. Helmut König, Gottfried Uden, Jürgen Fröhlich (Editors). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (Germany). Pp 395-414, 2009
- Bravim F., Palhano F.L., Fernandes A.A.R., Fernandes P.M.B. (2010). Biotechnological properties of distillery and laboratory yeasts in response to industrial stresses. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 37: 1071-1079.
- Cáceres-Farfán M, Lappe P, Larqué-Saavedra A, Magdub-Méndez A, Barahona-Pérez L.(2008). Ethanol production from henequen (*Agave fourcroydes* Lem.) juice and molasses by a mixture of two yeasts. Bioresource Technology. 99,18.
- Campbell I. (2003). Microbiological aspects of brewing. Brewing microbiology (3rd edition), Kluyver Academic, Plenum Publishers, New York, USA, pp. 1-16.
- Cañal M.J., Fraga M., Berdasco M., Diego L.B., Esteller M. and Rodríguez R. (2003) Epigenetics, the role of DNA methylation. Currents Topics in Plant Biology Vol. 4.
- Capece A., Salzano G., Romano P. (2003). Molecular typing technique as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. International Journal Food Microbiology 84, 33-39.
- Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES y Young RA. (2001). Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. Mol Biol Cell 12, 323-337.
- Cardona F, Carrasco P, Pérez-Ortín J.E, Del Olmo M, Aranda A. (2007). A novel approach for the improvement of stress resistance in wine yeasts. International Journal of Food Microbiology 114:83-91.

- Casey G.P, Magnus C.A, Ingledew W.M. (1984). High gravity brewing: Effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production. *Applied Environmental Microbiology*. 48 (3): 639-646.
- Carrasco P, Querol A, Del Olmo M. (2001). Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Archives of Microbiology*. 175:450-457.
- Cheney A.L., Marbach E.P. (1962). Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry*. 8, 130-132.
- Cocolin L. Bisson L.F., Mills D.A. (2000). Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentation. *FEMS Microbiology*. 189:81-87.
- Colunga-García M. Zizumbo-Villarreal D. (2007). Tequila and other Agave spirits from west-central México: current germplasm diversity, conservation and origin. *Biodiversity and Conservation* 16:1653-1667.
- Cavazzas A., Poznanski E., Guzzon E. (2010). Must treatments and wild yeast growth before and during alcoholic fermentation. *Annals of Microbiology*. 9: 1-8.
- De la Torre González F.J. (2010). Caracterización cinético-molecular de microorganismos en mostos de mezcal. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología. Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional. Reynosa. Tamaulipas, México. 128 pp.
- De la Torre-González F.J, Narváez-Zapata J.A, López-y-López V.E, Larralde-Corona C.P. (2016). Ethanol tolerance is decreased by fructose in *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. *LWT Food Science and Technology* 67, 1-7. DOI 10.1016/j.lwt.2015.11.024
- De León-Rodríguez A, González - Hernández L, Barba de la Rosa A.P, Escalante Minakata P, López G.M.(2006). Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave salmiana*. *Journal Agricultural of Food Chemistry*. 54: 1337-1341.
- De León-Rodríguez A, Escalante Minakata P, Jiménez-García M.I., Ordoñez-Acevedo L.G., Flores Flores J.L., Barba de la Rosa A.P. (2008). Characterization of volatile compounds from ethnic *Agave* alcoholic beverages by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Food Technology and Biotechnology*. 46 (4): 448-455.
- De Barros Lopes M., Rainieri S., Henschke P.A., Langridge P. (1999) AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *Int. J. Syst. Bacteriol.*49: 915-924.
- Díaz-Montañó D.M., Marie D., Estarrón M., Strehaiano P. (2008). Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from *Agave tequilana* Weber juice. *Enzyme and Microbial Technology* 42: 608–616.
- Durán Hernández D., Ruiz Santiago A., Rodríguez Pascual P. (2004). Aislamiento e identificación de especies microbianas aisladas del mosto de fermentación del mezcal. IV Encuentro Nacional de Biotecnología – IPN, Red de Biotecnología del IPN.
- Erasmus D. J., van der Merwe G. K., van Vuuren Hennie J.J. (2003). Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Research*. 375-399.
- Escalante M.P, González H.L, Barba de la Rosa A.P, De León R. A.(2006). El mezcal, una mezcla natural de alcoholes y feromonas. Junio –Julio 2006. Alfa Editores Técnicos. Bebidas Mexicanas. <http://www.alfaeditores.com>.
- Escalante-Minakata P., Blaschek H. P., Barba de la Rosa A. P., Santos L., De León-Rodríguez A. (2008). Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of *Agave salmiana*. *Letters in Applied Microbiology* 48: 626-630.

- Esteve-Zarzoso B, Peris-Torán M.J, García Maizquez E, Uruburu F, Querol A. (2001). Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of Sherry wines. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2056-2061.
- Estrada A.R., Cruz-Guerrero A.E., Lappe P., Ulloa M., García Garibay M., Gómez Ruiz L. (2001) Isolation and identification of killer yeasts from *Agave* sap (aguamiel) and pulque. *World J Microbiol Biotech* 17 7: 557–560.
- Estruch F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiology Reviews*. 24(4):469-86.
- Ferrer M.A, Riera A, Jiménez Ch.J, Herrero P, Moreno F, Gómez F.A. (2004). A glucose response element from the *Saccharomyces cerevisiae* hexose transporter HXT1 gene is sensitive to glucose in human fibroblasts. *Journal of Molecular Biology*. 338:657-667.
- Fleet G. H., Lafon Lafourcade S., Ribereau Gayon P. (1984). Evolution of yeast and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 48 (5): 1034-1038.
- Fleet G.H, Heard G.M. (1993). Yeasts-growth during fermentation. In: G.H. Fleet, Editor, *Wine microbiology and biotechnology*, Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland. pp. 42–43.
- Fleet G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavor. *International Journal of Food Microbiology* 86: 11-22.
- Flick M.K, Spielewoy N, Kalashnikova I.T, Guaderrama M, Zhu Q, Chang H.C, Wittenberg C. (2003). Grr1-dependent inactivation of Mth1 mediates glucose-induced dissociation of Rgt1 from HXT gene promoters. *Molecular Biology of the Cell*. 14:3230-3241.
- Flores Berrios E.P., Alba González J.F., Arrizon Gaviño J.P., Romano P., Capece A. y Gschaedler Mathis A. (2005). The uses of AFLP for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity between yeast isolated from Mexican agave-distilled beverages and from grape musts. *The Society for Applied Microbiology* 41: 147-152.
- Folch-Mallol J. L., Garay-Arroyo A., Lledías F., Covarrubias Robles A. A. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol. 46(1): 22-46.
- Gasch A.P, Spellman P.T, Kao C.M, Carmel-Harel O, Eisen M.B, Storz G, Botstein D, Brown P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of Cell*. 11:4241-4257.
- Gschaedler M., Cordova C.J., Diaz M.D., Herrera L.J., Arellano P.M., Arrizon G.J., Pinal Z.L. (2004). *Ciencia y Tecnología del Tequila Avances y Perspectivas*. Mexico, CIATEJ.
- Guerra, J.B., Araujo, R.A.C., Pataro, C., Franco, G.R., Moreira, E.S.A., Mendonça-Hagler, L.C., Rosa, C.A. (2001). Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Letters in Applied Microbiology*.33: 106-111.
- González-Fernández, C., Santos, E.M., Rovira, J., Jaime, I. (2006). The effect of sugar concentration and starter culture on instrumental and sensory textural properties of chorizo- Spanish dry-cured sausage. *Meat Science*, 74: 467-475.
- Guillaume C., Delobel P., Sablayrolles J. M., Blondin B. (2007). Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* a muted HXT3 allele enhances fructose fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 2432-2439.
- Gschaedler Mathis A, Ramírez Cordova J, Diaz Montañón D, Herrera López H, Arellano Plaza M, Arrizon Gaviño J & Pinal Zuazo L (2004) Fermentación: etapa clave en la elaboración del tequila. *Ciencia y Tecnología del Tequila, Avances y Perspectivas* (Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica y Diseño del Estado de Jalisco, ed), pp. 32–120. CIATEJ, Guadalajara, México.

- Halliwell B., Gutteridge J. M. (1999). Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, London.
- Hazelwood L.A., Daran J.-, van Maris A J. A., Pronk J.T. , Dickinson R.. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. Applied and Environmental Microbiology. 74 (8): 2259-2266.
- Hernández Mota E.G. (2010). Análisis metagenómico y fisicoquímico de mostos de mezcal Tamaulipeco. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología. Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional. Reynosa. Tamaulipas, México. 68p.
- Heun P., Laroche T., Raghuraman M.K., Gasser S.M. (2001) The positioning and dynamics of origins of replication in the budding yeast nucleus. *J. Cell Biol.*, 152: 385-400.
- Hirai T, Heymann J.A.W, Maloney P.C, Subramaniam S. (2002). Structural model for 12-Helix transporters belonging to the major facilitator super family. *Journal of Bacteriology*. 185 (5): 1712–1718.
- Hirasawa T., Furusawa C., Shimizu. (2010). *Saccharomyces cerevisiae* and DNA microarray analyses: what did we learn from it for a better understanding and exploitation of yeast biotechnology ?. *Applied Microbiology*. 87: 391-400.
- Hittinger C T , Carroll S B 2007 Gene duplication and the adaptive evolution of a classic genetic switch; *Nature (London)* 449 677–682.
- Hohmann S. (1997). Shaping up: the response of yeast to osmotic stress. En: “Yeast Stress Responses”. Hohmann S and Mager WH (eds). Springer. New York, N.Y. pp101-146.
- Hohmann S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:300-372.
- Hohmann, S. (2003). The osmotic stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast stress responses*. Hohmann and W. Mager. Berlin, Heidelberg Germany, Springer: 121-200.
- Jacques -Hernández C, Herrera P.O, Ramírez De L.J.A. (2004). El maguey mezcalero y la agroindustria del mezcal en Tamaulipas. IV Simposium Internacional sobre Agavaceae y Nolinaceae, AMC-CICY-CONAGAVE-UNAM-Tequila Herradura, Mérida, Yuc., 3-5 de Marzo.
- Jacques H.C., López H.A.I., Anaya G.C.L., Sifuentes R.A.M., Taillandier P., Ramón P. F. Identificación (ID) de Levaduras Aisladas de Mostos de Mezcal: ID Morfológica-Bioquímica (M-B) vs Molecular (Mol). En: Chanona J., Ordorica C., Mulet A., Alamilla L., Sosa M.E., Parada E., Welti J., Gutiérrez G. Editores. “Hacia una visión integrada de la ingeniería de alimentos” Libro de artículos en extenso del V Congreso Ibero-Americano de Ingeniería de Alimentos; 2006 Sep 4-7.
- Jiang B., Zhang Z. (2010). Volatile compounds of young wines from cabernet sauvignon, cabernet gernischet and chardonnay varieties grown in the Loess plateau region of China. *Molecules* 15: 9184-9196.
- Kuge S., Arita M., Murayama A., Maeta K., Izawa S., Inoue Y., Nomoto A. (2001). Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol Cell Biol* 21: 6139-6150.
- Kurdistani S. K., Grunstein M. (2003). Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature* 4:276-284.
- Lachenmeier D.W, Sohnius E.M, Rainer, Lopez M.G. (2006). Quantification of selected volatile constituents and anions in Mexican agave spirits (tequila, mezcal, sotol, bacanora). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:3911-3915.
- Landry C. R., Townsend J. P., Hartl D.L., Cavalieri D. (2006). Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Ecology* 15:575-591.

- Lappe P., Moreno Terrazas R., Arrizón Gaviño J., Herrera Suárez T., García Mendoza A., Gshaedler Mathis A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. Wiley InterScience. 1-18.
- Leandro M.J., Sychrová H., Prista C., Loureiro-Dias M. (2011). The osmotolerant fructophilic yeast *Zygosaccharomyces rouxii* employs two plasma-membrane fructose uptake systems belonging to a new family of yeast sugar transporters. *Microbiology* 157: 601-608.
- Leão C, van Uden N. (1985). Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* 24: 2601-2604.
- Levy S. F., Siegal M. L. (2008). Networks hubs buffer environmental variation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biology* 6(11): 2588-2604.
- Lopez-Alvarez A., Diaz-Perez A.L., Sosa-Aguirre C., Macias-Rodriguez L., Campos-Garcia 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. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 113(5): 614-618.
- Luyten K., Riou C., Blondin B. (2002). The hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* play different roles during enological fermentation. *Wiley InterScience* 19: 713-726.
- Mancilla-Margalli N., López M (2006). Water soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Desyilirion* species. *J. Agri Food Chem.* 54: 7832-7839.
- Marks V.D., Ho Sui S.J., Erasmus D., Van de Merwe G.K., Brumm J., Wasserman W.W., Bryan J., Van Vuuren H.J.J. (2008). Dynamics of the transcriptome during wine fermentation reveals a novel fermentations stress response. *FEMS Yeast research* 8(1): 35-52.
- Martorell, P., Stratford, M., Steels, H., Fernández-Espinar, M.T., Querol, A. (2007). Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *International Journal of Food Microbiology* 114, 234–242.
- Mehdikhani P., Bari M.R., Hovsepyan H. (2011). Screening of *Saccharomyces cerevisiae* for high tolerance of ethanol concentration and temperature. *African Journal of Microbiology Research* 5(18): 2654-2660.
- Mesas, J. M., Alegre, M. T. (1999). The role of the microorganism in winemaking, *Ciencia y Tecnología Alimentarias* 2 (4): 174-183.
- Molina-Guerrero A, Botello-Álvarez J.E, Estrada-Baltazar A, Navarrete-Bolaños J.L, Jiménez-Islas H, Cárdenas-Manríquez M, Rico-Martínez R. (2007). Compuestos volátiles en el mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 6(1):41-50.
- Montrocher R., Verner M.C., Briolay J., Gautier C., Marmeisse R. (1998). Phylogenetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 295-303.
- Morales Carrillo Nicolás, Escobar Moreno Darío A., Paredes Hernández Efraín. (2007). Estudio sobre el impacto que las modificaciones a la NOM-070 traerán a la industria del mezcal. Universidad Autónoma de Chapingo-CRUCEN, Centro Regional Universitario Centro Norte.
- Nadal D., Colomer B., Piña B. (1996). Molecular polymorphism distribution in phenotypically distinct populations of wine yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (6): 1944-1950.
- Nandra K.S., Bathia I.S. (1980). *In vivo* biosynthesis of glycofructans in *Agave americana*. *Phytochemistry* 19: 965-966.

- Naumov G.I. (1996). Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology 17:295-302.
- Narváez-Zapata J.A., Rojas-Herrera R.A., Rodríguez-Luna I.C., Larralde-Corona C.P. (2010). Culture-independent analysis of lactic acid bacteria diversity associated with mezcal fermentation. Current Microbiology 61(5): 444-450.
- Navarrete-Bolaños, J.L*, Serrato-Joya, O., Botello-Alvarez, E. Jimenez-Islas, H., Cardenas-Manriquez, M., Conde-Barajas, E., Rico-Martínez, R. (2007). Analyzing microbial consortia for biotechnological processes design. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology.
- Nissen P, Nielsen D, Arneborg N. (2003). *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact mediated mechanism. Yeast 20:331–341.
- Norbeck J y Blomberg A. (1998). Amino acid uptake is strongly affected during exponential growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 0.7 M NaCl medium. FEMS Microbiol Lett 158:121-126.
- Orlic S., Redzepovic S., Jeromel A., Herjavec S., Iacumin L. (2007). Influence of indigenous *Saccharomyces paradoxus* strains on chardonnay wine fermentation aroma. International Journal of Food Science and Technology. 42: 92-101.
- Ostergaard S., Olsson L., Nielsen J. (2000). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and Molecular Biology.64(1): 34-50.
- Oliva-Hernández A.A., Taillandier P., Reséndez-Pérez D., Narváez-Zapata J.A., Larralde-Corona C.P. (2013). The effect of hexose ratios on metabolite production in *Saccharomyces cerevisiae* strains obtained from the spontaneous fermentation of mezcal. Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology 103: 833- 843.
- Ozcan S, Jhonston M. (1999). Function and regulation of yeast hexose transporters. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 554–569.
- Páez J., Córdova E., Soto Ó., Barrio E., Belloch C., Rutiaga-Quiñones O.M. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* with robust responses to fermentation stresses isolated from the alcoholic fermentation of *Agave duranguensis* musts. African Journal of Microbiology Research 5(8): 865-871.
- Parsons J.R, Darling J.A. (2000). Maguey (*Agave spp.*) utilization in Mesoamerican civilization: a case for pre-columbian pastoralism. Bolétin de la Sociedad Botánica de México. 66:81–91.
- Prado-Ramírez R, Gonzáles-Alvarez V, Pelayo-Ortiz C, Casillas N, Estarrón M & Gómez-Hernández H (2005) The role of distillation on the quality of tequila. Int J Food Sci Technol 40 0: 701–708.
- Pérez C.M, Briones P.A, Ubeda I.J, Martín A.P.(1999). Characteristics of wines fermented with different *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from the La Mancha region. Food Microbiology 16:563-573.
- Perez Marc, Luyten Kattie, Michel Remy, Riou Christine, Blondin Bruno. (2005). Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* hexose carrier expression during wine fermentation: both low- and high-affinity Hxt transporters are expressed. FEMS Yeast Research. 5:p. 351-361.
- Perez-Navado F, Albergaria H, Hogg T, Girio F (2006) Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. Int J Food Microbiol 108:336–345.
- Perpète P., Van Cutsem P., Boutte C., Colson-Corbisier A.M., Collin S. (2001). Amplified Fragment-Length Polymorphism, a New Method for the Analysis of Brewer's Yeast DNA Polymorphism. Journal of American Society of Brewing Chemist 59(4): 195-200.
- Pinal L.E, Cedeño M, Gutiérrez H, Alvarez-Jacobs J. 1997) Fermentation parameters influencing higher alcohol production in the tequila process. Biotechnology Letters 19:1. Pp. 45-47.

- Pina C., Gonçalves P., Prista C., Loureiro-Dias M.C. (2004a). Fzf1, a new transporter specific for fructose from *Zygosaccharomyces bailii*. *Microbiology* 150, 2429-2433.
- Pina C., Couto J.A., Hogg T. (2004b). Inferring ethanol tolerance of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts by progressive inactivation. *Biotechnology Letters* 26: 1521-1527.
- Pina C., Santos C., Couto J.A., Hogg T. (2004c). Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* – influence of different culture conditions. *Food Microbiology* 21: 439-447.
- Polsinelli M, Romano P, Suzzi G, Mortimer R. (1996). Multiple strains of *Saccharomyces cerevisiae* on a single grape vine. *Letters in Applied Microbiology*, 23:1 10-1 14.
- Posas F, Chambers JR, Heyman JA, Hoeffler JP, De Nadal E y Arino J. (2000). The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem* 275:17249-17255.
- Prescott C, Dunn G. 1962. Las levaduras. En: *Microbiología Industrial*; ed. Aguilar- Madrid, España. Pp. 45-47.
- Pretorius, I.S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675-729.
- Pretorius I.S. (2001). Gene technology in winemaking: New approaches to an ancient Art. *Institute for Wine Biotechnology, University of Stellenbosch. Agriculture Conspectus Scientificus*, 66(1): 27-47.
- Puig S, Pérez-Ortín J.E. (2000). Stress response and expression patterns in wine fermentations of yeast genes induced at the diauxic shift. *Yeast* 16. Pp. 139-148.
- Querol A, Jiménez M, Huerta T. (1990). Microbiological and enological parameters during fermentation of musts from poor and normal grape-harvest in the region of Alicante (Spain). *Journal of Food Science*. 55: 1603-1606.
- Querol A. (2001). Modificación genética de levaduras vínicas. *El vino en la alimentación y la salud: Memorias del IV Encuentros de Primavera de la Universidad de Cádiz en el Puerto de Santa María, España*. Pp. 83-88
- Ramírez JF, Sánchez-Marroquín A, Álvarez MM & Valyasebi R (2004) *Industrialization of Mexican pulque. Industrialization of Indigenous fermented foods*, 2nd edn (Steinkraus K, ed), pp. 547–586. Marcel Dekker, New York.
- Reifenberger E., Boles E., Ciriacy M. (1997). Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression . *Eur. J. Biochem*. 245, 324-333.
- Rep M, Krantz M, Thevelein JM y Hohmann S. (2000). The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. *Hot1p* and *Msn2p/Msn4p* are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem* 275:8290-8300.
- Rolland F, Winderickx J, Thevelein J.M. (2001). Glucose sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochemical Sciences* 26: 310–317.
- Romero M. P., Casp A., Carrasco J. M. (1986). Determinación de componentes volátiles en vinos. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, 26(3): 338-348.
- Saier H.M. (2000). Micro review families of transmembrane sugar transport proteins. *Molecular Microbiology* 35(4):699-710.
- Salgueiro S. P., Sa-Correia I., Novais J. M. (1988). Ethanol-induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. *Applied and Environmental Microbiology*. 54 (4): 903-909.
- Salmon J.M. (2006). Interactions between yeast, oxygen and polyphenols during alcoholic fermentations: Practical implications. *Lebensmittel Wissenschaft Technologie Food Science and Technology*. 39:959-965.

- Saloheimo A, Rauta J, Stasyk O.V, Sibirny A.A, Penttilä M, Ruohonen L. (2007). Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74:1041-1052.
- Salvadó Z., Arroyo-López F.N., Barrio E., Querol A., Guillamón J.M. (2011). Quantifying the individual effects of ethanol and temperature on the fitness advantage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology* 28: 1155-1161.
- Sánchez L.A. (1985). Plan de Desarrollo de la Agroindustria Mezcalera en el Estado de Oaxaca. ITO. Oaxaca, México. Pp. 97-123.
- Sánchez-Marroquin A, Hope P.H. (1953). Agave juice fermentation and chemical composition studies of some species, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 3: 146-249.
- Santos J., Sousa M.J., Cardoso H., Inácio J., Silva S., Spencer-Martins I., Leão C. (2008). Ethanol tolerance of sugar transport, and the rectification of stuck wine fermentations. *Microbiology* 154: 422-430.
- SECOFI (2005) NOM-006-SCFI-2005. Bebidas Alcohólicas–Tequila, Especificaciones. Norma Oficial Mexicana Diario Oficial 6 de Enero, Mexico.
- Serra A, Strehaiano P, Taillander P. (2006). Influence of temperature and pH on *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* growth; impact of wine yeast interspecific hybridization on these parameters. *Food Microbiology* 95-100.
- Serrano R., Delafuente G. (1974). Regulatory properties of the constitutive hexose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem* 5: 161-171.
- Suarez Valles B, Pando Bedriñana R, Gonzalez Garcia A, Querol Simon A. (2006). Molecular genetic study of natural strains of *Saccharomyces* isolated from Asturian cider fermentations. *Journal of Applied Microbiology* 1364-5072.
- Sujaya I.N., Antara N.S., Sone T., Tamura Y., Aryanta W.R., Yokota A., Asano K., Tomita F. (2004). Identification and characterization of yeasts in brem, a traditional Balinese rice wine. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20: 143–150.
- Taillander P, Portugal F, Fuster A, Strehaiho P. (2006). Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeast for high sugar content. *Food Microbiology* 24: 95-100.
- Terán S.U, Santiago-Rivera L, Vera-Guzmán A, Bautista P.B, López-Pérez M.G, Santiago- García P. (2002). Estudio comparativo de la fermentación natural e inducida del mosto de agave (*Agave angustifolia* Haw), en la elaboración tradicional del mezcal. *Memorias del Segundo Foro de la Agroindustria del Mezcal*. Oaxaca, Oaxaca.
- Theres Hauser M., Aufsatz W., Jonak C., Luschnig C. (2011). Transgenerational epigenetic inheritance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 00318, 1-10.
- Tirosh I., Wong K. H., Barkai N., Struhl K. (2011). Extensive divergence of yeast stress responses through transitions between induced and constitutive activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(40): 16693-16698.
- Tofalo R., Chaves-López C., Di Fabio F., Schirone M., Felis G.E., Torriani S., Paparella A., Suzzi G. (2009). Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. *International Journal of Food Microbiology* 130: 179-187.
- Tofalo R., Schirone M., Telera G. C., Manetta A. C., Corsetti A., Suzzi G. (2010). Influence of organic viticulture on non-*Saccharomyces* wine yeast populations. *Annals of Microbiology*. 9: 1-10.

- Toledano M. B., Delaunay A., Biteau B., Spector D., Azevedo D. (2003). Oxidative stress responses in yeast. Hohmann S (ed) Yeast stress responses. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 241-304.
- Traven A, Jelicic B., Sopta M. (2006). Yeast GAL4: A transcriptional paradigm revisited; EMBO Reports 7 496–499.
- Tronchoni J., Gamero A., Arroyo-López F. N., Barrio E., Querol A. (2009). Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Sacharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. International Journal of Food Microbiology 134: 237-243.
- Vera Guzmán A.M, Santiago García P.A, López G.M. (2009). Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de mezcal de *Agave angustifolia* y *Agave potatorum*. Revista Fitotecnica Mexicana 32(4): 273-279.
- Vera Guzmán A.M., López G.M., Chavez-Servia J.L. (2012). Chemical composition and volatile compounds in the artisanal fermentation of mezcal in Oaxaca, Mexico. African Journal of Biotechnology 11 (78): 14344-14353.
- Wang N., Nobel P.S. (1998). Phloem transport of fructans in the crassulacean acid metabolism species *Agave deserti*. Plant. Physiol. 116, 709 - 714.
- Warringer J., Ericson E., Fernandez E., Nerman O., Blomberg A. (2003). High-resolution yeast phenomics resolves different physiological features in the saline response. PNAS 100(26):15724-15729.
- Xufre A., Albergaria H., Inácio J., Spencer-Martins I., Girio F. (2006). Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of the yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. International Journal of Food Microbiology 108 p. 376-384.
- Yale J., Bohnert HJ. (2001). Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. J Biol Chem 276:15996-16007.
- Yin Z, Wilson S, Hauser N, Tournu H, Hoheisel J.D, Brown A. (2003). Glucose triggers different global responses in yeast, depending on the strength of the signal, and transiently stabilizes ribosomal protein mRNAs. Molecular Microbiology. 48(3): 713–724.
- Zagorc T., Maraz A., Cadez N., Povhe J. K., Péter G, Resnik M., Nemanicí J., Raspor P. (2001). Indigenous wine killer yeasts and their application as a starter culture in wine fermentation. Food Microbiology 18: 441-451.
- Zizumbo-Villarreal D, Colunga-García Marín P. (2008). Early coconut distillation and the origins of mezcal and tequila spirits in west-central Mexico. Genetics Resources and Crop Evolution 55(4): 493-510.
- Zuzuarregui A, Del Olmo M. (2004). Analyses of stress resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection. Antonie van Leeuwenhoek 85, 271–280.

Sitios de internet

- COMERCAM. Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.comercam.org> [Revisado el 2 de mayo de 2010].
- Norma Oficial Mexicana 1997. NOM-070-SCFI-1994, "Bebidas Alcohólicas-mezcal-Especificaciones". Disponible en <http://www.colpos.mx/bancodenormas/noficiales/NOM-070-SCFI-1994.PDF>
- Norma Oficial Mexicana 2006. NOM-006-SCFI-2005, "Bebidas Alcohólicas-Tequila-Especificaciones". Disponible en: www.economia.gob.mx. Consultado el 15 de Septiembre 2009.
- Ramales Osorio M.C, Barragán Ramírez M.L. (2002). La industria del mezcal y la economía oaxaqueña en Observatorio de la Economía Latinoamericana <http://www.eumed.net/coursecon/ecolat/mx/>.

XII. APÉNDICES

XII.1 APENDICE 1. Análisis estadísticos de la tolerancia al estrés por etanol y por fructosa del cepario de levaduras LBI-CBG

Cuadro 28. Analisis de varianza del crecimiento (en unidades logarítmicas) alcanzado por las cepas de *S. cerevisiae* (mas la cepa control Fermichamp) en medio agar YPD suplementado con 5, 8 o 15% de EtOH v/v.

YPD 5%			YPD 8%			YPD 15%		
Level		Least Sq Mean	Level		Least. Sq Mean	Level		Least Sq Mean
1D1	A	7.08	3Y5	A	6.77	3Y2	A	5.73
3Y3	A	7.07	Msc1	A	6.77	3D5	A	5.65
3D5	A	7.05	3Y4	A B	6.71	3Y5	A	5.65
3D4	A	7.04	3D5	A B C	6.60	FECHA	B	5.52
4Y3	A	7.04	3Y3	A B C	6.59	3Y3	C	5.38
FECHA	A B	7.04	3Y8	A B C D	6.54	3Y4	C D	5.33
3Y4	A B	7.03	P13	A B C D	6.54	3Y8	D	5.22
3Y8	A B	7.03	P17	A B C D E	6.52	3D2	E	4.95
Msc 3	A B	7.02	4Y3	A B C D E	6.52	3D4	F	4.20
3D2	A B	7.01	P19	B C D E F	6.48	P8	G	0
3Y5	A B	7.00	P29	B C D E F	6.47	P17	G	0
3D3	A B	7.00	3Y2	B C D E F	6.47	P19	G	0
3Y2	A B	6.96	P28	C D E F G	6.44	P15	G	0
3D6	A B	6.96	P15	C D E F G H	6.41	Msc 1	G	0
Msc 6	A B	6.96	P26	C D E F G H	6.37	Msc 3	G	0
Msc 1	B	6.91	3D4	C D E F G H	6.36	Msc 6	G	0
P13	C	6.58	3D3	C D E F G H	6.36	P13	G	0
P17	C	6.57	P23	D E F G H I	6.29	P20	G	0
P24	C	6.57	P24	E F G H I	6.27	P42	G	0
P20	C	6.55	P20	F G H I J	6.24	P22	G	0
P23	C	6.54	3D2	G H I J K	6.20	P23	G	0
P26	C	6.51	Msc6	H I J K	6.19	P26	G	0
P19	C	6.51	3D6	H I J K	6.18	P28	G	0
P28	C	6.50	FECHA	I J K L	6.08	P29	G	0
P29	C	6.50	1D1	J K L	6.01	P30	G	0
P42	C	6.49	Msc3	K L	5.96	P5	G	0
P15	C	6.47	P42	L	5.88	1D1	G	0
P8	D	5.53	P22	M	5.17	3D3	G	0
P30	D	5.51	P8	N	4.00	3D6	G	0
P5	D	5.48	P30	O	0	4Y3	G	0
P22	D	5.44	P5	O	0	P24	G	0

Para los fines del análisis estadístico se usó un valor de 1 en donde no hubo crecimiento para fines de la conversión logarítmica de los valores del crecimiento

Cuadro 29. Analisis de varianza del crecimiento (en unidades logarítmicas) alcanzado por las cepas *S. cerevisiae* (mas la cepa control Fermichamp) en medio agar YPF suplementado con 5, 8 o 9% de EtOH v/v.

YPF 5%			YPF 8%			YPF 9%		
Level		LeastSq Mean	Level		Least Sq Mean	Level		Least Sq Mean
3Y3	A	7.11	3Y4	A	6.80	3Y3	A	6.62
3D4	A B	7.08	3Y8	A	6.79	3D4	B	6.37
3Y4	A B C	7.07	3Y3	A	6.79	3D3	B C	6.29
3D2	A B C D	7.06	3D3	B	6.60	3D5	C D	6.19
3D5	A B C D E	7.04	3Y5	B	6.59	3Y5	C D E	6.14
3Y5	B C D E F	7.03	3D4	B C	6.58	3Y2	D E F	6.05
4Y3	B C D E F G	7.02	P19	B C D	6.53	Msc 3	E F	6.02
3D3	C D E F G H	6.99	1D1	B C D	6.52	3Y4	F G	5.96
FECHA	D E F G H	6.99	P29	C D E	6.42	3Y8	G H	5.83
3Y2	E F G H	6.98	P17	D E F	6.37	3D2	H	5.69
Msc3	E F G H	6.98	P24	D E F	6.37	FECHA	I	5.36
3Y8	E F G H	6.97	3D5	E F G	6.32	3D6	J	4.86
3D6	F G H	6.96	3D6	F G H	6.24	Msc 1	K	4.20
Mosca6	G H	6.95	Msc 3	F G H	6.22	P8	L	0
1D1	G H	6.95	P15	G H	6.19	P28	L	0
Msc1	H	6.92	3D2	G H	6.16	P29	L	0
P19	I	6.59	3Y2	H	6.14	P30	L	0
P5	I J	6.57	P23	H	6.14	P42	L	0
P24	I J	6.53	Msc 1	I	5.73	Msc 6	L	0
P17	J	6.50	4Y3	I	5.71	P13	L	0
P29	J	6.50	Msc 6	I	5.70	P17	L	0
P13	K	6.40	FECHA	I	5.60	P20	L	0
P15	K	6.39	P42	J	5.42	P23	L	0
P23	K	6.39	P5	J	5.40	P24	L	0
P42	K	6.33	P30	K	4.63	P26	L	0
P20	L	5.58	P20	L	4.10	P5	L	0
P30	L	5.53	P28	L	4.00	1D1	L	0
P22	M	5.29	P8	M	0	P19	L	0
P28	N	5.01	P13	M	0	P22	L	0
P8	O	4.36	P22	M	0	4Y3	L	0
P26	O	4.30	P26	M	0	P15	L	0

Para los fines del análisis estadístico se usó un valor de 1 cuando no hubo crecimiento para la conversión logarítmica

Cuadro 30. Analisis de varianza del crecimiento (en unidades logarítmicas) alcanzado por las cepas *S cerevisiae* (mas la cepa control Fermichamp) en medio agar YP suplementado con 5, 8 o 9% de EtOH v/v.

EtOH 5%			EtOH8%			EtOH 9%		
Level		Least Sq Mean	Level		Least Sq Mean	Level		Least Sq Mean
P15	A	5.72	3D3	A	5.31	3Y3	A	4.69
Msc 1	A B	5.63	3Y2	A B	5.29	FECHA	A	4.67
3Y2	A B	5.62	3Y3	A B	5.28	P5	A	4.66
3Y3	A B	5.62	Msc 3	A B	5.25	3Y4	A	4.65
P17	A B C	5.61	FECHA	A B C	5.12	3Y5	B	4.36
4Y3	A B C D	5.60	3Y4	A B C D	5.05	3Y2	B	4.36
Msc 3	B C D E	5.60	3D2	A B C D	5.02	P29	C	4.10
3D2	B C D E F	5.59	3Y8	B C D	4.97	Msc 3	C	4.00
1D1	B C D E F	5.59	Msc 6	B C D	4.97	1D1	D	0
3Y8	B C D E F	5.55	3Y5	C D E	4.82	3D2	D	0
3D3	B C D E F	5.55	P5	D E	4.75	3D3	D	0
FECHA	B C D E F	5.54	1D1	E	4.63	3D4	D	0
3Y5	B C D E F	5.53	P29	E	4.54	3D5	D	0
P29	C D E F	5.50	P15	F	4.20	3D6	D	0
P5	D E F	5.50	P19	F	4.00	3Y8	D	0
P19	E F	5.49	P23	F	4.00	4Y3	D	0
3Y4	E F G	5.48	3D5	G	0	Msc 6	D	0
Msc 6	F G	5.48	3D6	G	0	P19	D	0
P23	G H	5.37	P17	G	0	P20	D	0
3D5	H I	5.33	3D4	G	0	P22	D	0
3D4	H I J	5.31	4Y3	G	0	P23	D	0
P8	H I J	5.30	Msc 1	G	0	P26	D	0
P28	H I J	5.29	P13	G	0	P28	D	0
P22	H I J	5.27	P42	G	0	P42	D	0
P24	I J	5.24	P20	G	0	Msc 1	D	0
P42	I J K	5.22	P26	G	0	P13	D	0
3D6	J K	5.21	P28	G	0	P15	D	0
P13	K L	5.12	P30	G	0	P17	D	0
P26	K L	5.11	P22	G	0	P24	D	0
P20	L	5.09	P24	G	0	P30	D	0
P30	M	4.56	P8	G	0	P8	D	0

Para los fines del análisis estadístico se uso 1 debido a la conversión logarítmica de los valores del crecimiento de las diversas cepas evaluadas

Cuadro 31. Analisis de varianza del crecimiento en unidades logarítmicas alcanzado por los cepas *S. cerevisiae* (mas la cepa control Fermichamp) en medio agar YP suplementado con 100, 200, 500 o 700 g/L de fructosa.

Fructosa 100 g/L			Least Sq	Fructosa 200 g/L			Least Sq
Level			Mean	Level			Mean
FECHA	A		6.93	FECHA	A		6.85
P23	B		6.81	P24	B		6.64
P24	B		6.79	P17	B C		6.64
P17	B		6.79	3D6	B C		6.61
P20	B C		6.76	P23	B C D		6.60
3D6	C		6.72	P20	B C D		6.60
Msc 1	C D		6.71	Msc 1	C D E		6.58
P28	D E		6.66	P29	D E		6.55
3Y5	E F		6.61	3D5	E		6.53
3D2	F G		6.60	P13	F		6.46
P13	F G		6.60	P28	F G		6.44
3D5	F G		6.59	3Y5	F G		6.44
P29	F G		6.59	P42	F G H		6.43
3D3	F G		6.58	3D3	F G H		6.42
Msc 3	F G		6.58	1D1	F G H I		6.41
3D4	F G H		6.57	P22	F G H I J		6.40
1D1	F G H		6.56	P5	F G H I J		6.40
3Y8	G H		6.56	Msc 3	F G H I J		6.39
P5	H I		6.52	3Y8	G H I J		6.38
P42	H I		6.52	3Y4	H I J K		6.37
P19	I		6.50	3D4	I J K L		6.35
P22	I J		6.49	3Y2	I J K L		6.35
Msc 6	I J		6.48	3Y3	J K L		6.35
3Y3	J K		6.44	Msc 6	K L		6.31
3Y2	K L		6.42	P19	L		6.30
3Y4	L M		6.37	P8	M		6.21
P8	M		6.35	3D2	N		5.98
P15	N		5.90	P15	O		5.89
4Y3	O		5.83	4Y3	P		5.81
P26	P		5.35	P26	Q		5.29
P30	Q		4.93	P30	R		4.87

Continuación Cuadro 32.

Fructosa 500 g/L				Fructosa 700 g/L			
Level			Least Sq Mean	Level			Least Sq Mean
P19	A		5.73	P19	A		5.39
Msc 1	A		5.71	Msc 1	A		5.33
3Y8	A		5.70	3Y8	A		5.27
P15	A	B	5.69	Msc 6	A	B	5.22
FECHA	A	B	5.58	P15		B	5.05
Msc 6	A	B	5.58	3Y3		C	4.30
4Y3	A	B	5.55	3Y4		C D	4.20
3Y3	A	B	5.51	P5		C D	4.20
3Y4		B	5.46	4Y3		C D	4.10
3Y2			5.27	3Y2		C D	4.10
P5			5.10	P23		D	4.00
P17			4.75	P17		D	4.00
P23			4.70	P8		E	0
P29			4.67	1D1		E	0
P28			4.42	3D2		E	0
3D6			4.30	3D3		E	0
P20			4.10	3D4		E	0
P22			4.10	3D5		E	0
3D5			4.00	3D6		E	0
3Y5			4.00	3Y5		E	0
Msc 3			4.00	P42		E	0
P24			4.00	FECHA		E	0
1D1			0	Msc 3		E	0
3D2			0	P13		E	0
3D3			0	P20		E	0
3D4			0	P22		E	0
P13			0	P26		E	0
P30			0	P29		E	0
P42			0	P24		E	0
P8			0	P28		E	0
P26			0	P30		E	0

Para los fines del análisis estadístico se usó un valor de 1 cuando no hubo crecimiento para la conversión logarítmica

Cuadro 33. Analisis de varianza para la producción de etanol en las diversas especies (izquierda) y cepa de levadura (derecha) evaluadas en M3 a las 96 h.

Level		Least Sq	Level		Least Sq
		Mean			Mean
S. cerevisiae	A	61.13	3D6	A	68.46
Z. bailli	A B	56.39	Mosca3	A	67.98
C. lusitaniae	B C	40.08	Fermichamp	A	67.23
P. mexicana	B C	39.75	4Y3	A	67.21
K. marxianus	B C	36.69	3D4	A B	66.05
T. delbrueckii	C	33.95	3D2	A B	65.46
P. kluvery	C D	25.20	3D5	A B	65.11
C. parasilopsis	C D	18.98	3Y4	A B C	61.44
R. mucilaginoso	D	11.63	3Y3	A B C	58.84
P. guillermondii	D	6.28	1D1	A B C	57.77
			3Y5	A B C	57.72
			3Y1	A B C D	56.39
			3Y8	A B C D E	53.38
			1AN9	B C D E F	50.60
			1Y9	C D E F G	45.31
			4Y4	D E F G H	40.08
			1AN3	E F G H	39.75
			3Y2	E F G H	38.08
			4D3	F G H I	34.86
			1AN1	G H I	31.21
			1D5	G H I	29.89
			4D6	H I J	25.20
			1AN2	I J K	20.06
			1Y7	I J K	18.98
			P12	J K	11.63
			1Y12	K	6.28

Cuadro 34. Analisis de varianza para la producción de glicerol en las diversas especies (izquierda) y cepas de levadura (derecha) evaluadas en M3 a las 96 h.

Level			Least Sq Mean	Level			Least Sq Mean
Z. bailli	A		8.35	3Y1	A		8.35
S. cerevisiae	A B		5.90	3D2	A		8.34
K. marxianus	A B		5.76	3D6	A		8.15
C. parasilopsis	A B C		5.74	1D1	A B		7.63
P. kluvery	A B C		5.37	4Y3	A B C		7.35
T. delbrueckii	A B C		4.42	3Y3	A B C		7.27
C. lusitaniae	B C D		3.03	Mosca3	A B C D		6.95
P. mexicana	B C D		2.85	3D4	A B C D		6.93
R. mucilaginoso	C D		1.35	3Y5	A B C D		6.69
P. guillermondii	D		0.42	1AN9	A B C D		6.62
				3D5	B C D		6.30
				1Y9	B C D		6.23
				1D5	C D		5.77
				1Y7	C D		5.74
				4D6	D E		5.37
				4D3	D E		5.29
				1AN2	E F		3.77
				3Y2	F		3.30
				4Y4	F G		3.03
				1AN1	F G		2.87
				1AN3	F G		2.85
				3Y4	F G		2.65
				3Y8	F G		2.63
				Fermichamp	F G		2.55
				P12	G H		1.35
				1Y12	H		0.42

Cuadro 35. Analisis de varianza en el consumo de glucosa en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en M3 a las 96 h.

Level		Least Sq Mean	Level		Least Sq Mean
S. cerevisiae	A	89.26	4Y3	A	95.00
C. lusitaniae	A B	70.18	Mosca3	A	95.00
K. marxianus	B	69.74	3D6	A	94.66
P. mexicana	A B	69.05	3D4	A	94.56
T. delbrueckii	B	61.15	Fermichamp	A	94.00
P. kluvery	B	57.94	3D5	A	93.86
C. parasilopsis	B C	49.18	3D2	A	93.84
Z. bailli	B C	48.74	3Y4	A	90.10
R. mucilaginosa	C D	24.15	1D1	A	90.03
P. guillermondii	D	11.99	1AN9	A B	87.85
			3Y5	A B	85.13
			3Y3	A B	85.10
			3Y8	A B C	84.08
			1Y9	A B C	82.71
			4Y4	B C D	70.18
			1AN3	B C D	69.05
			3Y2	C D E	65.04
			4D3	C D E	64.75
			1D5	D E	61.76
			1AN1	D E	59.76
			4D6	D E	57.94
			1Y7	E F	49.18
			3Y1	E F	48.74
			1AN2	F G	35.84
			P12	G H	24.15
			1Y12	H	11.99

Cuadro 36. Analisis de varianza en el consumo de fructosa en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en M3 a las 96 h.

Level		Least Sq Mean	Level		Least Sq Mean
Z. bailli	A	84.36	Fermichamp	A	95.00
S. cerevisiae	A	71.31	3Y1	A B	84.36
K. marxianus	B	37.05	Mosca3	A B C	82.34
C. lusitaniae	B C	36.30	3Y4	A B C	81.44
T. delbrueckii	B C	33.64	4Y3	A B C	81.41
P. mexicana	B C	33.55	3D4	A B C	78.51
P. kluyvery	B C	24.16	3D6	A B C	78.39
C. parasitopsis	B C	20.92	3D5	A B C D	76.02
R. mucilaginosa	B C	8.79	3Y8	B C D	72.88
P. guillermondii	C	1.99	3D2	B C D	72.44
			3Y3	C D E	63.30
			3Y5	D E	58.10
			1AN9	D E	57.19
			1D1	D E	56.99
			1Y9	E F	50.13
			4Y4	F G	36.30
			1AN3	F G H	33.55
			4D3	F G H	33.31
			3Y2	G H	30.20
			1D5	G H I	27.73
			1AN1	G H I	26.69
			4D6	G H I	24.16
			1Y7	G H I J	20.92
			1AN2	H I J	17.06
			P12	I J	8.79
			1Y12	J	1.99

Cuadro 37. Analisis de varianza en el CO₂ liberado en las diversas especies (izquierda) y cepa de levadura (derecha) evaluadas en M3 a las 96 h.

Level		Least Sq Mean	Level		Least Sq Mean
S. cerevisiae	A	81.03	Mosca3	A	94.06
Z. bailli	A B	66.65	4Y3	A B	92.90
K. marxianus	B C	55.40	3D6	A B	90.75
P. mexicana	B C D	49.67	3D5	A B	90.04
C. lusitaniae	B C D	49.34	3D4	A B	89.48
T. delbrueckii	B C	47.63	3D2	A B C	88.31
P. kluyvery	B C D E	34.69	Fermichamp	A B C	84.89
C. parasilopsis	C D E	28.63	1AN9	A B C	77.97
R. mucilaginosa	D E	13.31	3Y3	A B C	75.80
P. guillermondii	E	6.70	1D1	A B C D	75.33
			3Y4	A B C D	75.22
			3Y8	A B C D	74.51
			3Y5	B C D	72.22
			3Y1	C D E	66.65
			1Y9	C D E	66.56
			4D3	D E F	53.61
			3Y2	E F G	49.88
			1AN3	E F G	49.67
			4Y4	E F G	49.34
			1D5	E F G H	46.02
			1AN1	F G H	37.47
			4D6	F G H I	34.69
			1Y7	G H I	28.63
			1AN2	H I J	27.45
			P12	I J	13.31
			1Y12	J	6.70

Cuadro 38. Análisis de varianza para la producción de etanol en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en jugo de uva rojo a las 144 h.

Level			Least Sq Mean	Level			Least Sq Mean
S. cerevisiae	A		110.48	Fermichamp	A		113.92
K. marxianus	A	B	105.53	3Y8	A		113.24
Z. bailli		B C	92.19	3Y4	A		113.06
T. delbrueckii		C	84.47	1Y9	A	B	105.53
				3Y3	A	B C	101.69
				3Y1		B C	92.19
				1AN9		C	84.47

Cuadro 39. Análisis de varianza para la producción de glicerol en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en jugo de uva rojo a las 144 h.

Level			Least Sq Mean	Level			Least Sq Mean
K. marxianus	A		9.90	3Y3	A		10.23
S. cerevisiae	A		9.85	3Y8	A		10.04
T. delbrueckii	A	B	8.63	3Y4	A		10.02
Z. bailli		B	7.83	1Y9	A		9.90
				Fermichamp	A	B	9.11
				1AN9	A	B	8.63
				3Y1		B	7.83

Cuadro 40. Análisis de varianza para la producción de ácido acético en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en jugo de uva rojo a las 144 h.

Level			Least Sq Mean	Level			Least Sq Mean
K. marxianus	A		0.75	3Y4	A		0.85
S. cerevisiae	A		0.67	3Y8	A		0.82
T. delbrueckii	A		0.54	3Y3	A	B	0.76
Z. bailli	A		0.37	1Y9	A	B	0.75
				1AN9		B C	0.54
				3Y1		C D	0.37
				Fermichamp		D	0.26

Cuadro 41. Analisis de varianza para el consumo de glucosa en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en jugo de uva rojo a las 144 h.

Level			Least Sq Mean		
K. marxianus	A		127.65		
S. cerevisiae	A		124.66		
T. delbrueckii		B	116.15		
Z. bailli		C	73.45		

Level			Least Sq Mean		
Fermichamp	A		127.82		
1Y9	A		127.65		
3Y8	A		124.26		
3Y3	A		123.74		
3Y4	A	B	122.83		
1AN9		B	116.15		
3Y1		C	73.45		

Cuadro 42. Analisis de varianza para el consumo de fructosa en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en jugo de uva rojo a las 144 h.

Level			Least Sq Mean		
Z. bailli	A		116.59		
K. marxianus	A	B	108.86		
S. cerevisiae		B	98.02		
T. delbrueckii		C	77.35		

Level			Least Sq Mean		
3Y1	A		116.59		
1Y9	A		108.86		
Fermichamp	A		108.85		
3Y8		B	95.78		
3Y3		B	95.45		
3Y4		B	92.01		
1AN9		C	77.35		

Cuadro 43. Analisis de varianza para el CO₂ liberado en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en jugo de uva rojo a las 144 h.

Level			Least Sq Mean		
K. marxianus	A		87.82		
S. cerevisiae	A		85.96		
Z. bailli		B	72.72		
T. delbrueckii		B	65.07		

Level			Least Sq Mean		
Fermichamp	A		94.56		
1Y9		B	87.82		
3Y8		B C	84.43		
3Y4		C	83.78		
3Y3		C	81.06		
3Y1		D	72.72		
1AN9		E	65.07		

Cuadro 44. Analisis de varianza para la producción de etanol en las diversas mezclas analizadas en jugo de uva rojo a las 144 h.

Level		Least Sq Mean
Ferm-1Y9	A	84.54
Ferm-1AN9	A B	82.19
Ferm-3Y1	A B	82.14
3Y8-3Y1	A B	81.61
3Y3-3Y1	A B	79.10
3Y4-1Y9	A B	76.36
3Y8-1Y9	A B	75.94
3Y3-1AN9	A B	75.74
3Y3-1Y9	A B	73.40
3Y4-1AN9	A B	73.34
3Y4-3Y1	A B	71.82
3Y8-1AN9	B	69.96

Cuadro 45. Analisis de varianza para la producción de glicerol en las diversas mezclas analizadas en jugo de uva rojo a las 144 h.

Level		Least Sq Mean
3Y3-1AN9	A	8.45
Ferm-1Y9	A	8.08
Ferm-1AN9	A	7.91
3Y8-1AN9	A B	7.79
3Y3-1Y9	A B C	7.57
3Y4-1AN9	A B C	7.48
3Y8-3Y1	A B C	7.40
3Y8-1Y9	A B C	7.38
3Y4-1Y9	A B C	7.08
3Y3-3Y1	A B C	6.26
3Y4-3Y1	B C	4.96
Ferm-3Y1	C	4.80

Cuadro 46. Analisis de varianza para la producción de acido acetico en las diversas mezclas analizadas en jugo de uva rojo a las 144 h.

Level	Least Sq Mean
3Y4-3Y1 A	1.83
Ferm-3Y1 A B	1.49
3Y3-1Y9 A B	1.47
3Y3-3Y1 A B	1.42
3Y3-1AN9 B C	1.37
3Y8-1Y9 B C	1.18
3Y8-1AN9 B C	1.09
3Y8-3Y1 C D	0.94
3Y4-1AN9 D E	0.62
3Y4-1Y9 D E	0.61
Ferm-1AN9 E	0.36
Ferm-1Y9 E	0.30

Cuadro 47. Analisis de varianza para el consumo de glucosa en las diversas mezclas analizadas en jugo de uva rojo a las 144 h.

Level	Least Sq Mean
Ferm-1AN9 A	97.50
Ferm-1Y9 A	97.28
Ferm-3Y1 A	96.96
3Y4-1Y9 A	95.32
3Y3-1AN9 A	95.14
3Y3-1Y9 A	95.03
3Y8-1Y9 A	93.23
3Y3-3Y1 A	93.13
3Y4-1AN9 A	92.69
3Y8-1AN9 A	92.03
3Y8-3Y1 B	84.55
3Y4-3Y1 B	84.34

Cuadro 48. Analisis de varianza para el consumo de fructosa en las diversas mezclas analizadas en jugo de uva rojo a las 144 h.

Level		Least Sq Mean
Ferm-1Y9	A	98.90
Ferm-3Y1	A	98.89
Ferm-1AN9	A	96.55
3Y3-3Y1	A B	92.64
3Y4-1Y9	B C	83.81
3Y4-3Y1	B C	83.50
3Y8-3Y1	C	81.94
3Y3-1AN9	C	81.14
3Y3-1Y9	C	79.15
3Y4-1AN9	C	77.01
3Y8-1AN9	C	76.86
3Y8-1Y9	C	76.76

Cuadro 49. Analisis de varianza para el CO₂ liberado en las diversas mezclas analizadas en jugo de uva rojo a las 144 h.

Level		Least Sq Mean
Ferm-1Y9	A	96.21
Ferm-1AN9	A	93.32
Ferm-3Y1	A B	90.50
3Y3-1AN9	B C	85.41
3Y4-1Y9	C D	83.02
3Y3-3Y1	C D E	81.98
3Y8-1AN9	C D E	81.15
3Y4-1AN9	C D E	80.34
3Y8-1Y9	D E	78.45
3Y8-3Y1	D E	77.33
3Y3-1Y9	D E	76.30
3Y4-3Y1	E	76.01

XII.3 APENDICE 3. Análisis estadísticos de la producción de metabolitos en el medio M2 y mosto de Agave tequilana

Cuadro 50. Analisis de varianza para la producción de acido acético en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en M2 a las 48 h.

Level		Least Sq Mean	Level		Least Sq Mean
K. marxianus	A	0.38			
S. cerevisiae	A B	0.31			
R. mucilaginosa	A B C	0.26	3D4	A	0.49
C. parasilopsis	A B C	0.24	4D3	A B	0.48
P. kluyvery	A B C	0.20	3Y3	A B C	0.46
T. delbrueckii	C	0.18	3Y5	A B C D	0.37
Z. bailli	B C	0.14	1D5	A B C D	0.36
P. mexicana	C	0.11	3D2	B C D E	0.35
C. lusitaniae	C	0.08	3Y8	B C D E F	0.34
P. guillermondii	C	0.05	1D1	C D E F G	0.32
			1Y9	D E F G	0.29
			3D5	D E F G	0.29
			1AN9	D E F G H	0.28
			P12	D E F G H I	0.26
			3Y2	D E F G H I	0.26
			3D6	D E F G H I J	0.25
			Mosca3	D E F G H I J	0.25
			1Y7	D E F G H I J	0.24
			4Y3	E F G H I J K	0.21
			3Y4	F G H I J K	0.20
			4D6	F G H I J K	0.20
			Fermichamp	G H I J K L	0.19
			3Y1	H I J K L	0.14
			1AN1	I J K L	0.13
			1AN2	I J K L	0.13
			1AN3	J K L	0.11
			4Y4	K L	0.08
			1Y12	L	0.05

Cuadro 51. Analisis de varianza para la producción de etanol en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en M2 a las 48 h.

Level		Least Sq Mean	Level		Least Sq Mean
C. lusitaniae	A	36.01	4Y4	A	36.01
K. marxianus	A B	29.20	1D1	A B	34.61
Z. bailli	A B C	28.50	1Y9	A B	34.02
S. cerevisiae	A B	28.03	Fermichamp	A B C	32.02
R. mucilaginosa	B C D	22.99	3D4	B C D	31.20
P. mexicana	C D	17.74	Mosca3	B C D	30.93
T. delbrueckii	D	16.47	1D5	C D E	29.35
C. parasilopsis	D	15.88	3Y8	C D E F	29.07
P. kluyvery	D E	13.90	3Y1	C D E F G	28.50
P. guillermondii	E	1.65	3Y3	C D E F G H	28.12
			1AN9	C D E F G H	28.04
			3Y5	D E F G H I	27.44
			3Y4	D E F G H I	27.20
			4Y3	E F G H I J	25.66
			3D5	F G H I J	25.19
			3D6	F G H I J	25.13
			3D2	G H I J	24.46
			4D3	H I J	24.24
			3Y2	I J	23.40
			P12	J	22.99
			1AN3	K	17.74
			1AN2	K	16.45
			1Y7	K	15.88
			4D6	K	13.90
			1AN1	L	4.93
			1Y12	L	1.65

Cuadro 52. Analisis de varianza para la producción de glicerol en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en M2 a las 48 h.

Level		Least Sq Mean	Level		Least Sq Mean
K. marxianus	A	2.03	1D1	A	2.27
Z. bailli	A B C	1.60	1Y9	A	2.26
S. cerevisiae	B	1.54	1AN9	B	2.00
R. mucilaginosa	A B C	1.52	1D5	B	1.93
C. parasilopsis	B C D	1.30	4D3	B	1.91
T. delbrueckii	B C	1.30	3D4	C	1.70
P. kluyvery	B C D	1.07	3Y3	C	1.69
C. lusitaniae	C D E	0.82	Mosca3	C	1.67
P. mexicana	D E	0.59	3Y5	C D	1.61
P. guillermondii	E	0.21	3Y1	C D	1.60
			P12	C D E	1.52
			3D6	C D E	1.52
			3Y4	D E F	1.46
			3D5	D E F	1.46
			4Y3	D E F	1.45
			Fermichamp	D E F	1.44
			3Y8	D E F	1.43
			3D2	E F G	1.35
			1Y7	F G	1.30
			1AN2	G H	1.23
			4D6	H I	1.07
			3Y2	I J	0.99
			4Y4	J K	0.82
			1AN1	K L	0.66
			1AN3	L	0.59
			1Y12	M	0.21

Cuadro 53. Analisis de varianza en el consumo de glucosa en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en M2 a las 48 h.

Level		Least Sq Mean	Level		Least Sq Mean
<i>K. marxianus</i>	A	27.97	3D5	A	28.00
<i>S. cerevisiae</i>	A B	26.80	3D6	A	28.00
<i>C. lusitaniae</i>	B C D	23.59	4Y3	A	28.00
<i>T. delbrueckii</i>	C	23.13	Mosca3	A	28.00
<i>R. mucilaginosa</i>	C D E	23.00	1AN9	A	28.00
<i>C. parasilopsis</i>	C D E	22.70	1D1	A	28.00
<i>P. kluyvery</i>	C D E	22.36	1D5	A	28.00
<i>P. mexicana</i>	C D E	22.04	1Y9	A	28.00
<i>Z. bailli</i>	D E	18.84	3D4	A	28.00
<i>P. guilliermondii</i>	E	18.47	3Y3	A	28.00
			4D3	A	27.92
			3Y5	A	27.32
			3D2	A	27.29
			3Y2	B	25.82
			3Y4	C	24.00
			3Y8	C	24.00
			Fermichamp	C D	23.90
			4Y4	C D E	23.59
			P12	D E F	23.00
			1Y7	E F G	22.70
			4D6	F G	22.36
			1AN2	F G	22.07
			1AN3	G	22.04
			1AN1	H	19.33
			3Y1	H	18.84
			1Y12	H	18.47

Cuadro 54. Analisis de varianza en el consumo de fructosa en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en M2 a las 48 h.

Level		Least Sq Mean	Level		Least Sq Mean
<i>K. marxianus</i>	A	75.76	1D1	A	83.03
<i>S. cerevisiae</i>	A	69.65	1Y9	A	82.21
<i>C. lusitaniae</i>	A B	66.41	1D5	A B	78.91
<i>Z. bailli</i>	A B C	65.88	Mosca3	B C	76.83
<i>R. mucilaginosa</i>	B C	51.78	1AN9	B C D	74.75
<i>T. delbrueckii</i>	B C	50.09	3D4	B C D	74.59
<i>P. mexicana</i>	B C D	46.01	4Y3	C D E	72.20
<i>C. parasilopsis</i>	B C D	45.69	3D6	D E F	70.39
<i>P. kluyvery</i>	C D	43.04	3Y3	D E F	70.18
<i>P. guillermondii</i>	D	26.97	3D2	E F	69.64
			3Y5	E F	69.03
			3D5	E F G	67.63
			4Y4	F G H	66.41
			4D3	F G H	66.17
			Fermichamp	F G H I	65.91
			3Y1	F G H I	65.88
			3Y8	G H I	63.13
			3Y4	H I	61.59
			3Y2	I	61.30
			P12	J	51.78
			1AN2	K	46.10
			1AN3	K	46.01
			1Y7	K	45.69
			4D6	K	43.04
			1AN1	L	29.43
			1Y12	L	26.97

Cuadro 55. Analisis de varianza en el CO₂ liberado en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en M2 a las 48 h.

Level		Least Sq Mean	Level		Least Sq Mean
<i>K. marxianus</i>	A	34.52	1D1	A	47.38
<i>S. cerevisiae</i>	A	34.06	3Y8	B	40.82
<i>C. lusitaniae</i>	A B	34.04	1D5	B C	39.40
<i>Z. bailli</i>	A B C	32.17	1Y9	B C D	36.41
<i>R. mucilaginosa</i>	A B C D	26.78	Fermichamp	B C D	36.29
<i>P. mexicana</i>	A B C D	25.47	3D4	B C D	36.04
<i>C. parasilopsis</i>	B C D	21.34	4Y3	B C D	35.92
<i>T. delbrueckii</i>	C D	20.97	Mosca3	C D E	34.26
<i>P. kluyvery</i>	D E	14.89	4Y4	C D E F	34.04
<i>P. guillermondii</i>	E	3.63	3Y4	C D E F G	33.44
			3D5	D E F G H	32.90
			3Y1	D E F G H	32.17
			1AN9	D E F G H I	31.44
			3D6	D E F G H I	31.30
			3Y3	D E F G H I	30.01
			3Y2	E F G H I	29.08
			3Y5	E F G H I	28.10
			4D3	F G H I J	27.74
			3D2	G H I J	27.28
			P12	H I J	26.78
			1AN3	I J K	25.47
			1Y7	J K	21.34
			1AN2	K L	20.01
			4D6	L M	14.89
			1AN1	M	11.47
			1Y12	N	3.63

Cuadro 56. Analisis de varianza para la producción de ácido acetico en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en mosto de *Agave tequilana* a las 96 h.

Level		Least Sq Mean	Level		Least Sq Mean
K. marxianus	A	0.82	1Y9	A	0.82
T. delbrueckii	A	0.71	1AN9	A	0.71
S. cerevisiae	B	0.12	3Y8	B	0.17
Z. bailli	B	0.08	3Y4	B	0.17
			3Y3	B C	0.13
			3Y1	B C	0.08
			Fermichamp	C	0.00

Cuadro 57. Analisis de varianza para la producción de etanol en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en mosto de *Agave tequilana* a las 96 h.

Level		Least Sq Mean	Level		Least Sq Mean
K. marxianus	A	55.88	1Y9	A	55.88
T. delbrueckii	A	52.52	1AN9	A B	52.52
Z. bailli	A	49.28	3Y3	B C	50.23
S. cerevisiae	A	36.19	3Y1	B C	49.28
			3Y4	B C	47.66
			3Y8	C	46.88
			Fermichamp	D	0.00

Cuadro 58. Analisis de varianza para la producción de glicerol en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en mosto de *Agave tequilana* a las 96 h.

Level		Least Sq Mean	Level		Least Sq Mean
Z. bailli	A	7.10	3Y1	A	7.10
K. marxianus	A B	4.23	3Y4	B	4.53
T. delbrueckii	A B	4.06	3Y3	B	4.43
S. cerevisiae	B	3.34	3Y8	B	4.39
			1Y9	B	4.23
			1AN9	B	4.06
			Fermichamp	C	0.00

Cuadro 59. Analisis de varianza para la producción de consumo de glucosa en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en mosto de *Agave tequilana* a las 96 h.

Level		Least Sq Mean	Level		Least Sq Mean
K. marxianus	A	11.64	3Y4	A	11.64
T. delbrueckii	A	11.64	3Y8	A	11.64
Z. bailli	A	9.89	1AN9	A	11.64
S. cerevisiae	A	9.05	1Y9	A	11.64
			3Y3	A	11.64
			3Y1	A	9.89
			Fermichamp	B	1.27

Cuadro 60. Analisis de varianza para la producción de consumo de fructosa en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en mosto de *Agave tequilana* a las 96 h.

Level			Level		
		Least Sq Mean			Least Sq Mean
K. marxianus	A	92.76	1Y9	A	92.76
Z. bailli	A	91.62	3Y4	A	91.98
T. delbrueckii	A	86.78	3Y8	A	91.80
S. cerevisiae	A	69.20	3Y3	A	91.69
			3Y1	A	91.62
			1AN9	B	86.78
			Fermichamp	C	1.31

Cuadro 61. Analisis de varianza para la producción de liberación de CO₂ en las diversas especies (izquierda) y levaduras (derecha) evaluadas en mosto de *Agave tequilana* a las 96 h.

Level			Level		
		Least Sq Mean			Least Sq Mean
K. marxianus	A	61.20	1Y9	A	61.20
T. delbrueckii	A	57.07	3Y8	B	58.97
Z. bailli	A	51.27	1AN9	C	57.07
S. cerevisiae	A	42.61	3Y4	D	55.73
			3Y3	D	55.20
			3Y1	E	51.27
			Fermichamp	F	0.53

Cuadro 62. Analisis de varianza para la producción de etanol en las diversas mezclas analizadas en mosto de *Agave tequilana* a las 96 h.

Level		Least Sq Mean
Ferm-1AN9	A	55.20
Ferm-3Y1	A	55.20
3Y8-1AN9	A B	52.83
3Y8-3Y1	A B	52.83
3Y4-1AN9	A B	52.35
3Y4-3Y1	A B	52.35
3Y3-3Y1	A B C	52.27
3Y3-1AN9	A B C	52.27
3Y4-1Y9	B C D	50.14
3Y8-1Y9	B C D	49.93
3Y3-1Y9	C D	48.58
Ferm-1Y9	D	46.65

Cuadro 63. Analisis de varianza para la producción de glicerol en las diversas mezclas analizadas en mostos de *Agave tequilana* a las 96 h.

Level		Least Sq Mean
3Y3-1AN9	A	7.56
Ferm-3Y1	A B	6.51
Ferm-1Y9	A B	6.30
3Y8-1AN9	A B	6.22
3Y8-1Y9	A B	5.89
3Y4-1AN9	A B	5.85
3Y3-1Y9	A B	5.06
3Y4-1Y9	A B	5.05
Ferm-1AN9	A B	4.72
3Y8-3Y1	B	4.58
3Y4-3Y1	B	4.55
3Y3-3Y1	B	4.53

Cuadro 64. Analisis de varianza para la producción de acido acetico en las diversas mezclas analizadas en mosto de *Agave tequilana* a las 96 h.

Level		Least Sq Mean
3Y4-1AN9	A	1.35
3Y8-1AN9	A B	1.02
3Y3-1AN9	A B C	0.85
Ferm-1Y9	A B C	0.66
Ferm-1AN9	B C	0.37
3Y8-1Y9	B C	0.24
3Y3-1Y9	C	0.11
3Y8-3Y1	C	0.11
Ferm-3Y1	C	0.11
3Y3-3Y1	C	0.10
3Y4-1Y9	C	0.10
3Y4-3Y1	C	0.09

Cuadro 65. Analisis de varianza para el consumo de glucosa en las diversas mezclas analizadas en mosto de *Agave tequilana* a las 96 h.

Level		Least Sq Mean
3Y3-1AN9	A	11.64
3Y3-1Y9	A	11.64
3Y3-3Y1	A	11.64
3Y4-1AN9	A	11.64
3Y4-1Y9	A	11.64
3Y4-3Y1	A	11.64
3Y8-1AN9	A	11.64
3Y8-1Y9	A	11.64
3Y8-3Y1	A	11.64
Ferm-1AN9	A	11.64
Ferm-1Y9	A	11.64
Ferm-3Y1	B	4.45

Cuadro 66. Analisis de varianza para el consumo de fructosa en las diversas mezclas analizadas en mosto de *Agave tequilana* a las 96 h.

Level		Least Sq Mean
3Y3-1Y9	A	93.17
3Y4-1Y9	A B	93.16
3Y8-1Y9	A B	93.16
Ferm-1Y9	A B C	92.82
Ferm-3Y1	A B C	92.51
3Y3-3Y1	A B C	92.28
3Y4-1AN9	A B C	92.20
3Y4-3Y1	A B C	92.17
3Y8-3Y1	A B C	92.01
3Y3-1AN9	B C	91.86
3Y8-1AN9	C	91.82
Ferm-1AN9	D	85.54

Cuadro 67. Analisis de varianza para el CO₂ liberado en las diversas mezclas analizadas en mosto de *Agave tequilana* a las 96h.

Level		Least Sq Mean
3Y3-1Y9	A	75.27
3Y8-1AN9	B	64.00
3Y8-1Y9	B	63.97
3Y4-1Y9	C	59.80
3Y3-1AN9	D	57.60
Ferm-1Y9	E	55.33
3Y4-1AN9	E	55.23
3Y4-3Y1	E	54.50
3Y8-3Y1	F	52.07
Ferm-1AN9	F	51.83
3Y3-3Y1	G	50.50
Ferm-3Y1	H	47.50

XIII.PRODUCTIVIDAD

XIII.1 Estancias realizadas

CICATA-Querétaro, de Abril a Mayo del 2015. Puesta a punto y cuantificación de compuestos volátiles por GC-MS en fermentaciones con mosto de *Agave tequilana*.

INP-Toulouse (Francia), de Noviembre del 2012 a Mayo del 2013 y Febrero a Junio del 2014. Experimentos en jugo de uva para evaluar levaduras individuales y en mezclas como inoculantes para vino.

KU-Leuven (Bélgica) Junio-Agosto del 2012. Producción de segregantes para análisis tipo QTLs

XIII.2 Presentaciones en Congresos

De la Torre González Francisco J., Vital López Patricia, Narváez Zapata José A., Taillandier Patricia, Larralde Corona C. Patricia. Aplicación de levaduras del mezcal en la fermentación de vinos tinto y blanco. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Guadalajara (Jalisco), del 21 al 26 de Junio del 2015. Poster.

De la Torre González Francisco J., Narváez Zapata José A., Taillandier Patricia, Larralde Corona C. Patricia. Potential use of mezcal yeasts isolates for wine fermentation. 1st Biotechnology World Symposium, 9º Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN, Atlihuetzia (Tlaxcala) México, del 13 al 16 de Octubre del 2014. Poster.

De la Torre González F.J., Huerta Alcocer S.A., Narváez Zapata J.A., Taillandier P., Larralde Corona C.P. Capacidad fermentativa y producción de compuestos volátiles de levaduras no-*Saccharomyces* del mezcal. VIII Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica, XIX Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica y XII Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular, Mazatlán (Sin) México, del 9 al 11 de Abril del 2014. Poster.

De la Torre González F.J., Vergara Álvarez I., Oliva Hernández A.A., Narváez Zapata J.A., Larralde Corona C.P. Stress resistance of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* strains obtained from mezcal. XV National Congress of Biotechnology and Bioengineering and 12th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. Cancún (Quintana Roo) México, del 23 al 28 de Junio del 2013. Poster.

Francisco Javier De la Torre González, N. Iván Tarqui, Amanda A. Oliva Hernández, José A. Narváez Zapata y Claudia Patricia Larralde Corona. Determinación de la tolerancia de etanol de tres especies de levaduras aisladas del mezcal tamaulipeco. XVIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, VII Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica y X Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular, Ixtapa Zihuatanejo (Gro) México, del 28 al 30 de Marzo del 2012. Poster.

Francisco Javier De la Torre González, Elizabeth G. Hernández Mota, José A. Narváez Zapata, Claudia Patricia Larralde Corona, María R. Foulquié, Johan M. Thevelein. Desempeño fermentativo de cepas industriales y nativas de *Saccharomyces cerevisiae*. VIII Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN, Durango (Dgo) México, del 8 al 10 de Octubre del 2012. Presentación oral.

De la Torre González F.J., Hernández Mota E.G., Oliva Hernández A.A., Narváez Zapata J.A., Larralde Corona C.P. Monitoreo de la dinámica poblacional de tres especies de levaduras aisladas del mezcal tamaulipeco. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Querétaro, México del 19 al 24 de Junio del 2011. Poster.

De la Torre González F.J., Narváez Zapata J.A., Larralde Corona C.P. Population dynamics of three predominant species of yeast during the fermentation of agave must. 29 th International Specialised Symposium on Yeast. Guadalajara, México del 29 de Agosto al 2 de Septiembre del 2011. Presentación oral.

XIII.3 Artículos publicados

De la Torre-González F.J, Narváez-Zapata J.A, López-y-López V.E, Larralde-Corona C.P. (2016). Ethanol tolerance is decreased by fructose in *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. *LWT Food Science and Technology* 67, 1-7. DOI 10.1016/j.lwt.2015.11.024

XIII.4 Artículos en preparación

De la Torre-González FJ, Taillandier P, Narváez-Zapata JA, Larralde-Corona CP. Metabolic profiles of mixed cultures of mezcal yeasts during wine type fermentation. Por someter al *International Journal of Food Microbiology*.

De la Torre-González FJ, Vázquez Landaverde PA, Narváez-Zapata JA, Larralde-Corona CP. Selection of mixed cultures of mezcal yeasts for obtaining specific aromatic profiles during tequila fermentation. Revista por decidir.

De la Torre González, F.J., Narváez-Zapata JA, Larralde Corona C.P. Microbial diversity and flavor quality of fermented beverages. Para someter como capítulo de libro Elsevier o de revisión en revista nacional.



Ethanol tolerance is decreased by fructose in *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts



Francisco Javier De la Torre-González^a, José Alberto Narváez-Zapata^a,
Víctor Eric López-y-López^b, Claudia Patricia Larralde-Corona^{a,*}

^a Instituto Politécnico Nacional (IPN), Centro de Biotecnología Genómica (CBG-IPN), Laboratorio de Biotecnología Industrial, Blvd del Maestro s/n esq. Elías Piña Col. Narciso Mendoza, Reynosa, C.P. 88710, Tamaulipas, Mexico

^b Instituto Politécnico Nacional (IPN), Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA-IPN), Ex-Hacienda San Juan Molino, Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tepetitla, C.P. 90700, Tlaxcala, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 July 2015

Received in revised form

12 October 2015

Accepted 17 November 2015

Available online 22 November 2015

Keywords:

Ethanol tolerance

Fructose

Drop-plate technique

Mezcal yeasts

ABSTRACT

The maximal values of osmotic (fructose) stress and ethanol tolerances dependence on hexose type present in media were quantified for a collection of yeasts isolated from mezcal covering ten different genera, including *Saccharomyces*. The yeasts clustered in five groups where in the least tolerant group yeasts were not able to grow at a fructose concentration above 200 g/l, as compared to yeasts in the most tolerant group that were able to grow at concentration of fructose above 700 g/l. In ethanol agar plates without a carbon source, the maximum tolerance was of 9% v/v of ethanol for all of the yeasts. When ethanol was combined with glucose (20 g/l), a number of *Saccharomyces cerevisiae* strains were able to grow at up to 15% v/v ethanol, whereas the maximum was 10% v/v ethanol for the non-*Saccharomyces* yeasts. However, when fructose was used instead of glucose, none of the yeasts tested was able to grow on plates containing above 9% v/v ethanol, including *S. cerevisiae*. Hence fructose did not improve the tolerance to ethanol as observed for glucose, but rather fructose acted as an inhibitor or increasing the toxicity of ethanol.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

During the fermentation process, yeast cells are subjected to several stress conditions, but osmotic (sugar) and ethanol stresses are the most important in terms of changes throughout the fermentation process (Carrasco, Querol, & Del Olmo, 2001; Tofalo et al., 2009). With regards to the fermentable sugars, glucose and fructose are the main hexoses encountered in almost any natural must, being present in equivalent quantities in grape must, but the proportions may vary depending on the must fermented by each alcoholic beverage industry; nonetheless, the initial concentration of total sugars is approximately 100–250 g/l, with the lower fermentability of fructose providing the first challenge for *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells (Arroyo-López, Querol, & Barrio, 2009; Oliva-Hernández, Taillandier, Reséndez-Pérez, Narváez-Zapata, & Larralde-Corona, 2013). The second main stress is the progressive accumulation of ethanol during fermentation. The ethanol is a well-

known inhibitor of microorganisms' growth, and it has been reported that the toxic effects of ethanol on yeast cells involve loss of cell viability and inhibition of both yeast growth and inhibition of various transport systems such as the general amino acid permease and the glucose (hexoses) transport system (Lewis, Elkon, McGee, Higbee, & Gasch, 2010; Santos et al., 2008). The combination of nutrient depletion and high ethanol content contributes to fermentative limitations.

Study of stress resistance is usually performed by inducing a stressor shock (ethanol, osmotic, temperature, etc.) and then the capacity of recovery (viability) of the yeast population is verified by counting the number of colonies formed by microorganisms in a solid (nutrient agar) matrix from serial dilutions of the original sample, either by the pour-plate or spread-plate techniques, but also by spotting and verifying the dilution rate at which there is no visible growth. However, to our knowledge this latter methodology has not been applied to quantitatively assess to the tolerances on several genera of yeasts growing under different stress conditions, to be used as a tool to select those strains with a potential high performance in alcoholic beverage's fermentations.

* Corresponding author.

E-mail address: plarralde@ipn.mx (C.P. Larralde-Corona).

A high level of ethanol tolerance in a yeast strain is a prerequisite for high efficiency during fermentation and, in turn, for a high yield of ethanol. Accordingly, yeasts isolated from agave fermentations (tequila and mezcal as main examples) are an interesting option since these musts are very rich in fructose and this allows for the isolation of yeasts, *Saccharomyces* (Oliva-Hernández et al., 2013) and non-*Saccharomyces* that are already adapted to using this sugar, making this process a good source of yeasts for fermentation purposes, for example for wine production where a high final concentration of fructose is known to be related to stuck fermentations. The aim of this work was to quantitatively assess the effect of fructose over osmotic and ethanol tolerances of yeasts belonging to ten different genera originally isolated from mezcal fermentations.

2. Materials and methods

2.1. Yeast strains and inocula growth conditions

The 25 yeast strains used belong to the mezcal LBI-CBG yeast collection and are conserved in 60% glycerol at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, and the commercial fructophilic wine strain *Saccharomyces cerevisiae* Fermichamp (DSM Food Specialities B.V., The Netherlands) was used as control. The strains used are representative of the yeast glucophilic and fructophilic diversity found in the fermentation of mezcal from Tamaulipas (Mexico) and belong to the species *S. cerevisiae* (labelled LCBG-Sc3Y2, -Sc3Y3, -Sc3Y4, -Sc3Y5, -Sc3Y8, -ScMsc3, -Sc4Y3, -Sc3D2, -Sc3D3, -Sc3D4, -Sc3D5 and -Sc3D6), *Kluyveromyces marxianus* (labelled LCBG-Km1D5, -4D3 and -1Y9), *Torulaspora delbrueckii* (labelled LCBG-Td1AN1, -1AN2 and -1AN9), *Pichia* spp. (*P. kluyveri* -LCBG- Pk4D6, *P. guilliermondii* -Pg1Y12 and *P. mexicana* -Pm1AN3), and strains of *Candida parapsilosis* (LCBG-Cp1Y7), *Clavispora lusitanae* (LCBG-Cl4Y4) *Rhodotorula mucilaginosa* (LCBG-RmP12) and *Zygosaccharomyces bailii* (LCBG-Zb3Y1).

An initial pre-culture of the tested yeast was grown on YPD agar plates containing 1% yeast extract, 2% peptone, 2% w/w D-glucose, plus 2% bacteriological agar (Difco Laboratories, France), all on a w/w basis and incubated at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 h. A loop of this pre-culture was used as inoculum for liquid YPD medium incubated 24 h at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ with shaking at 200 rpm. The optical density of the cultures was determined at 600 nm and the initial inoculum concentration was adjusted using sterile Ringer solution to an absorbance of 0.5 for all tolerance experiments.

2.2. Setup of the drop CFU counting technique for stress tolerance assessment

In order to quantitatively verify the level of stress tolerance of the yeast collection, the first step was to set up a technique for plate counting, based on the classic method of Miles and Misra as revised by Hedges (2002) but modifying the volume used. To set up the counting conditions, cells were counted both in standard plate count technique as in Neubauer chamber using an 18 h culture of the control strain Fermichamp growing on YPD medium. Several volumes (5–20 μl) and dilution factors (10^0 to 10^{-6}) were assayed. The experiment was performed on 9 cm petri dishes containing 15 ml of YPD agar for every yeast inocula (control plate) and the different stress conditions tested (osmotic/carbon source, and ethanol). Triplicates were assayed for each strain under every experimental condition.

2.3. Fructose osmotic tolerance assessment

As fructose is consumed slower than glucose during fermentation, the highest concentration at which the yeasts were able to grow in fructose was assessed across an ample range, and the base

agar medium (YP, 1% yeast extract, 2% peptone, 2% bacteriological agar, all on w/w basis) was supplemented with 2% fructose (w/w) (as in YPF medium), 5%, 10% and then in increments of 5% up to 90% fructose. Serial dilutions were spotted on the media, the plates were incubated at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ until colonies were countable (from 1 to a maximum of 9 days for the most stressful conditions) and all the Petri dishes were sealed with Parafilm M™ (Brand, Germany) to minimize water loss. The experiments were conducted at least three times, and as controls, YPF, YPD and YPDF (equimolar glucose and fructose) agar media were used, the three of them rendering the same colony counts.

2.4. Ethanol tolerance assessment with and without hexoses added

Ethanol stress analysis was conducted on agar media with and without hexoses (either glucose or fructose) and in an equimolar glucose and fructose mixture to assess the effect of the simultaneous presence of the two hexoses. Base YP medium plus 2% w/w of either D-glucose (YPD agar) or D-fructose (YPF agar) or equimolar glucose and fructose (YPDF agar) was used with specific quantities (2, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 or 16% v/v) of ethanol added to the temperate but still melted medium after autoclaving to complete the required volume of medium just prior to being poured into Petri dishes. Then, the drop colony counting technique described above was used. On the other hand, to assess the tolerance and utilisation of ethanol as the sole carbon source, inocula were spotted on base YP agar medium containing 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11 or 12% v/v ethanol. The plates were incubated at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ from 2 up to a maximum of 9 days, and all the dishes were sealed with Parafilm M™ (Brand, Germany) to minimize ethanol and water loss. The experiments were conducted at least three times and as a control the inoculum dilutions were spotted on regular YPD agar medium without ethanol. The average values presented always had a standard deviation of less than 10%.

2.5. Statistical analyses

The raw colony count (CFU/ml) data were converted to their corresponding logarithmic values to facilitate statistical analysis, which was performed using the Analyse-it software for Microsoft Excel (version 2.20) and the JMP routine of the SAS software for ANOVA analysis. For the global tolerance analysis we made use of five values (obtained with normal YPD plus four ethanol and fructose tolerances) per strain in a box plot type description (Krzywinski & Altman, 2014) as the most straightforward statistical method to classify the tolerance range of the *S. cerevisiae* strains. It is worth noting that when no growth was observed, an arbitrary value of 1 was used to allow logarithmic calculations, and the value of zero was reported for this condition accordingly.

3. Results

The reproducibility of CFU counting technique was first validated using an 18 h culture of the control strain Fermichamp growing in YPD broth. The volume of 10 μl was chosen as the most convenient in terms of handling, visualisation and integrity of the drop on the agar surface (Fig. 1A). A working dilution, typically 10^{-3} was used considering that the initial sample had an absorbance ($\text{OD}_{600\text{ nm}}$) of 0.5, equivalent to approximately 3×10^6 CFU/ml, which renders a count around 20–50 colonies per drop deposited, and using the direct sample (no dilution) for the most stressful conditions. We used this technique to evaluate the effects of increasing ethanol and fructose concentrations on yeast growth, as the ones shown in Fig. 1B obtained for selected *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* strains. At such a small volume used, it was

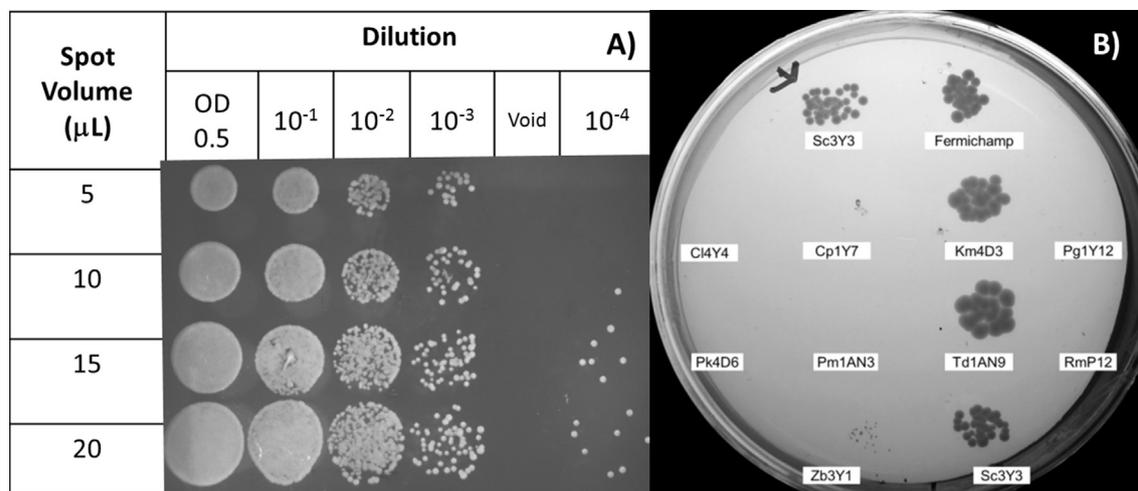


Fig. 1. Setup of the drop-plate colonies count technique for assessing: A) volume and dilution rate needed to accurately quantify the number of colony forming units in a known sample of control strain Fermichamp growing in YPD medium at 18 h; B) example of the growth of colonies at 72 h of incubation by some representatives of the 10 different yeast species isolated from mezcal, growing in YPD plus 8% v/v ethanol at a 10^{-3} dilution.

possible to quantify the viability of up to 12 strains per plate and also to eliminate the need for spreading the sample over the whole plate, which speeded up the analysis.

As expected we found a positive correlation between the cell counts assessed in spread-plates and that in both drop-plates and Neubauer chamber counts (Fig. 2), which corresponds to the interval from 0.1 to 1 of absorbance at 600 nm ($OD_{600\text{ nm}}$) of the cultures. It is worth mentioning that for the less stressful conditions, the colonies could be reliably counted from 10 h of incubation by using a 2 to 4 \times magnification objective.

3.1. Tolerance of mezcal yeasts to osmotic stress caused by fructose

The growth of the yeasts on increasing fructose concentrations spanned the entire range tested (Fig. 3A and 3B); but in general terms, the yeasts grow could be grouped into five visually distinguishable fructose tolerance groups: 1) low tolerance (up to 200 g/l of fructose) was observed only for *S. cerevisiae* 3D4; 2) moderate tolerance (up to 350 g/l of fructose) included only *S. cerevisiae*

strains 3D2 and 3D3; 3) high tolerance (up to 500 g/l of fructose) included *S. cerevisiae* 3D5, 3D6, Msc3 and 3Y5 as well as the non-*Saccharomyces* strain Pk4D6; 4) very high tolerance (up to 650 g/l of fructose) included the control fructophilic strain Fermichamp and the non-*Saccharomyces* strains Cp1Y7, Km4D3, and RmP12; and 5) extreme tolerance (above 700 g/l of fructose) included *Saccharomyces* strains 3Y2, 3Y3, 3Y4, 4Y3, and 3Y8 plus the non-*Saccharomyces* strains Km1D5, Cl4Y4, Km1Y9, Td1AN1, Td1AN2, Td1AN9, Pg1Y12, Pm1AN3 and Zb3Y1. As can be observed (Fig. 3), the mezcal strains showed a wide range of tolerance to increasing fructose concentrations.

3.2. Tolerance to ethanol according to hexose present

The tolerance to increasing concentrations of ethanol, was assessed in more detail for all the *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in the presence of either glucose or fructose at a concentration of 20 g/l, which resulted in practically the same amount of growth (G symbolizing here growth in CFU/ml on a logarithmic scale) from 0 up to 8% of ethanol. Specifically, growth on glucose was $G_{\text{glc}} = 6.41 \pm 0.24 \log \text{ CFU/ml}$, while with fructose, growth was $G_{\text{fru}} = 6.35 \pm 0.38 \log \text{ CFU/ml}$, thus a ratio of $G_{\text{fru}}/G_{\text{glc}} = 1.00 \pm 0.03 \log \text{ CFU/ml}$ for all the *S. cerevisiae* strains, including Fermichamp. Hence the diminishing growth in this range of increasing ethanol (0–8% v/v of ethanol) concentrations can be solely attributed to the inhibitory effect of the ethanol and not to the hexose used. When only ethanol was used with no hexose (YP medium), the growth ratio of the strains under this condition was: $G_{\text{ethanol}}/G_{\text{hexose}} = 0.8 \pm 0.06 \log \text{ CFU/ml}$, except for those yeasts that were not able to growth under this medium (*S. cerevisiae* Sc4Y3, 3D2, and 3D3, corresponding to tolerance group 3 in Fig. 5), therefore these were not considered for the calculation.

Noteworthy, when ethanol concentration was higher than 8% in the presence of fructose (at 20 g/l), which could be a typical case in the late stage of almost any alcoholic beverage fermentation, for all the yeast species tested in this work including *S. cerevisiae*, a drastic drop in maximal tolerance to ethanol was observed (Fig. 4A and B), which is graphically emphasized with an arrow towards the left. This unique behaviour observed only when fructose was present instead of glucose, is equivalent to a drop in tolerance from 129 to 77 g/l of ethanol. This general behaviour, not reported before as far as we know in yeasts, evidenced an inhibitory effect of the fructose

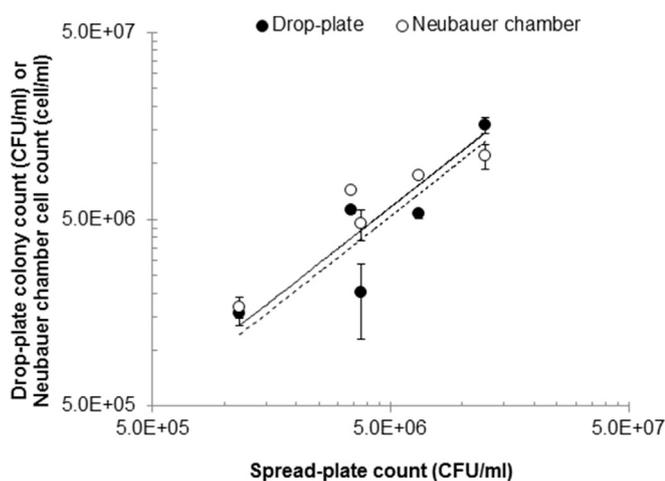


Fig. 2. Linear correlation of the cell count of control strain *S. cerevisiae* Fermichamp obtained on the spread-plate count and the drop-plate count (full symbol, continuous line, $R^2 = 0.945$) and the Neubauer chamber count (void symbol, dotted line, $R^2 = 0.899$). Standard deviations were calculated from three independent experiments.

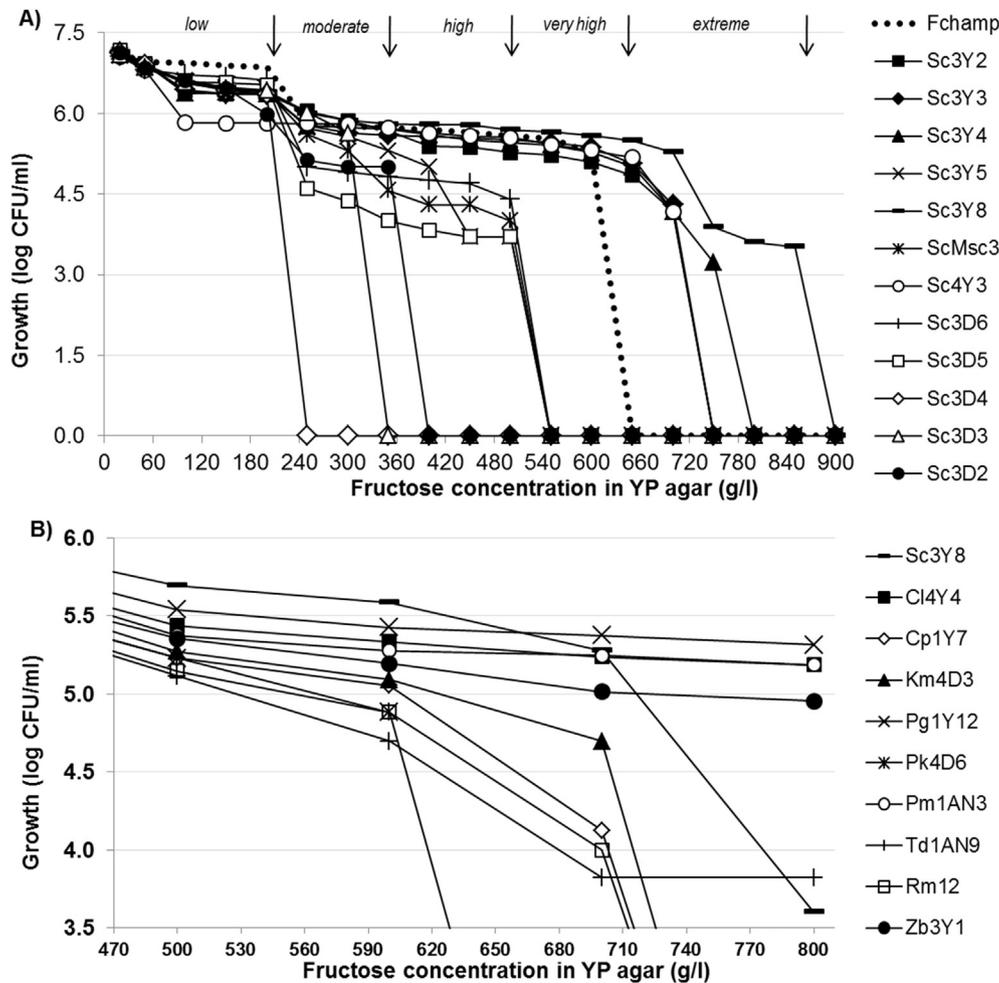


Fig. 3. Fructose tolerance as evidenced by growth capacity on solid YP agar medium supplemented with increasing fructose concentrations for A) *Saccharomyces cerevisiae* (plus Fermichamp as a control), and B) selected representative non-*Saccharomyces* mezcals strains, showing only a detail of the upper part of the graphic for clarity, and including *S. cerevisiae* 3Y8 data for comparison. In all cases the colony counts had standard deviations of less than 5%. The arrows (\downarrow) show the upper limit of each range of tolerance.

(or a general effect of potentiation of the toxic effect of ethanol) rather than a surplus of carbon source for all the yeasts, including the fructophilic control strain Fermichamp.

As a consequence, those strains initially classified as highly resistant to ethanol in YPD, especially some *S. cerevisiae* (Sc) strains that were able to grow at up to 15% v/v of ethanol (3Y2, 3Y3, 3Y4, 3Y5, 3Y8, 3D2, 3D4, 3D5 and Fermichamp), had a maximal tolerance of only 9% ethanol when fructose was the carbon source. This was also the limit for the non-*Saccharomyces* strains Cl4Y4, RmP12 and Zb3Y1 (Fig. 4B) in this hexose. For the rest of the strains, the maximum resistance to ethanol was 8%, both in glucose and fructose.

When an equimolar mixture of glucose and fructose was used instead (YPDF medium), we observed that the presence of glucose partially counteracted the negative effect of fructose for the tested *S. cerevisiae* strains as well as for the non-*Saccharomyces* yeasts *K. marxianus*, *P. guilliermondii*, *T. delbrueckii* and *Z. bailii*, allowing them to increase their tolerance to at least 2% v/v more ethanol with respect to the value obtained with only fructose. This means that *S. cerevisiae* (3Y3 and Fermichamp) and *K. marxianus* 4D3 increased their tolerance from 9 to 12% ethanol in the equimolar medium, whilst *T. delbrueckii* 1AN9 and *Z. bailii* 3Y1 increased their tolerance from 8 to 10% ethanol in this medium, with the latter growing an order of magnitude further in this equimolar mixture

than in only glucose at the same ethanol concentration. For the rest of the species there was no positive effect of using the equimolar glucose/fructose medium.

3.3. Analysis of the stress tolerances of *S. cerevisiae* mezcals strains

The end of almost any alcoholic fermentation is characterized by both high fructose and ethanol concentrations, and also by the almost absolute predominance of *S. cerevisiae* species, hence we used a combination of the unstressed growth and that obtained at four stressful conditions (high ethanol levels with and without hexoses present, and growth at high osmotic pressure caused by fructose) as a means of classifying the phenotypes observed for this species.

As can be observed (Fig. 5), the tolerance to the studied stresses for the *S. cerevisiae* mezcals strains, expressed as the pooled growth attained under the conditions tested, can be classified into 3 groups and one unique behaviour as evidenced by their box plot distributions as follows: yeasts in group 1 (strains Sc3Y2, 3Y3, 3Y4, 3Y8, Msc3 and control strain Fermichamp) performed well under the four stresses tested and had the lowest interquartile range (IQR) and highest minimal values, corresponding to the more robust (fitter) growth of these strains; yeasts in group 2 (including yeasts Sc3Y5, 3D5 and 3D6) were similar to the former but had a lower

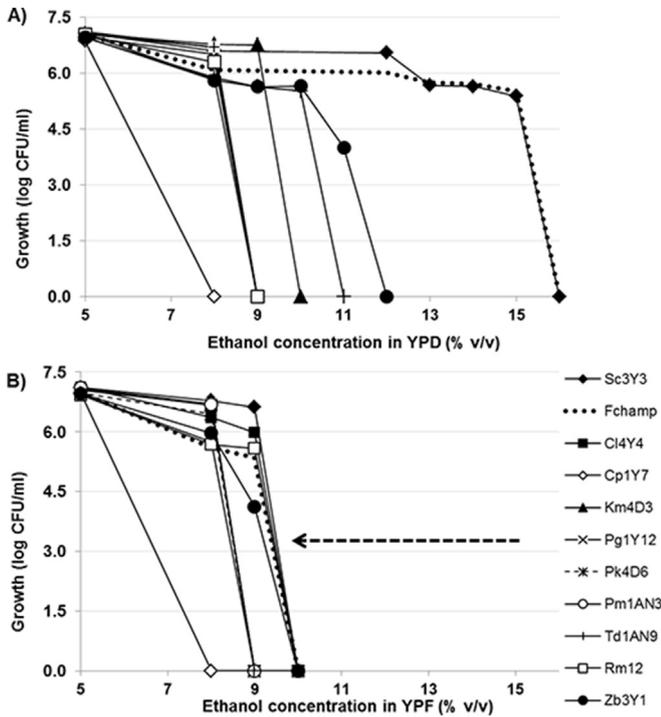


Fig. 4. Tolerance to increasing ethanol concentrations displayed by representative strains of each of the species found in mezcals growing in the presence of A) glucose, or B) fructose, both at a concentration of 20 g/l. There was a drop in resistance (emphasized by the dotted arrow) for all species when ethanol was above 8% v/v and fructose was the carbon source.

tolerance to high concentration fructose; group 3 yeasts (Sc3D3, 3D2 and 4Y3) were tolerant to ethanol in the presence of glucose or fructose but not to ethanol without any hexose, and they had a low tolerance to high concentration fructose; and finally, as an

individual case, strain Sc3D4 was tolerant to ethanol with or without the presence of any hexose, showing a high median growth value of 6.36, similar to group 1, but was very sensitive to high concentration fructose. All this indicated a high phenotypic diversity of the *S. cerevisiae* mezcals strains in terms of tolerance to ethanol and fructose.

4. Discussion

Determination of the levels of tolerance to stress are usually performed under liquid culture, which requires the use of agitation devices, transfer of volume for absorbance quantification and control of water loss in the case of microplate readers. As all this is avoided in agar plates, it constitutes an invaluable tool for screening of yeasts and determination of their limit tolerances to stress as far as the media utilised can be contained in the agar matrix.

4.1. Suitability of the drop plate method for stress tolerance analysis

With respect to the drop-plate technique for quantifying the growth of a yeast culture, [Supanwong and Pichai \(1995\)](#) in a short report showed their use for *S. cerevisiae* TISTR 5168 and the reliability of spotting several dilutions on the same plate, although no details were given concerning the volume of the cell solutions used for the drops, nor different media were tested. In this aspect, the method presented here and experimental setup proposed allowed us the quantitative analysis of our strains with capability to be performed in both, a high number of replicates and/or of strains in a short time (overnight for the less stressful conditions), and it can be easily adapted in any lab with a minimum of microbiological equipment.

4.2. Tolerance of yeasts to high concentration fructose

The upper limit of growth at fructose concentrations above 750 g/l observed in this work for two of the *S. cerevisiae* yeasts (3Y4

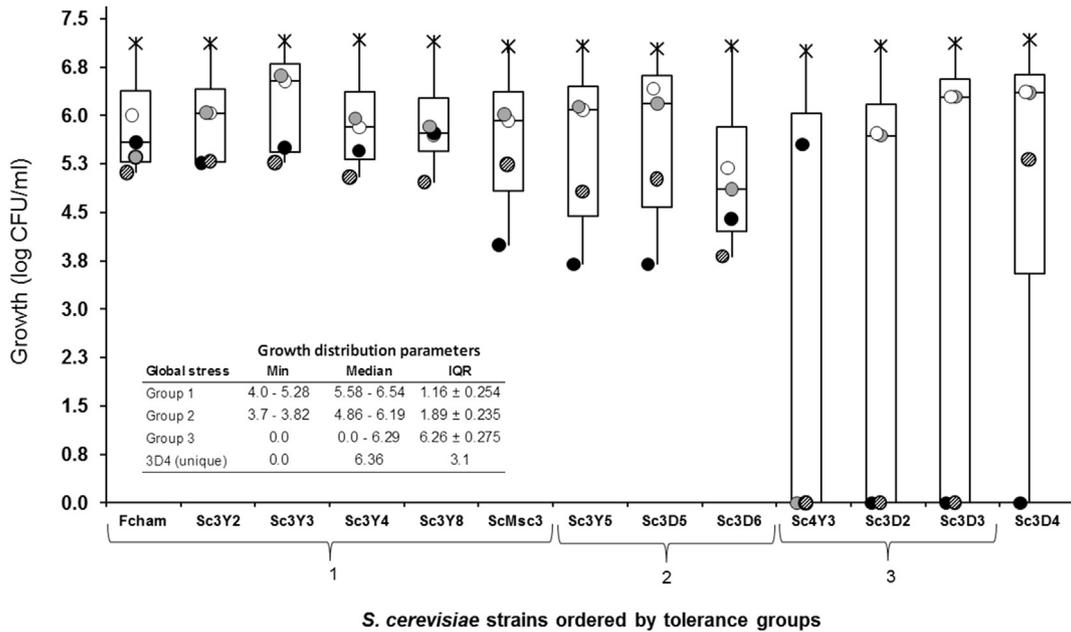


Fig. 5. Global box plot type analysis of the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* mezcals strains comparing the average growth attained on solid media under the following conditions: normal YPD (black stars), YPD plus 12% ethanol (white dots), YPF plus 9% ethanol (grey dots), YP plus 8% ethanol (striped dots) and YP plus 500 g/l fructose without ethanol (black dots). Values describing the distribution of each tolerance group and the unique case are presented in the upper right side of the figure. All the experiments were performed at least three times, average values are presented and the standard deviation was always less than 10%.

and 3Y8) is higher than the tolerance to fructose in liquid medium reported by Arroyo-Lopez et al. (2009) who observed a maximum of 640 g/l for *S. cerevisiae*, which could be explained by the different types of media used by these authors and in the present work. For the non-*Saccharomyces* yeasts, specifically for *P. guilliermondii* and *Zygosaccharomyces baillii* isolated from Spanish candied fruit factories, Martorell, Stratford, Steels, Fernandez-Espinar, and Querol (2007) found that the maximum glucose tolerance, also tested in a YPD-based medium, was 576 g/l (3.2 M) for the former and around 727 g/l (4.04 M) for the latter. These values are lower than the ones obtained in this work using fructose instead of glucose, with tolerance to fructose of 800 g/l (4.44 M) for the two strains of these species tested in this work (Pg1Y12 and Zb3Y1) as well as for the two non-*Saccharomyces* yeasts Cl4Y4 and Pm1AN3 belonging to the genera *Clavispora* and *Pichia*, respectively.

It is worth noting that information concerning yeast responses to osmotic stress has been obtained by using potassium chloride (Carrasco et al., 2001; Zuzuarregui & del Olmo, 2004), sorbitol (Wimalasena et al., 2014) and glucose (Martorell et al., 2007; Tofalo et al., 2009), but the effect of the stress caused by fructose itself, which can indeed drastically decrease the ethanol tolerance not only for *S. cerevisiae* but for all of the species studied here, is seldom analysed, except for the work of Arroyo-Lopez et al. (2009), and the modelling work of Zinnai, Venturi, Sanmartin, Quartacci, and Andrich (2013). The latter researchers found no difference in the rate of consumption of these hexoses below 50 g/l ethanol, but above this concentration glucose consumption increases, and by means of a mathematical model the authors suggest that the limiting step may occur either at the active transport of fructose through the membrane or at the isomerization of fructose to glucose.

4.3. Tolerance of yeasts to high concentration of ethanol

Concerning ethanol, the level of tolerance on YPD of half of the *S. cerevisiae* strains coincides with that reported by Carrasco et al. (2001) and also by Páez et al. (2011) for some of their *S. cerevisiae* strains isolated from agave musts, with 15% v/v ethanol being the upper limit in this work. The response to ethanol in the absence of any sugar was determined (YP–EtOH), where a maximum tolerance of 9% v/v ethanol was obtained, which is in line with a report on other strains with low, moderate and high ethanol tolerances ranging between 5 and 14% (Ding et al. 2009; Tofalo et al., 2009). All the non-*Saccharomyces* strains tested in this work were unable to grow on YPD plates containing more than 10% ethanol except for *Z. baillii* 3Y1, as also was observed in the work of Santos et al. (2008), who suggested that the more ethanol affects the hexose transport system, the more residual fructose was present in the stuck-wine (fructose) medium, but this was also dependant on the specific strain and its growth stage.

None of the yeasts tested here were able to grow on either YPF–EtOH plates or YP–EtOH plates containing above 9% ethanol, even when the sample was spotted directly without dilution, which indicated that the presence of fructose did not improve the survival rate of any of the yeasts in the presence of ethanol but rather had an inhibitory or disruptive effect, as evidenced by the abrupt shift in tolerance from 15 to 9% v/v ethanol (Fig. 4B). This effect of decreasing viability and increasing mortality rate caused solely by fructose has only been reported as far as we know by Semchyshyn, Lozinska, Miedzobrodzki, and Lushchak (2011) for *S. cerevisiae* at a much lower concentration (4%), and it could at least partially explain the shift in viability observed in this work. Interestingly, in experiments using equimolar concentrations of glucose and fructose we observed that the presence of glucose partially counteracted the negative effect of fructose and provided to some of the

strains (*Saccharomyces* and some non-*Saccharomyces*) a further increase in ethanol tolerance of at least 2% v/v ethanol more in comparison to growth values attained using only fructose, thus evidencing some competition-type behaviour of these sugars, probably at their initial uptake in the membrane, as suggested by Zinnai et al. (2013), or a conformational change of ethanol in the hexoses mixture, which could be more toxic and/or less prone to be transported. This however requires further experimental confirmation. From the genetic expression point of view, Piper et al. (1994) have long demonstrated that at the membrane level both temperature and ethanol stress responses have similar patterns of Hsps (Heat-shock proteins), which are induced (Hsp104, Hsp70 and Hsp26) at ethanol levels above 4% and up to 10%. Notably, Hsp140 and Hsp70 induction is equally strong when either heat-shock (39 °C for 40 min) or 8% ethanol exposure is tested, as is the rapid loss of plasma-membrane ATPase probably in a cellular attempt to maintain homeostasis by extruding the protons that passively enter the yeast when the membrane is affected by such stresses.

We globally analyse the performance of the *S. cerevisiae* mezcals strains. It was observed that they could be classified into three main groups, wherein the first one includes the commercial strain Fermichamp, which is currently used to reactivate stuck fermentations given its fructophilic nature. We therefore anticipated that the strains in this group would be the ones with the highest ethanol productivity; we found as a general trend that the maximal ethanol yield of the strains in a synthetic agave-like medium where fructose/glucose ratio is 9:1, (Oliva-Hernández et al., 2013) was the highest for strains in group 1 ($Y_{\text{EtOH/S}} = 0.43 \pm 0.05$), except for strain 3Y2, which had a low ethanol yield ($Y_{\text{EtOH/S}} = 0.28$) but was included in the high stress tolerance group 1 (Fig. 5). Overall, the global analysis revealed the high tolerance of this species to osmotic and ethanol stresses, and the robustness of its ethanol production, as observed by Mendes et al. (2013) using a polyphasic approach to classifying *S. cerevisiae*, which included and their resistance to ethanol (10 and 14% v/v) in liquid medium. These authors concluded that phenotypic groups were formed according to the technological use of the strains (domestication), and this was independent of their geographic origin. Our results are in agreement with this observation and we were also able to assess the high phenotypic (stress tolerance) yeast variability of this fermentation system.

5. Conclusions

We found that fructose causes a dramatic decrease in the tolerance level and survival rate of all the yeasts tested, *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces*, a finding that to our knowledge has not been reported before, as usually tolerance/resistance determinations in the literature are carried out using solely glucose as the carbon source. Accordingly, there is a high risk of over-estimation of ethanol tolerance of a given strain when tested in the laboratory using only glucose, when it is intended for performing fermentation in fructose-rich substrates. The methodology and analysis procedure proposed here for stress tolerance quantification applied to several genera of yeasts is proposed for screening and selection of those strains with a high performance on fermentation processes, but also could be used as a tool for isolation of those variants/segregants of a yeast/bacteria population with a more resistant phenotype, allowing a direct calculation of the ratio of this subpopulation from the original sample.

Acknowledgements

We acknowledge the financial support of projects SIP2015-1149 and -1484 (Instituto Politécnico Nacional) and CONACyT Ciencia

Básica 2013-1-221289 (México) and for the doctoral scholarship granted to FJ De la Torre-González (CONACyT, México), as well as the sabbatical permit granted to CP Larralde-Corona by the Instituto Politécnico Nacional.

References

- Arroyo-López, F. N., 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. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 663–669.
- Carrasco, P., Querol, A., & Del Olmo, M. (2001). Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Archives of Microbiology*, 175, 450–457.
- Ding, J., Huang, X., Zhang, L., Zhao, N., Yang, D., & Zhang, K. (2009). Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(2), 253–263.
- Hedges, A. J. (2002). Estimating the precision of serial dilutions and viable bacterial counts. *Int J Food Microbiol*, 76, 207–214.
- Krzywinski, M., & Altman, N. (2014). Points of significance: Visualizing samples with box plots. *Nature Methods*, 11(2), 119–120.
- Lewis, J. A., Elkon, I. M., McGee, M. A., Higbee, A. J., & Gasch, A. P. (2010). Exploring natural variation in *Saccharomyces cerevisiae* to identify genes for increased ethanol resistance. *Genetics*, 186, 1197–1205.
- Martorell, P., Stratford, M., Steels, H., Fernandez-Espinar, M. T., & Querol, A. (2007). Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 234–242.
- Mendes, I., Franco-Duarte, R., Umek, L., Fonseca, E., Drumonde-Neves, J., Dequin, S., et al. (2013). Computational models for prediction of yeast strain potential for winemaking from phenotypic profiles. *PLoS ONE*, 8(7), e66523.
- Oliva-Hernández, A. A., Taillandier, P., Reséndez-Pérez, D., Narváez-Zapata, J. A., & Larralde-Corona, C. P. (2013). The effect of hexose ratios on metabolite production in *Saccharomyces cerevisiae* strains obtained from the spontaneous fermentation of mezcal. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*, 103(4), 833–843.
- Páez, J., Córdova, E., Soto, Ó., Barrio, E., Belloch, C., & Rutiaga-Quiñones, O. M. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* strains with robust responses to fermentation stresses isolated from the alcoholic fermentation of *Agave durangensis* musts. *African Journal of Microbiology Research*, 5(8), 865–871.
- Piper, P. W., Talreja, K., Panaretou, B., Moradas-Ferreira, P., Byrne, K., Praekelt, U. M., et al. (1994). Induction of major heat-shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical threshold. *Microbiology*, 140, 3031–3038.
- Santos, J., Sousa, M. J., Cardoso, H., Inácio, J., Silva, S., Spencer-Martins, I., et al. (2008). Ethanol tolerance of sugar transport, and the rectification of stuck wine fermentations. *Microbiology*, 154, 422–430.
- Semchyshyn, H. M., Lozinska, L. M., Miedzobrodzki, J., & Lushchak, V. (2011). Fructose and glucose differentially affect aging and carbonyl/oxidative stress parameters in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Carbohydrate Research*, 346, 933–938.
- Supanwong, K., & Pichai, K. (1995). Cost effective and convenient version of the drop plate method. *Journal of the Science Society of Thailand*, 21, 47–50.
- Tofalo, R., Chaves-López, C., Di Fabio, F., Schirone, M., Felis, G. E., Torriani, S., et al. (2009). Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. *International Journal of Food Microbiology*, 130, 179–187.
- Wimalasena, T. T., Greetham, D., Marvin, M. E., Liti, G., Chandelia, Y., Hart, A., Louis, E. J., Phister, T. G., Tucker, G. A., & Smart, K. A. (2014). Phenotypic characterisation of *Saccharomyces* spp yeast for tolerance to stresses encountered during fermentation of lignocellulosic residues to produce bioethanol. *Microbial Cell Factories*, 13, 47.
- Zinnai, A., Venturi, F., Sanmartin, C., Quartacci, M. F., & Andrich, G. (2013). Kinetics of D-glucose and D-fructose conversion during the alcoholic fermentation promoted by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115(1), 43–49.
- Zuzuarregui, A., & del Olmo, M. (2004). Analyses of stress resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*, 85, 271–280.