



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tlajomulco



TESIS

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LEVADURAS NATIVAS
PRESENTES EN LA FERMENTACIÓN ARTESANAL DEL
DESTILADO DE AGAVE PARA LA ELABORACIÓN DE RAICILLA**

QUE PRESENTA:

ING. MELISSA JUÁREZ AVIÑA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JUAN FLORENCIO GÓMEZ LEYVA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN AGROBIOTECNOLOGÍA**

TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA, JALISCO. JUNIO, 2022.

El presente trabajo se llevo a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Tlajomulco bajo la asesoría del Dr. Juan Florencio Gómez Leyva, con el apoyo económico de la beca CONACyT para posgrados nacionales.

DEDICATORIA

A mis papás, que siempre han sido ejemplares.
A ellos, que son mis mejores amigos.
Los amo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, que me da más de lo que merezco y hace todo posible.

Al Dr. Juan Florencio Gómez Leyva quien ha labrado en mí a una profesionista exitosa desde hace más de ocho años. Por su confianza, su tiempo, su dedicación, por compartirme su conocimiento y su experiencia. Por ser un excelente maestro y amigo. Gracias por seguir creyendo en mí.

A la Dra. Paola Andrea Palmeros Suárez por su invaluable aportación a mi trabajo, por compartirme su conocimiento y por inspirarme siempre, personal y profesionalmente.

A mis asesores, la Dra. Irma Guadalupe López Muraira y al Dr. Miguel Ángel Segura Castruita por sus aportaciones para el presente trabajo de investigación.

Al Dr. Alfredo Cachua Torres por acogerme con tanto cariño y ayudarme en la realización de mi tesis, por hacerme sentir parte del consejo por estos meses. Por compartirme su amplio conocimiento, su experiencia y su tiempo. Por su amistad. Sin él no hubiese sido posible éste trabajo.

Al Consejo Mexicano Promotor de la Raicilla y a sus integrantes que ayudaron directa o indirectamente a la realización de este trabajo, en especial a Manuel Salcedo, Benito Salcedo, Eduardo Sánchez, Don Rosalío, Gilberto García y Sergio Escoto. Gracias por permitirme trabajar en sus tabernas, por compartirme su conocimiento y experiencia. Gracias a Oscar y Clemen Landeros por su apoyo, a Francisco Códoba, y al Ing. Adrián. Al Sr. Jorge Orozco. Gracias a Luis Rey Salas y familia.

A mi mamá, a mi papá y a Pame que siempre estuvieron alentándome y reconociendo mis pequeños logros en el camino.

A Chata, Wichis y mi tío Gerardo, que velan siempre por mí, que me han depositado su confianza y apuestan por mi desarrollo personal y profesional.

A Monse, mi *soul mate*. 🍀

Al Instituto Tecnológico de Tlajomulco por ser mi alma máter y formarme desde 2011.
A CONACyT por la beca otorgada para realizar mis estudios de posgrado.

A la bebé Odalis, Elías, Efrén y las princesas Alex y Cinthya. 

A Verito, al Ruso. A Karen y Yuan los mejores amigos y colegas de la aldea.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular, y a mis amigas de generación de las cinco fantásticas. 

Y a todos los que creen y confían en la ciencia, gracias.

RESUMEN

La raicilla es una bebida alcohólica artesanal mexicana con reciente denominación de origen, la cual tiene un aroma y sabor característicos derivados del proceso de elaboración y fermentación del *Agave maximiliana*, *A. inaquidens* y *A. angustifolia*, que se encuentran en los estados de Jalisco y Nayarit. Esta bebida se obtiene a través de una serie de etapas que consisten en la jima de las piñas maduras de agave, la cocción de las mismas, el majado y la fermentación, en la cual se definen las características bioquímicas y organolépticas de dicha bebida y finalmente la destilación. Debido a que cada una de las etapas que se llevan a cabo para la elaboración de la raicilla se realiza de diferente manera de acuerdo al lugar en donde se realiza el proceso, el tipo de materia prima (especie de agave), los microorganismos que realizan el proceso de fermentación y el tipo de utensilios empleados para cada una de las etapas antes mencionadas, el presente trabajo tuvo como objetivo aislar las levaduras presentes en la etapa de fermentación para su identificación, caracterización y estimar su diversidad genética, respecto a las reportadas en fermentaciones de otras bebidas destiladas de agave y brindarle a la raicilla identidad comparativa entre las diversas bebidas mexicanas preparadas a partir de agave. Se obtuvieron muestras de fermento de raicilla (bagazo y jugo) de 6 tabernas de la Sierra Madre Occidental y la Costa Sur del estado de Jalisco, de donde se aislaron 30 levaduras. Se extrajo el DNA de las levaduras y posteriormente se amplificó la región ITS de DNAr. La secuenciación de la región ITS del DNAr permitió identificar tres géneros y cinco especies distintas de levaduras; *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces mikatae*, *Kluyveromyces marxianus* y *Pichia cecembensis*.

Se encontró un promedio de tres levaduras por taberna muestreada y tres de las cinco levaduras encontradas difieren de las reportadas en las fermentaciones de otras bebidas mexicanas destiladas de agave. Se generó un dendrograma con la información de los marcadores moleculares del gen que codifica para la enzima citocromo C oxidasa que muestra la diversidad genética de las levaduras y que además permitió agruparlas de acuerdo a su género en tres grandes grupos. Con el trabajo realizado, podemos demostrar la diversidad de microorganismos que participan en el proceso de fermentación de esta bebida característica de México así como la relación genética de los mismos con otros organismos que participan en este proceso para la elaboración de otro tipo de bebidas.

ABSTRACT

The raicilla is a Mexican artisan alcoholic beverage with a recent denomination of origin, which has a characteristic aroma and flavor derived from the process of elaboration and fermentation of the Agave maximiliana, A. inaquidens and A. angustifolia, which are found in the states of Jalisco and Nayarit. This drink is obtained through a series of stages that consist of the jima of the ripe agave pineapples, their cooking, crushing and fermentation, in which the biochemical and organoleptic characteristics of said drink are defined and finally distillation. Due to the fact that each one of the stages that are carried out for the elaboration of the raicilla is carried out in a different way according to the place where the process is carried out, the type of raw material (species of agave), the microorganisms that carry out the fermentation process and the type of utensils used for each of the aforementioned stages, the present work aimed to isolate the yeasts present in the fermentation stage for their identification, characterization and estimation of their genetic diversity, with respect to those reported in fermentations of other beverages distilled from agave and provide the raicilla with a comparative identity among the various Mexican beverages prepared from agave. Samples of raicilla ferment (bagasse and juice) were obtained from 6 taverns in the Sierra Madre Occidental and the South Coast of the state of Jalisco, where 30 yeasts were isolated. DNA was extracted from the yeasts and the rDNA region was subsequently amplified. The sequencing of the región ITS of rDNA allowed the identification of three genera and five different species of yeasts; *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces mikatae*, *Kluyveromyces marxianus* y *Pichia cecembensis*. An average of three yeasts were found per sampled tavern and three of the five yeasts found differ from those reported in the fermentations of other Mexican beverages distilled from agave. A dendrogram was generated with the information of the molecular markers of the gene that codes for the cytochrome C oxidase enzyme, which shows the genetic diversity of the yeasts and which also allowed them to be grouped according to their gender into three large groups. With the work carried out, we can demonstrate the diversity of microorganisms that participate in the fermentation process of this characteristic drink of Mexico, as well as their genetic relationship with other organisms that participate in this process for the elaboration of other types of beverages.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Dedicatoria	
Agradecimientos	
Resumen	
Abstract	
Índice de contenido	
Índice de figuras	
Índice de tablas	
1. INTRODUCCIÓN.....	15
2. ANTECEDENTES.....	17
3. JUSTIFICACION.....	20
4. HIPÓTESIS.....	20
5. OBJETIVOS.....	21
5.1 Objetivo general	21
5.2 Objetivo específicos	21
6. MARCO TEÓRICO	22
6.1 Los agaves en México.....	22
6.1.1 Los agaves en Jalisco.....	23
6.1.1.1 Abundancia y relatividad del agave en el estado de Jalisco	25
6.2 Bebidas destiladas de agave y sus regulaciones oficiales	25
6.3 La raicilla	28
6.3.1 Propiedades de la raicilla.....	32
6.3.2 Materia prima.....	34
6.3.3 Descripción del proceso artesanal.....	34
6.4 Levaduras en el proceso de fermentación.....	38
6.4.1 Fructanos de agave	41

6.5	Identificación genética de levaduras	42
6.6	Citocromo C oxidasa o complejo IV en levaduras	43
6.7	Diversidad biológica de levaduras	44
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
7.1	Sitios de muestreo.....	45
7.2	Microbiología general aplicada	48
7.2.1	Medios de cultivo	48
7.2.2	Aislamiento, crecimiento y extensión	48
7.2.2.1	Identificación morfológica de levaduras	49
7.2.2.2	Conservación de cepas en glicerol	50
7.3	Métodos moleculares	51
7.3.1	Extracción de DNA.....	51
7.3.1.1	Electroforesis en gel de agarosa.....	52
7.3.1.2	Cuantificación de DNA por espectrofotometría	53
7.3.2	Amplificación de la región ITS del DNAr mediante PCR	54
7.3.3	Purificación de los fragmentos amplificados por PCR	55
7.3.4	Obtención y análisis de secuencias	56
7.4	Diversidad genética mediante la amplificación del gen del citocromo oxidasa P450.....	56
7.5	Diversidad biológica de levaduras	58
8.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	58
8.1	Muestreo para el aislamiento de levaduras	58
8.2	Microbiología general aplicada	60
8.2.1	Aislamiento e identificación de levaduras	60
8.2.2	Elaboración de un cepario	63

8.3 Métodos moleculares	64
8.3.1 Extracción de DNA.....	64
8.3.2 Cuantificación de DNA por espectrofotometría	65
8.3.3 Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR	66
8.3.4 Identificación molecular de levaduras por secuenciación	67
8.3.5 Abundancia y relatividad de levaduras nativas	70
8.4 Diversidad genética de levaduras	74
8.5 Relación filogenética de levaduras.....	77
9. CONCLUSIONES	80
10. REFERENCIAS	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de la diversidad biológica de agaves en territorio mexicano y las regiones productoras de mezcales (CONABIO).....	23
Figura 2. Distintos tipos de agaves abundantes en Jalisco, utilizados para elaborar bebidas destiladas. a) <i>Agave angustifolia</i> . b) <i>Agave maximiliana</i> c) <i>Agave tequilana</i> Weber (CONABIO).....	24
Figura 3. Mapa que muestra las Regiones Protegidas por la Denominación de Origen Raicilla (MILPA A.C)	29
Figura 4. Logotipo del Conejo Mexicano Promotor de la Raicilla (CMPR)	30
Figura 5. Resumen de la Denominación de Origen Raicilla para su publicación en el Diario Oficial de la Federación, 2019.(Gourmet de México)	31
Figura 6. Características principales de la raicilla descritas en la Denominación de Origen , 2019. (Fuente: the mezcal culture insider).....	33
Figura 7. Jima de la piña de agave para la elaboración de raicilla A) Jima en la sierra B) Jima en la costa.	35
Figura 8. Proceso de cocción y tatemado de piñas de agave de A) raicilla de la sierra B) raicilla de la costa.....	36
Figura 9. Etapa de fermentación de mostos de agave A) Tambos de acero inoxidable en fermentación de la costa B) Tambos de plástico en fermentación de la sierra	37
Figura 10. Etapa de destilación de A) raicilla de la sierra B) raicilla de la costa ...	38
Figura 11. Proceso de la fermentación alcohólica.(Fuente:UNAM:Portal Académico)	40
Figura 12. Estructura molecular de los fructanos de agave (Mancilla, 2006).	41
Figura 13. <i>Agave maximiliana</i> maduro con formación de escapo floral (CONABIO)	42
Figura 14. Representación de las regiones ITS de rDNA de levaduras. (Vásquez, 2016).	43
Figura 15. Mapa de la ubicación geográfica de las tabernas muestreadas para la obtención de los mostos.....	46

Figura 16. Técnica de extensión en superficie de levaduras aisladas del mosto de agave en medio selectivo YPD con antibiotico para identificar colonias por su morfología.....	49
Figura 17. Tinción de levaduras con coloración diferencial para la observación de su morfología, vistas con el objetivo 100X.....	50
Figura 18. Morfología macroscópica de las levaduras aisladas de raicilla en medio selectivo YPD. A) <i>Pichia cecembensis</i> B) <i>Saccharomyces pastorianus</i> , C) <i>Kluyveromyces marxianus</i> , D) <i>Saccharomyces mikatae</i> y E) <i>Saccharomyces cereviseae</i>	61
Figura 19. Morfología de las levaduras aisladas de los mostos de raicilla teñidas con safranina. A) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , B) <i>Saccharomyces pastorianus</i> , C) <i>Saccharomyces mikatae</i> , D) <i>Pichia cecembensis</i> y D) <i>Kluyveromyces marxianus</i> . (izquierda: levaduras aisladas de raicilla, derecha: levaduras de referencia)	62
Figura 20. Gel de agarosa al 1.0% que muestra los productos de la extracción del DNA de 14 levaduras aisladas de fermentaciones para la elaboración de raicilla artesanal.....	65
Figura 21. Gel de agarosa al 1.5% que muestra los productos de la amplificación de la región ITS del rDNA de 14 levaduras aisladas de fermentaciones de tres tabernas C)TMCM, D)TXSG y E)TPCD con los iniciadores ITS1 e ITS4 que se compararon con un marcador de peso molecular de 100 pb.....	67
Figura 22. Alineamiento múltiple de las secuenciaciones de las levaduras aisladas de mostos de raiclla vs. la cepa TIPO reportada en el GenBank del NCBI. El porcentaje de identidad es de 95% en promedio.	69
Figura 23. Abundancia relativa (%) de las especies de levaduras identificadas en muestras de fermento de raicilla artesanal; SC: <i>Saccharomyces cereviseae</i> , SM: <i>Saccharomyces mikatae</i> , SP: <i>Saccharomyces pastorianus</i> , PC: <i>Pichia cecembensis</i> , KM: <i>Kluyveromyces marxianus</i> y su distribución en las tabernas muestreadas; A) TMSC, B) TSEH, C) TMCM, D) TXSG, E) TPCD y F) TSCT.	70

- Figura 24.** A), B), C) y D) Geles de agarosa al 1.5% que muestran los perfiles obtenidos con la PCR utilizando los oligos CYT P450 para la caracterización de las 30 levaduras aisladas de los mostos para la elaboración de raicilla. El tamaño de las bandas fue estimado en comparación con un marcador de 1kb.. 75
- Figura 25.** Análisis de conglomerados de los patrones generados con el uso de la COX de las 22 levaduras aislamientos de fermentación de raicilla artesanal y secuenciadas. El dendrograma se obtuvo mediante Kimura 2 y las distancias de las ramas expresadas como porcentaje de similitud. Las líneas discontinuas incluyen aislamientos pertenecientes al mismo género. Las especies dentro de los distintos géneros se muestran con el mismo color..... 76
- Figura 26.** Relación filogenética de los aislados de levadura en función de los análisis de unión de vecinos más cercanos de las ITS1–5.8S rDNA–ITS2. Los 22 aislamientos se agrupan en las cajas de líneas discontinuas que incluyen aislamientos pertenecientes al mismo género. Las cepas con el mismo color son muestras de la misma especie, y se compararon además con el material TIPO presente en el GenBank utilizando el algoritmo BLASTn. 78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la raicilla según su lugar de origen y materia prima de elaboración.	33
Tabla 2. Sitios de muestreo de los mostos fermentados de agave para la producción de raicilla artesanal y sus coordenadas de georreferenciación.	47
Tabla 5. Agaves utilizados en cada taberna para la elaboración de raicilla y su porcentaje como materia prima por ciclo de producción donde: TMCS: Taberna El Ciervo, Mascota. TSEH: Taberna Hda. Lalín, TMCM: Taberna Sierra Mascota, TXSG: El Tío Luis, TPCD: Taberna Don Chalío, TSCT: Taberna Tesoro del Oeste.	59
Tabla 6. Número de levaduras encontradas por muestra	60
Tabla 7. Cepas de levaduras aisladas de mostos de raicilla que constituyen el cepario del Laboratorio de Biología Molecular.	64
Tabla 8. Cuantificación de DNA relación 260/280 indica la concentración del mismo.	66
Tabla 9. Levaduras identificadas en los mostos de agave para la elaboración de raicilla y su porcentaje de identidad con las cepas reportadas el GenBank del NCBI.	68
Tabla 10. Comparación de levaduras aisladas en fermentaciones de bebidas destiladas de agave vs. levaduras aisladas de mostos de raicilla	73

1. INTRODUCCIÓN

El uso del Agave para la producción de alimentos o bebidas es de suma importancia económica a nivel nacional, debido a que a lo largo del territorio mexicano se producen diversas bebidas destiladas elaboradas a partir del mismo que forman parte de la riqueza gastronómica y cultural de nuestro país.

En el caso particular de Jalisco, existe una gran variedad de bebidas alcohólicas como el tequila, mezcal, pulque y raicilla, este último, aunque siendo menos conocido en el país, es una de las más representativas de Jalisco, ya que se produce en 16 municipios, entre los cuales se encuentran Cabo Corrientes, Mascota, Talpa de Allende, Puerto Vallarta, Atenguillo, Guachinango y San Sebastián del Oeste (Romo et al., 2016).

La raicilla es una bebida alcohólica de entre 35° y 45° GL de aroma y sabor derivado de la especie de agave empleado y del proceso de elaboración de la misma, diversificando sus cualidades por el tipo de suelo, clima, maestro raicillero, levaduras presentes en la fermentación, y otros factores que definen el carácter y las sensaciones organolépticas producidas por cada raicilla. Su sabor no sólo se caracteriza por los compuestos aromáticos provenientes de la materia prima y la fermentación alcohólica, sino también de la destilación (Christoph et al., 2007) y almacenamiento de la misma.

Ésta bebida se elabora en cuatro etapas principales que son la cocción y tatemado de las piñas de agave, la molienda de las mismas, la fermentación espontánea impulsada por la acción combinada de varias especies y la destilación (Gschaedler et al., 2008) De esta forma, cada taberna tiene su propio proceso de elaboración con adaptaciones particulares que caracterizan su producto final.

Dentro de los pasos dicha bebida, probablemente la parte más importante es la fermentación, debido a las características que otorga esta etapa al producto final, la cual es posible en gran parte gracias a las levaduras que aprovechan las fructosas que se derivada de la cocción del agave para producir el alcohol.

Es decir, que durante la fermentación de bebidas alcohólicas intervienen principalmente levaduras del género *Saccharomyces* y esto se debe, básicamente, a aspectos claves como la producción eficiente de etanol, la ausencia de producción de toxinas (inocuidad), la alta tolerancia al etanol y la capacidad de llevar a cabo la fermentación alcohólica incluso en presencia de oxígeno (Hurtzler, 2021), sin embargo, existen otros géneros de levaduras denominadas *no-Saccharomyces*, las cuales mediante la producción de enzimas y proteínas pueden enriquecer organoléptica y nutricionalmente las bebidas alcohólicas, lo que ayudaría a satisfacer el paladar de los consumidores más exigentes (Casas et al., 2015).

Por lo tanto, debido a que la raicilla se elabora a partir de diferentes tipos de agave, y que al elaborarlo el proceso de fermentación se da de forma espontánea por la acción simultánea de diversos microorganismos, es posible que la microbiota que interviene en dicho proceso sea distinta a la que está presente en otras bebidas fermentadas de agave.

Por ello, el objetivo del presente trabajo fue identificar y caracterizar la población de levaduras presentes en la fermentación de la raicilla artesanal a partir de *Agave maximiliana* y *A. angustifolia* encontrados en la Costa Sur y en la Sierra Madre Occidental del estado de Jalisco para brindarle identidad en comparación con otras bebidas destiladas de agave, utilizando diversos métodos bioquímicos y moleculares.

2. ANTECEDENTES

México es un país megadiverso y el que tiene mayor diversidad de agaves a nivel mundial. De un total de 210 especies, México tiene 159, es decir el 75%, con 119 especies endémicas (García-Mendoza, 2011) lo que representa gran parte de la diversidad de la flora mexicana. Los agaves tienen una gran importancia económica y cultural para numerosos pueblos indígenas y mestizos, que los han aprovechado durante siglos como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, cobijo, ornato, abono, construcción de viviendas, entre otros. (Garibay, 2019)

El agave también se emplea para producir bebidas alcohólicas destiladas tales como las bebidas tradicionales Tequila, Bacanora, Sotol, Raicilla y Mezcal (dependiendo de la región), todas ellas utilizan el mismo proceso para su elaboración. Estas bebidas destiladas varían en cuanto al tipo de agave utilizado (alrededor de 20 especies a lo largo y ancho del país) y nivel de industrialización del proceso. (Arrizón, 2020).

Se ha demostrado que el estudio de la microbiota que se encuentra presente en las fermentaciones para la elaboración de distintas bebidas destiladas a partir de agave es de gran importancia debido a que puede ser determinante las características del producto final, la cual participa en el proceso de fermentación, convirtiendo los azúcares encontrados en el agave en etanol. Adicionalmente, se ha observado que el uso en este proceso de cepas nativas seleccionadas, puede aumentar el potencial de los mostos y dar originalidad y calidad a las bebidas fermentadas (Miranda, 2015).

Se ha identificado que en las primeras etapas del proceso que se lleva a cabo para la elaboración de la raicilla es posible detectar la mayor diversidad de levaduras, y a medida que el proceso avanza, en las fases intermedia y final se incrementa la población de levaduras que se caracterizan principalmente por su alcohol-resistencia y alto poder fermentativo, entre las cuales desataca *Saccharomyces cerevisiae* (Esteve-Zaroso et al., 2001). También se considera que una mezcla compleja de compuestos volátiles como ácidos, alcoholes, ésteres y terpenos son

los componentes responsables del espíritu del aroma del destilado de agave (De León-Rodríguez et al. 2006)

Recientes estudios han mostrado que el papel de las levaduras que participan en la fermentación espontánea de diferentes géneros a *Saccharomyces spp.*, llevan a cabo el primer período de producción de aroma y pueden producir altas concentraciones de algunos compuestos con una notable influencia en la calidad sensorial del vino (Rojas et al., 2001; Clemente-Jimenez et al., 2005), y que además su crecimiento y abundancia en el caso particular del mosto del vino, suele estar limitado por su incapacidad para tolerar el ambiente del mosto en fermentación, sobre todo a su intolerancia al etanol (Pina, 2004).

Los géneros más comunes de levaduras que se han reportado en mezcales incluyen *Candida spp.*, *Clavispora spp.*, *Pichia spp.*, *Debaryomyces spp.*, *Rhodospiridium spp.*, *Rhodotorula spp.*, *Torulaspora spp.*, *Saccharomyces spp.* y *Zygosaccharomyces spp.* (Segura-García et al., 2017). También Verdugo-Valdez et al., (2011) reportaron los géneros de *Kluyveromyces spp.*, *Pichia spp.*, *Saccharomyces spp.*, *Zygosaccharomyces spp.*, *Clavispora spp.*, *Torulaspora spp.*, y *Candida spp.*, en mezcal de otra región del centro de México. En el caso particular del estado de Jalisco, se han identificado levaduras de los géneros *Saccharomyces spp.* y *Kloeckera spp.*, en jugos fermentados de *Agave tequilana* para la producción de Tequila (Flores et al., 2005)

En el caso particular de la raicilla, no se ha reportado ni analizado la microbiota que se encuentra presente en los mostos de agave, y que hace posible la fermentación en dicha bebida, por lo que se considera de suma importancia su identificación para analizar la diversidad poblacional de las levaduras de la región, además de la identificación de los factores que afectan el proceso como el contenido de azúcares, pH y temperatura y con lo cual se lograría utilizar las cepas nativas como iniciadoras de la fermentación en otros procesos (como elaboración de otras bebidas alcohólicas o productos fermentados de índole alimenticio) y por encontrarse mejor adaptadas y presentar mejores rendimientos (Mendoza, 2005).

En el tequila, elaborado con *Agave tequilana* Weber var azul se determinó la microbiota que participa en el proceso de su fermentación utilizando técnicas

moleculares, encontrando a *Saccharomyces cerevisiae* y especies de *Lactobacillus spp.* como especies nativas de una destilería, debido a que se encontraron en una serie de fermentaciones. También se han logrado aislar en fermentaciones con condiciones no controladas, diversas levaduras correspondientes a las especies de *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kudriavzevii* (Arrizón, 2020) y en fermentaciones de vino, además de levaduras, diversas bacterias como *Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, entre otras (Telechea, 2015).

En pulque, elaborado a partir de especies como *Agave salmiana*, *A. americana* y *A. potatorum* entre otras, se han reportado levaduras como *Torulaspota aquamelli* y otros microorganismos como *Acetobacter acetii*, *Micrococcus luteus*, además de *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Sarcina spp.*, *Pseudomonas spp.*, y *Streptococcus spp.* (Lappe et al., 2008).

En la fermentación espontánea del mezcal tamaulipeco y oaxaqueño, por ejemplo, se han encontrado microorganismos como *Candida spp.*, *C. magnolia*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *H. uvarum*, *H. vineae*, *K. marxianus*, *P. membranifaciens*, *T. delbrueckii*, *Candida parapsilosis*, *Clavispora lusitaniae*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia caribbica*, *P. guilliermondii*, y *S. cerevisiae* (Jaques et al., 2005; Oliva, 2007)

Para el caso de las levaduras, pueden aplicarse diversos métodos fisicoquímicos y moleculares para su identificación y caracterización, además de la observación en el microscopio con tinciones específicas como gram y/o colorantes sencillos como safranina, lugol o azul de metileno, a nivel genético suele recurrirse a métodos moleculares más específicos como es el caso de la extracción de ADN y su posterior secuenciación.

Para determinar la biodiversidad de especies a escala genética, pueden utilizarse métodos como analizar los cambios en la estructura del DNA o utilizar proteínas que codifican genes específicos, en la variación morfológica de caracteres cuantitativos, y en la separación de esta variación en sus componentes genético y ambiental, por ejemplo la medición del polimorfismo, el uso de secuencias, la hibridización y la electroforesis de proteínas, entre otros.

3. JUSTIFICACION

Debido a que la raicilla se elabora a partir de diferentes tipos de agave, y que al elaborarlo el proceso de fermentación se da de forma espontánea por la acción simultánea de diversos microorganismos, es posible que la microbiota que interviene en dicho proceso sea distinta a la que está presente en otras bebidas fermentadas de agave. Por lo tanto, el estudio detallado de la población de levaduras presentes en la fermentación de la raicilla artesanal, contribuirá al mejoramiento del proceso, la contribución al conocimiento y su asociación a la calidad del destilado final.

4. HIPÓTESIS

Las levaduras encontradas en las fermentaciones para la elaboración de raicilla artesanal en la Costa Sur del estado de Jalisco, difieren en cantidad y especie a las encontradas en las fermentaciones de la Sierra Occidental, las cuales son determinadas por la materia prima utilizada para la elaboración de la raicilla.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Identificar y caracterizar molecularmente las poblaciones de levaduras presentes en la fermentación para la elaboración de la raicilla artesanal de tabernas procedentes de la Costa y en la Sierra Occidental del estado de Jalisco.

5.2 Objetivo específicos

1. Aislar las levaduras presentes en el proceso de fermentación de raicilla en la región sierra y en la costa sur del estado de Jalisco.
2. Caracterizar morfológicamente las levaduras aisladas.
3. Identificar las especies de levaduras aisladas mediante secuenciación de la región ITS del rDNA
4. Establecer un análisis filogenético con las secuencias de la región ITS entre las levaduras presentes en fermentación de la raicilla
5. Estimar la diversidad biológica de las levaduras aisladas de mostos de raicilla mediante índices de similitud entre regiones
6. Determinar la diversidad genética de las levaduras aisladas empleando los marcadores moleculares CYTP450

6. MARCO TEÓRICO

6.1 Los agaves en México

Los agaves son un recurso filogenético estratégico para el país, pues representan una alternativa para el desarrollo sostenible desde el punto de vista ecológico y social, siendo de particular importancia su capacidad bioproductiva en ambientes extremos de alta temperatura y baja disponibilidad de agua (Martínez et al., 2007). El agave, considerado como una planta de vital importancia para la población indígena y mestiza es un recurso natural tradicionalmente utilizado para la elaboración de comidas, bebidas, medicina y fertilizantes (García Mendoza, 2007) Por otra parte, el sector productivo de agave es un importante motor económico para el estado de Jalisco, debido a que la demanda central en torno al cultivo del agave se ha centrado en la producción y elaboración de bebidas espirituosas pues México cuenta con más de 300 especies, de las cuales 5% se utilizan para elaborar bebidas destiladas, entre las que destacan el tequila, el mezcal, la bacanora y la raicilla (Fig.1). Los estados que cuentan con más diversidad de especies son: Oaxaca con 37, Puebla con 31, Sonora con 30, Durango con 26 y Querétaro con 24 (Chavez-Parga et al., 2016).

Adicionalmente, el sector del cultivo de agave es parte de una tradición que denota una serie de elementos simbólicos y representativos que caracterizan a las regiones productoras. La producción y consumo del mismo devela la identidad de los pueblos, sus costumbres, sus usos y prácticas, a pesar de la innovación tecnológica que ha permitido diversificar los productos, así como las prácticas artesanales en la elaboración y producción continúan consolidándose (Alonso, 2007). Además de la producción de bebidas destiladas, también ha habido un aumento reciente en el interés por el estudio de agave debido a su potencial para la producción de bioenergía y para aplicaciones biotecnológicas (Simpson et al., 2011), por ejemplo volverlo genéticamente resistente a plagas y enfermedades, el aislamiento de

género *Agave* son: Cuautitlán, Talpa de Allende y Tequila con seis especies cada uno, seguido de Cabo Corrientes, Mascota, Tolimán y Zapopan con cuatro especies cada uno, aproximadamente (Vázquez-García *et al*, 2007).

Algunos municipios de Jalisco se reconocen por su paisaje agavero y la destilación de agave, como Teuchitlán, Magdalena, Tequila, Amatitán y El Arenal (González, 2006) Otros, no tan conocidos, pero que se dedican al cultivo y destilación de agave en menor escala son Tonaya, Tuxcacuesco, Tolimán, San Gabriel, El Grullo, Autlán de Navarro, Sayula, El Limón y Zapotitlán de Vadillo (Moreno, 2010, Álvarez, 2013) Diversas especies de agaves silvestres se utilizan para la elaboración de bebidas destiladas como el tequila, el mezcal, el bacanora y la raicilla (Fig.2). Algunas de estas especies de agave crecen en varios estados de la República como son el *Agave maximiliana* Baker, *A. inaequidens* Koch, *A. angustifolia* Haw y *A. rhodacantha*, sin embargo, otros más son endémicos de Jalisco, tal es el caso del *A. valenciana* Cházaro y *A. salmiana*, que se les conoce en pocos municipios y tienen restricción regional. (Martínez *et al.*, 2007)



Figura 2. Distintos tipos de agaves abundantes en Jalisco, utilizados para elaborar bebidas destiladas. a) *Agave angustifolia*. b) *Agave maximiliana* c) *Agave tequilana* Weber (CONABIO).

6.1.1.1 Abundancia y relatividad del agave en el estado de Jalisco

Un 24% de las especies de agave que se encuentran en Jalisco son endémicas. Más de la mitad de las especies silvestres de agave en Jalisco fueron consideradas extremadamente raras pues presentan una frecuencia menor al 2% entre los que podemos encontrar *A. valenciana*, *A. cantala*, *A. salmiana*, *A. chazaroi* entre otros. Una cuarta parte de las especies se consideran raras con más del 2% y menos del 3% de frecuencia como *A. guadalajarana*, *A. rhodacantha*, *A. vilmoriniana*, y otros más. Otra cuarta parte se consideran agaves abundantes entre los que destacan *Agave angustifolia* (21%), *A. maximiliana* (10%), *A. inaquidens* (6%) y *A. colimana* (6%). (Vázquez et al., 2007)

6.2 Bebidas destiladas de agave y sus regulaciones oficiales

Las bebidas elaboradas a partir de agave forman parte de la historia y tradición nacional. Las denominaciones de origen y las normas oficiales mexicanas son herramientas fundamentales que permiten ceñir los procesos para mantener la pureza y tradición en la elaboración de estos destilados (Carrillo, 2007). Estas normas son de observancia obligatoria expedidas por las dependencias competentes, que tienen entre sus finalidades establecer las características que deben reunir los procesos o servicios cuando estos puedan constituir un riesgo para la seguridad de las personas o dañar la salud humana (Secretaría de Salud, 2015). Una denominación de origen (DO) no solo dota de identidad a una región determinada, sino que representa un motor para la industria y la economía de la zona. A su vez, el consumidor de un producto protegido por una DO tendrá la certeza de que ha adquirido un producto auténtico que cuenta con altos estándares de calidad. Las denominaciones de origen se encuentran reguladas por las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) (Urquiza, 2021). La denominación de origen beneficia de manera directa a los productores, pues les permite reconocer la calidad, la

tradición y la originalidad de la bebida, así facilitará su acceso a los mercados de México y el mundo.

En México se elaboran a partir de agave cuatro bebidas destiladas: mezcal, tequila, raicilla y bacanora. Los tres primeros son mezcales; de las bebidas mencionadas anteriormente se encuentran protegidas y registradas en la Organización Mundial de la Protección Intelectual bajo los números 669 el tequila, 731 mezcal, y 841 bacanora, mientras que la raicilla se encuentra por el momento protegida por el Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual (IMPI, 2022).

El tequila se obtiene de la destilación de azúcares del agave azul, puede contener 100% de esta materia prima (fructano de agave) o una proporción no mayor a 49% de otros azúcares (Macías, 2009). En la NOM-006-SCFI-2005 podemos encontrar las especificaciones para la elaboración del tequila así como sus características; en la cual se indica que sólo se puede cultivar agave para la elaboración del tequila dentro del territorio mexicano protegido por la denominación de origen “Tequila” (DOT), que comprende a los 125 municipios del estado de Jalisco, ocho de Nayarit, siete de Guanajuato, 30 de Michoacán y 11 de Tamaulipas. Por su lugar de origen y evolución histórica, en Jalisco se localiza la actividad más importante de esta industria, con 85.59% del agave tequilero en 2006, sobre todo en la región Valles o región de origen, así como en la región Altos Sur, que en la actualidad es la principal región donde se cultiva el agave (Macías, 2009).

La palabra mezcal proviene del náhuatl *mexcalli*, compuesta por *metl* (maguey) e *ixcalli* (cocido). Por tal razón, se llama mezcal, ya que se elabora a partir de la destilación del corazón del maguey. El 90% del mezcal que se produce en México es elaborado artesanalmente por familias mezcaleras, quienes muchas veces utilizan sus propias casas y haciendas para la producción de este destilado. Además, la cosecha de agave es una tradición arraigada en muchos estados, como Oaxaca, Michoacán, Puebla y Guanajuato y su cultivo es un acto solemne, de unidad, y de comunión con la tierra, así como un signo de festividad de las culturas

originarias de estos territorios. En la NOM-070-SCFI-1994 se encuentran los lineamientos para la producción del mezcal (Chávez,2021)

El bacanora debe su nombre a un municipio de Sonora, en donde se elabora este destilado de mostos de *Agave angustifolia* Haw, cultivado y recolectado en 35 municipios del mismo estado, siguiendo una importante tradición en su región (Carrillo, 2007). En la NOM-168-SCFI-2004 se encuentran todos los aspectos relacionados con la regulación de esta bebida.

La raicilla cuenta con una denominación de origen, dada a conocer el 28 de Junio de 2019 por el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) mediante la Declaración General de Protección de la Denominación de Origen “Raicilla” y a su vez en el Diario Oficial de la Federación. Recientemente se elaboró el Proyecto de Norma Oficial Mexicana, para el cual se instaló un Grupo de Trabajo con la participación voluntaria de integrantes del Consejo Mexicano Promotor de la Raicilla, A. C., del Consejo Regulador del Mezcal, A. C., del Consejo Regulador del Tequila, A. C., del Gobierno del estado de Jalisco, diversas destilerías de raicilla, de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Occidente y del Instituto Tecnológico de Tlajomulco, entre otros. El PROY-NOM-257-SE-2021 de Bebidas alcohólicas habla sobre la denominación de la Raicilla, así como sus especificaciones, información comercial y métodos de prueba, y se publicó en el Diario Oficial de la Federación el día 27 de abril de 2022.

De entre el tequila, el mezcal, el bacanora y la raicilla, sólo los lotes de tequila mantienen una calidad sensorial constante, ya que se produce de forma industrializada, en tanto que algunos mezcales, el bacanora y la raicilla, tienen variaciones en la calidad sensorial porque que son elaboradas en un proceso artesanal y con una fermentación espontánea impulsada por la acción combinada de varias especies (García, 2012).

Para regular el cumplimiento de las NOM que rigen a dichas bebidas existen organismos de certificación acreditados, que junto con PROFECO verifican y vigilan que el producto mantenga los estándares de calidad requeridos. De esta manera, en 1993, se creó el Consejo Regulador del Tequila, en el año 2000 el Consejo Mexicano Promotor de la Raicilla A.C., en 2003 el Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal A.C. y en 2006 el Consejo Sonorense Promotor de la Regulación del Bacanora (Gobierno de México,2021).

6.3 La raicilla

La raicilla es una destilado de agave artesanal, ancestral y mexicana, un líquido incoloro regularmente aunque puede variar su tonalidad cuando se madura en recipientes de madera, o cuando se aboca sin madurarlo. Es una bebida de aroma y sabor derivado de la especie de agave empleado y del proceso de elaboración de la misma, diversificando sus cualidades por el tipo de suelo, clima, productor (maestro raicillero), graduación alcohólica, levaduras presentes en la fermentación, y otros factores que definen el carácter y las sensaciones organolépticas producidas por cada raicilla (Denominación de Origen Raicilla, 2019)

Esta bebida se produce en 15 municipios del estado de Jalisco (Fig.3), entre los que se encuentran Atengo, Chiquilistlán, Juchitlán, Tecolotlán, Tenamaxtlán, Puerto Vallarta, Cabo Corrientes, Tomatlán, Atenguillo, Ayutla, Cuautla, Guachinango, Mascota, Mixtlán, San Sebastián del Oeste y Talpa de Allende. También se produce en el municipio de Bahía de Banderas, en el estado de Nayarit (DOF, Denominación de Origen Raicilla, 2019).

La raicilla cuenta con denominación de origen desde el 28 de junio de 2019, otorgada por el Gobierno Mexicano para ser producida en las zonas de la Sierra Madre Occidental, la Sierra de Amula, la Costa Sur y la Costa Norte del estado de Jalisco (Denominación de Origen Raicilla, 2019).

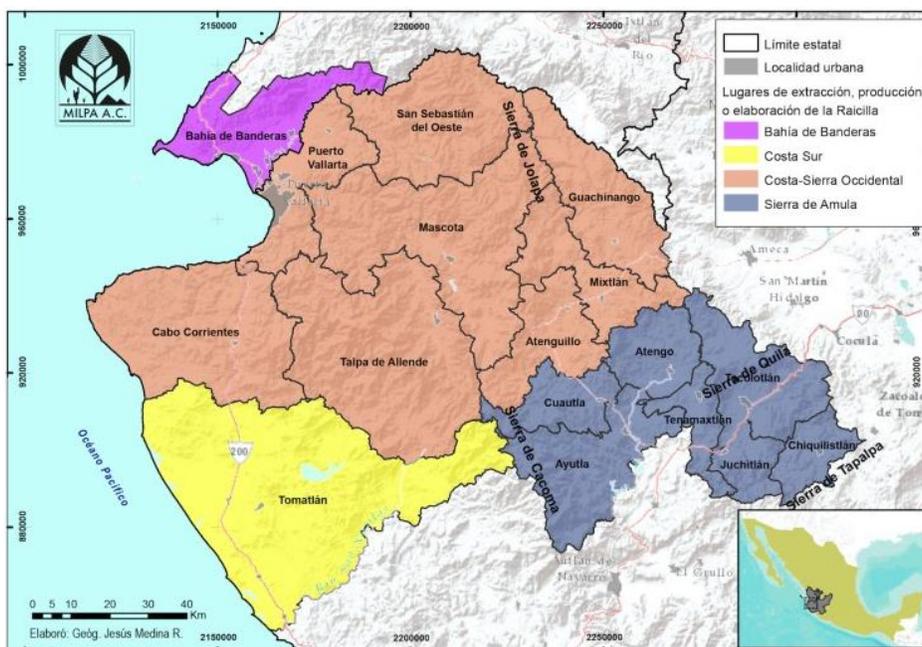


Figura 3. Mapa que muestra las Regiones Protegidas por la Denominación de Origen Raicilla (MILPA A.C)

Como se mencionó anteriormente, en el año 2000 se creó el Consejo Mexicano Promotor de la Raicilla A.C (Fig. 4) que está integrado por productores, envasadores y comercializadores de esta bebida, con el objetivo de impulsar y promover la elaboración de estudios, proyectos, programas integrales y convenios sustentables conjuntamente con productores, comercializadores, universidades, centros de investigación, y las dependencias de los tres niveles de Gobierno. También se encuentra entre sus objetivos el impulsar los estudios y gestiones para la determinación de normas de calidad aplicables al producto y a la "Denominación de Origen". (DOF, Denominación de Origen Raicilla, 2019).



Figura 4. Logotipo del Consejo Mexicano Promotor de la Raicilla (CMPR)

Actualmente existen cerca de 90 maestros raicilleros, que producen aproximadamente 250, 000 litros anuales de esta bebida, lo que la vuelve un producto artesanal con un valor agregado. A raíz de la declaratoria de la Denominación de Origen (Fig.5), el costo de dicha bebida se incrementó de manera significativa (Comunicación personal).



Figura 5. Resumen de la Denominación de Origen Raicilla para su publicación en el Diario Oficial de la Federación, 2019.(Gourmet de México)

Referente a sus inicios, el nombre de la bebida raicilla no tiene un origen etimológico claro, sin embargo, existen múltiples versiones que podrían mostrar los orígenes de la misma. Una de ellas se atribuye a la época colonial, cuando los mineros de la zona de Mascota y San Sebastián del Oeste, en el estado de Jalisco, consumían raicilla como bebida predilecta. Cuando llegaron los españoles a conquistar dichas tierras, prohibieron las bebidas alcohólicas locales para dar a conocer e imponer las propias importadas de Europa (Dueñas, 2021).

Los productores de raicilla de esa época, decían que al momento de jimar la piña de agave levantaban raíz, debido a que se encontraba muy cerca del suelo, por lo que la misma gente comenzó a llamarla “Raicilla”. Los españoles escuchaban

nombrar a dicha bebida, pero no se lo atribuían a una bebida alcohólica, pues pensaban que era un tipo de infusión o té. De esta forma se logró burlar la prohibición del consumo de la misma en esa época. Dicha bebida se ha posicionado en los últimos veinte años entre los destilados de agave preferidos de los consumidores, seguido de los más conocidos como el tequila y los mezcales (Arredondo, 2021).

6.3.1 Propiedades de la raicilla

Es una bebida de origen orgánico. Los agaves que se utilizan para su elaboración, ya han sido domesticados, y una de sus características principales es que su reproducción es por medio de semillas. El proceso en general ha sido modificado por los productores *a priori* buscando mejorar sus rendimientos y productos finales. (Comunicación personal). Según el PROY-NOM-257-SE-2021, para la elaboración de esta bebida 100% de agave, se permite la mezcla entre distintas destilaciones de agaves silvestres o cultivados. Asimismo, está permitida la mezcla de las variedades de estas especies con el objeto de obtener un sabor determinado.

En cuanto a su sabor, la raicilla es dulzona y su color es amarronado o blanco. Si proviene de la Sierra, suele tener un sabor más cítrico, en cambio si su origen es de la Costa, priman los sabores a minerales y frutas tropicales (Córdoba, 2020). Regularmente se encuentra en la forma pura, pero se pueden encontrar nuevas propuestas de raicilleros que juegan con los ingredientes y fusionan sabores, por ejemplo, con albahaca, limón, yerbabuena, algunas flores, cuastecomate, entre otros; así como también pueden realizarse destilaciones adicionales agregando ingredientes para incorporar sabores (comunicación personal).

Otro de sus distintivos es su porcentaje de alcohol, pues se encuentra en promedio entre 35° y 55°, pero existen algunas con un porcentaje aún mayor. Su contenido de metanol debe estar entre 30 mg/100 ml. mínimo y máximo 300 mg/100 ml (DOF, 2019).

DENOMINACIÓN DE ORIGEN



Figura 6. Características principales de la raicilla descritas en la Denominación de Origen , 2019. (Fuente: the mezcal culture insider)

Tabla 1. Clasificación de la raicilla según su lugar de origen y materia prima de elaboración.

Tipo de Raicilla	Zona Geográfica	Tipo de Agave
Raicilla de la Sierra	Chiquilistlán-Mascota, San Sebastián del Oeste.	Agaves <i>maximiliana</i> Baker, <i>Inaequidens</i> Koch y <i>Valenciana</i>
Raicilla de la Costa	Bahía de Banderas, Puerto Vallarta, Cabo Corrientes	Agaves <i>angustifolia</i> Haw, y <i>Rhodacantha</i>

6.3.2 Materia prima

En la elaboración de la raicilla, con excepción del "*Agave tequilana* weber Azul", están permitidos todos los magueyes o agaves cultivados o silvestres, cuyo desarrollo biológico haya transcurrido en el área geográfica correspondiente al territorio señalado en el documento de la declaración de la denominación de origen, entre ellos:

- *Agave maximiliana* Baker, *Agave inaequidens* Koch, *Agave valenciana* (en la Sierra).
- *Agave angustifolia* Haw y *Agave rhodacantha* (en la Costa).

Los magueyes o agaves deben estar maduros para cosecharse, cuando se da el inicio de la floración (la formación del escapo floral) marca el final de la formación de hojas (pencas) y el comienzo de la despolimerización de los fructanos; es decir, el consumo de las sustancias de reserva en la formación y sostenimiento de los órganos reproductores (Godínez, 2016).

La materia prima debe someterse al procedimiento que se especifica en la Declaración General de Protección de la Denominación de Origen "RAICILLA" publicado en el Diario Oficial de la Federación. Al tratarse de un proceso artesanal, la producción se deriva de agaves producidos de forma orgánica, y todos los residuos de las diferentes etapas de elaboración son aprovechados, principalmente como compostaje, alimento para ganado y producción de fertilizantes (Salas, 2019).

6.3.3 Descripción del proceso artesanal

El proceso de producción es 100% artesanal y sustentable. El proceso de elaboración de la raicilla consta aproximadamente de 6 etapas, recordando que puede variar debido a que cada productor adapta el proceso según sus necesidades. Para la selección de los agaves, se deben identificar aquellos que se encuentren maduros. La aparición de la flor o cuando el agave se encuentra en

etapa de floración es el momento en el que se realiza la cosecha, independientemente del tamaño del mismo o la edad que tengan. Posteriormente se realiza la jima, que es el proceso de cortar las pencas u hojas del agave hasta dejar el tallo o piña sin restos de hojas (Fig. 7) (comunicación personal).

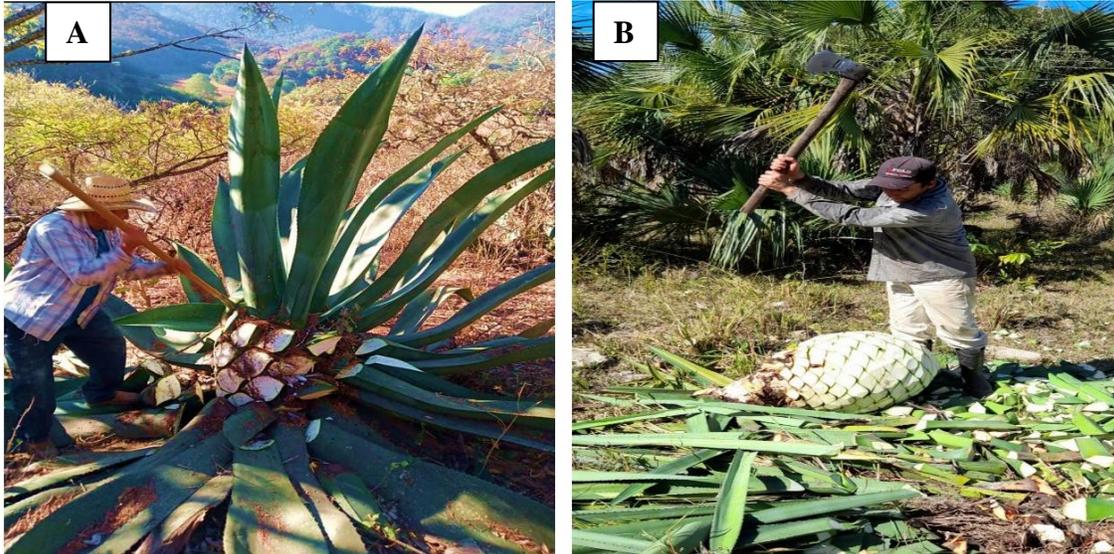


Figura 7. Jima de la piña de agave para la elaboración de raicilla A) Jima en la sierra B) Jima en la costa.

Una vez obtenida la piña, se continúa con el proceso de cocción y tatemado, la cual se realiza en hornos que regularmente están hechos de piedra de río o ladrillo, son hornos de mampostería tipo panadero en la sierra y hornos de pozo en la costa, previo a la cocción de las piñas, se calientan los hornos con leña de roble o encino obtenida de árboles caídos y se tapan durante 3 días, alcanzando así una temperatura aproximada de 1200 °C. El horno se destapa para agregar las piñas para cocer, y la temperatura va disminuyendo horas (Fig. 8). Se sella el horno y se mantiene cerrado durante 48 (comunicación personal).

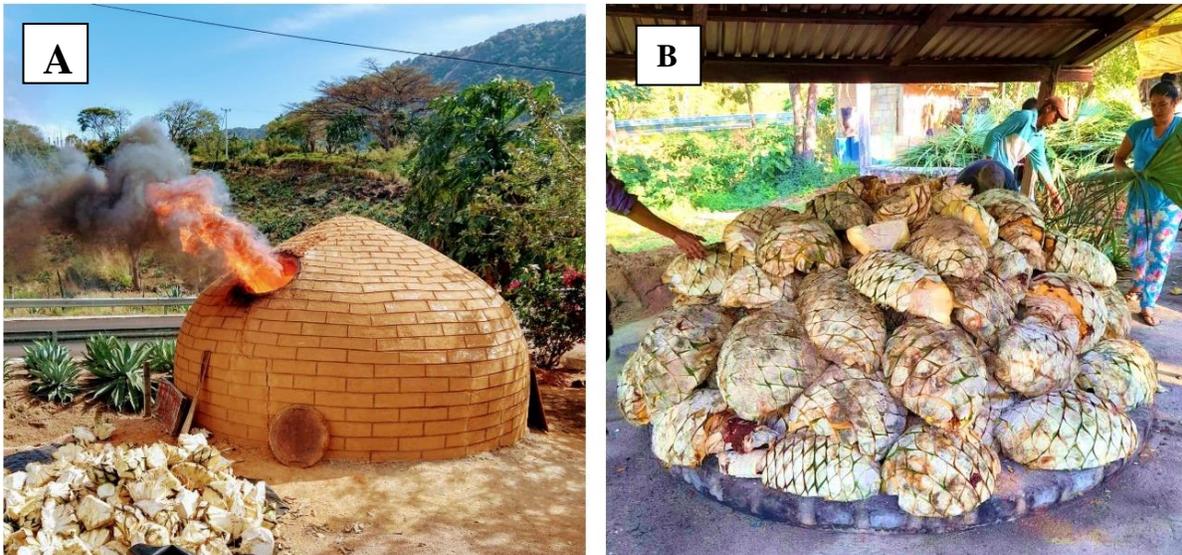


Figura 8. Proceso de cocción y tatemado de piñas de agave de A) raicilla de la sierra B) raicilla de la costa

Se retiran las piñas del agave cocidas y/o tatemadas del horno y el majado puede ser en tahona, molino egipcio o chileno, desgarradora, trapiche, tren de molinos, desgarradora de golpe, o con mazo sobre canoa o pileta de madera, dependiendo el tipo de raicilla que se elabora y cuyas especificaciones también se describen en el documento del Diario Oficial de la Federación. La fibra y los jugos se pasan a los tambos de fermentación, proceso que se realiza de forma natural por la acción conjunta de varios microorganismos especialmente levaduras y bacterias. La fermentación del mosto para la elaboración de raicilla puede darse en recipientes de madera o barro, piletas de mampostería o tanques de acero inoxidable, así como en oquedades en piedra. El tiempo para la fermentación varía dependiendo la temperatura del medio ambiente, si es época de invierno puede durar hasta 10 días. En época de calor hasta 6 días (comunicación personal).



Figura 9. Etapa de fermentación de mostos de agave A) Tambos de acero inoxidable en fermentación de la costa B) Tambos de plástico en fermentación de la sierra

El destilador puede estar conformado por alambiques, donde los vapores se recogen en la parte superior del destilador y mediante un serpentín introducido en un recipiente se le circula agua para convertir los vapores en líquido, que es la raicilla. También pueden utilizarse destiladores continuos, discontinuos o columnas de cobre o acero inoxidable. De igual forma se puede destilar con fuego directo en alambiques de caldera de cobre u olla de barro y montera de barro, madera, cobre o acero inoxidable (Fig.10) hasta 500 litros. (Consejo Mexicano Promotor de la Raicilla, 2021).



Figura 10. Etapa de destilación de A) raicilla de la sierra B) raicilla de la costa

6.4 Levaduras en el proceso de fermentación

Las levaduras, además de ser un modelo de la investigación biomédica, tienen diversas aplicaciones en la industria alimentaria, en agricultura y la producción de etanol combustible (Vasquez, 2016). Dentro del proceso de elaboración, probablemente la parte más importante es la fermentación debido a las características que otorga esta etapa al producto final, el cual es posible en gran parte gracias a las levaduras, que son hongos unicelulares del grupo de los Ascomicetos cuya forma de crecimiento es unicelular, cuya pared celular representa entre 20-30% de la célula en peso seco y está compuesta de polisacáridos complejos de β -glucanos, proteínas y quitina. (Uscanga, 2005).

El estudio de los caracteres del asco y ascosporas de las levaduras se realiza bajo montaje directo con objetivo de inmersión o a través de coloraciones, como la de Schaeffer-Fulton modificada por Wirtz, con la cual las ascosporas se tiñen de verde-azulado y el cuerpo vegetativo de rojo, también coloraciones más simples con colorantes como safranina, azul de metileno, entre otros (Varillas, 2019).

Diversos estudios han indicado que existen alrededor de 1,500 especies de levaduras conocidas en la actualidad, y se estima que menos del 1% de todas las especies han sido identificadas. La presencia de dichos microorganismos depende de diversos factores, como lo son la temperatura, el pH, la humedad y la disponibilidad de azúcares simples (Kurtzman et al., 2011).

Las levaduras juegan un papel fundamental en el proceso de elaboración de bebidas alcohólicas, pues son capaces de iniciar el proceso de descomposición de distintas sustancias orgánicas, particularmente azúcares y carbohidratos, obteniendo así como productos finales energía, CO₂ y produciendo de esta forma diversos tipos de alcoholes (Fig. 10). Por ello se consideran el factor más importante de la etapa de fermentación, pues 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 (Vargas, 2001; Loviso, 2018).

La fermentación alcohólica es un proceso en el cual el ácido pirúvico proveniente de la glucólisis es descarboxilado por el acetaldehído en una reacción catalizada por la enzima piruvato decarboxilasa y TPP (Tiamina pirofosfato); el acetaldehído es reducido a etanol por una enzima denominada alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD, resultando en la reoxidación del NADH₂ formado durante la glucólisis. (Fig.11)

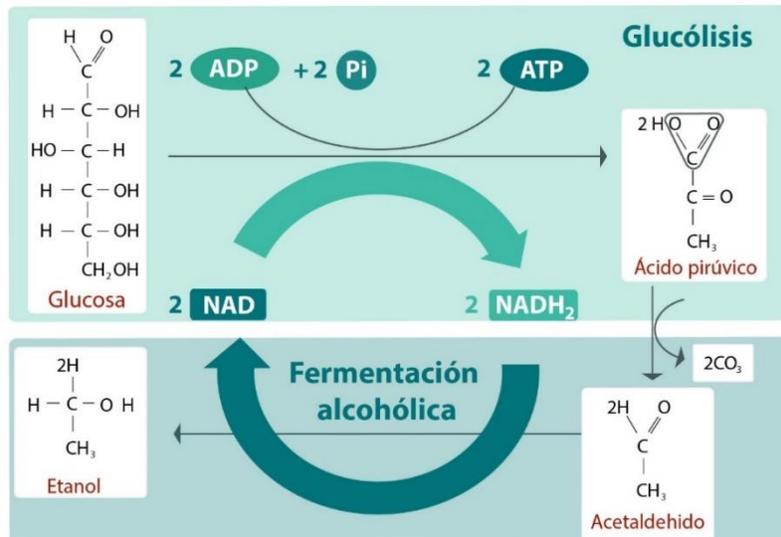


Figura 11. Proceso de la fermentación alcohólica.(UNAM:Portal Académico)

Los sustratos fermentables están al mismo nivel de oxidación que el material celular, y son la principal fuente de carbono para la biosíntesis. La fermentación tiene como principal contribución la producción de ATP, por fosforilación a nivel del sustrato (Carbonero, 1975).

En la primera etapa de la fermentación, podemos encontrar levaduras non-Saccharomyces, que brindan características fisicoquímicas específicas a los productos finales, como *Hanseniaspora*, *Candida*, *Issatchenkia*, *Metchnikowia*, y *Pichia*, que le confieren particularidades a las bebidas (Segura, 2010). Posteriormente, estos géneros reducen su número dando paso al crecimiento de otras especies más tolerantes al etanol como *Saccharomyces* (Ribereau, 1985).

Además, en los procesos fermentativos de las bebidas alcohólicas de agave, se encuentran presentes diferentes tipos de bacterias, siendo las bacterias lácticas y las de ácido acético las principales (Lappe-Oliveras et al., 2008).

En el caso particular de la raicilla, la fermentación se genera de forma espontánea por las levaduras provenientes de la planta (*Agave*) y del ambiente dentro del sitio de producción, sin embargo, existen productores que utilizan un preinóculo de la fermentación previa para acelerar el proceso (comunicación personal).

Normalmente, la fermentación alcohólica se asocia a las levaduras *Saccharomyces* spp. y se ha comprobado su efectividad utilizando varios medios ricos en hidratos de carbono como jugos, melazas, residuos lignocelulósicos, entre otros. Sin embargo, las levaduras llamadas *No Saccharomyces*, como *Candida* spp., *Kloeckera* spp., *Hanseniaspora* spp., *Zygosaccharomyces* spp., *Torulaspora* spp., *Pichia* spp. y más, están recibiendo cada vez más atención debido a que han presentado numerosas contribuciones en cuanto a los altos rendimientos en el producto final, ya sea por la cantidad de etanol que producen, o por características organolépticas que brindan a las bebidas (Jolly et al., 2006).

6.4.1 Fructanos de agave

El principal sustrato de las levaduras en el proceso de fermentación alcohólica son los azúcares que se derivan de la cocción del agave. Los fructanos de agave son polímeros ramificados de fructosa, unidos por enlaces glucosídicos fructosa-fructosa β (2-1) y β (2-6), son comúnmente solubles en agua, y se encuentran como carbohidratos de reserva en aproximadamente el 15% de las plantas de floración (Fig. 12). Los fructanos se hidrolizan a pH ácidos, los cuales forman un jarabe de fructosa, que es la principal fuente de carbono para las levaduras en el proceso de fermentación (Ruíz, 2016).

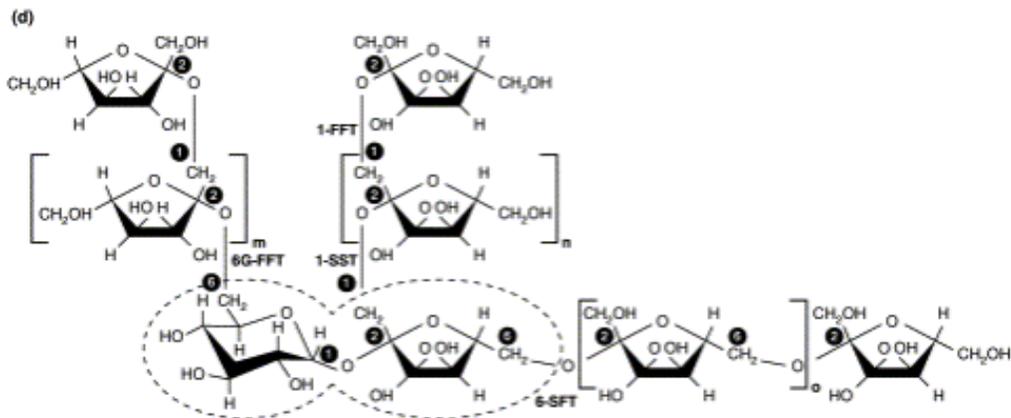


Figura 12. Estructura molecular de los fructanos de agave (Mancilla, 2006).

En el caso de los agaves, el inicio de la floración (cuando aparece el quiote) marca el final de la formación de las pencas y el comienzo de la despolimerización de los fructanos (Fig. 13) ; es decir, el consumo de las sustancias de reserva en la formación y sostenimiento de los órganos reproductores (Trujillo,2009).



Figura 13. *Agave maximiliana* maduro con formación de escapo floral (CONABIO)

6.5 Identificación genética de levaduras

En la industria alimenticia, las levaduras se utilizan como fuente de obtención de vitaminas del complejo B, pigmentos, cofactores, extractos y producción de biomasa y biocombustible por su producción de etanol (Valdés, 2016), entre otros. Por ejemplo en el caso de las bebidas fermentadas a partir de agave, la calidad y la cantidad del producto final dependen de la dinámica y la frecuencia de los microorganismos (Vásquez, 2016) presentes en el proceso fermentativo. Por este motivo, este sector productivo ha recurrido a diversas técnicas de caracterización

molecular de levaduras, las cuales se basan en el análisis de una o dos regiones del DNA ribosómico: secuenciación de los dominios D1/D2 del gen 28S rRNA y/o de la región ITS (espacios intergénicos ITS1 e ITS2 y que incluye el gen 5,8S rRNA). Los genes ribosomales que codifican las subunidades 5.8S, 18S, y 26S (Fig.14) están dispuestos en tándem formando unidades de transcripción que se repiten en el genoma de las levaduras entre 100 y 200 veces.

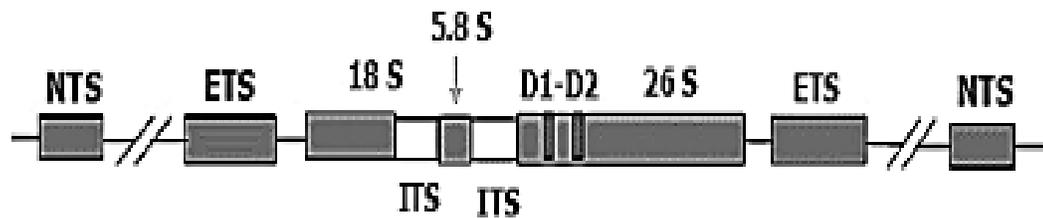


Figura 14. Representación de las regiones ITS de rDNA de levaduras. (Vásquez, 2016).

El gen 5.8S no se incluye en la unidad de transcripción previamente descrita pero aparece adyacente en la misma unidad de repetición en tandem en el caso de las levaduras (Alvares, 2011). La región ITS ha sido considerada como un código de barras en hongos y muy útil para la identificación de levaduras (Schoch et al., 2012).

6.6 Citocromo C oxidasa o complejo IV en levaduras

Para determinar la diversidad genética de las levaduras aisladas se recurrió a un método de medición de diversidad a escala genética como son las enzimas de la citocromo C oxidasa que codifican genes específicos para levaduras. La citocromo C oxidasa (CO), que es el complejo final de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, y que se conoce, por estudios en levaduras, que para el ensamblado de COX son necesarias numerosas proteínas que participan en la inserción de las subunidades y en la síntesis e inserción de los cofactores, es decir, la CO produce proteínas específicas que permiten identificar y diferenciar a las levaduras entre sí. (Mansilla, 2018)

La membrana externa de las mitocondrias contienen proteínas de transporte especializadas que permiten el paso de moléculas desde el citosol hacia el exterior del espacio intermembranal y posteriormente a la matriz mitocondrial. En la membrana interna, se encuentran diversos complejos protéicos, entre ellos los de la cadena respiratoria (complejo I o NADH deshidrogenasa, II o succinato deshidrogenasa, complejo III o citocromo *bc1* y el complejo IV o citocromo C oxidasa).

Se ha demostrado que en levaduras como es el caso de *Saccharomyces cerevisiae* el complejo I no está presente, el flujo de electrones en sus otros tres complejos se da a través de la membrana interna mitocondrial, que genera el gradiente de protones necesario para proveer la energía para la síntesis de ATP. (Zurita, 2007) Diversos estudios han demostrado que el complejo IV o citocromo C oxidasa (COX) de *Saccharomyces cerevisiae* es un complejo enzimático de 12 subunidades, que forman parte de la cadena respiratoria. Las subunidades I, II, y III (Cox1p, Cox2p y Cox3p) forman el centro catalítico de la citocromo C oxidasa. Estas subunidades son codificadas por el genoma mitocondrial pues se sintetizan en la mitocrondria, a diferencia de las otras subunidades que se importan del citosol (Clemente, 2012). La citocromo C oxidasa esta dotada de gran complejidad estructural, de ella se han reconocido cerca de 20 factores nucleares que intervienen en su biogénesis y en su estabilidad. Poco se conoce sobre el ensamblaje de la COX en *S. cerevisiae*, además se conoce también que es una de las pocas especies en la cual se puede manipular el genoma nuclear y mitocondrial.

6.7 Diversidad biológica de levaduras

La biodiversidad es la variedad y variabilidad de los seres vivos, incluyendo el número de especies, la variación genética dentro de las especies y la diversidad funcional (Escalante, 2002). Los estudios sobre medición de biodiversidad se han centrado en la búsqueda de parámetros para caracterizarla como una propiedad

emergente de las comunidades ecológicas. La diversidad alfa es la riqueza de especies de una comunidad particular a la que consideramos homogénea, la diversidad beta es el grado de cambio o reemplazo en la composición de especies entre diferentes comunidades en un paisaje, y la diversidad gamma es la riqueza de especies del conjunto de comunidades que integran un paisaje, resultante tanto de las diversidades alfa como de las diversidades beta (Whittaker, 1972).

Para estimar la biodiversidad de las especies en una región se deben considerar tres aspectos fundamentales: (1) el nivel de biodiversidad que se quiere analizar; (2) el grupo biológico del que se trata, la disponibilidad de datos y los trabajos previos; y (3) las restricciones matemáticas de algunos índices y los supuestos biológicos en los que se basan. Asimismo, existen diversas formas de estimar la semejanza entre comunidades, las relaciones de semejanza pueden ser expresadas numéricamente y se pueden establecer límites arbitrarios sobre una base matemática, lo que reduce la subjetividad de los datos considerablemente (Kent y Coker, 1992).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Sitios de muestreo

Se visitaron seis tabernas de distintos municipios en la región Sierra y Costa del estado de Jalisco a lo largo de la zona protegida por la denominación de origen en los municipios de Mascota, San Sebastián del Oeste, Mixtlán y Cabo Corrientes, en el estado de Jalisco (Fig. 14). En cada taberna se tomó una muestra directamente de los tambos de fermentación al cuarto día de iniciado el proceso, por tratarse del tiempo óptimo de crecimiento de las levaduras presentes en dicha etapa. Las muestras fueron mixtas (mosto y bagazo de agave) y se recolectaron en frascos de vidrio previamente estériles, aproximadamente 500 ml, los cuales se mantuvieron en refrigeración hasta su traslado al laboratorio de Biología Molecular. La población a estudiar de las seis muestras (A, B, C, D, E, F) fueron 30 aislamientos de 84 originalmente aislados.

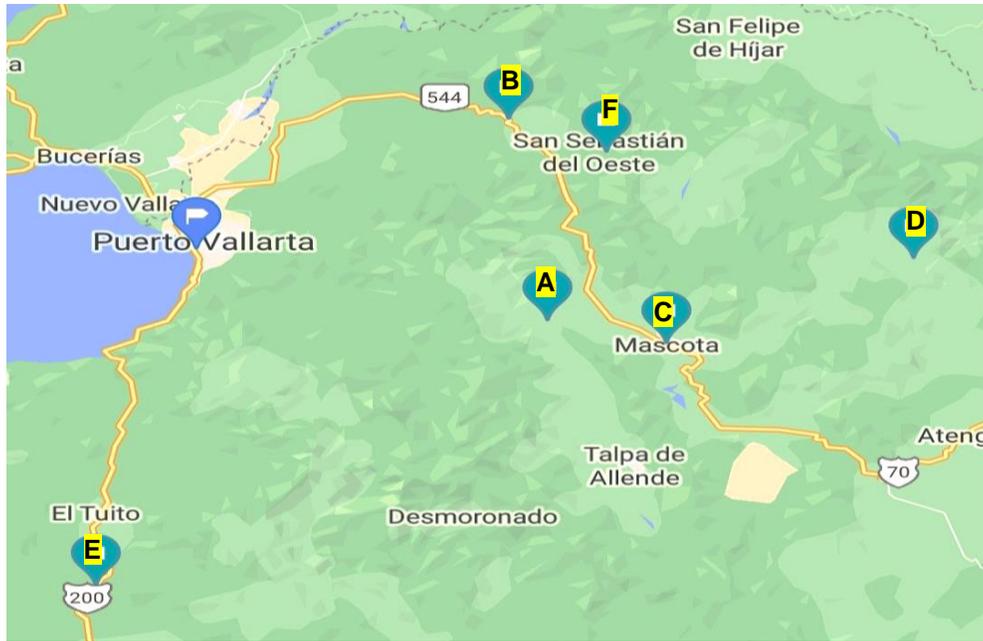


Figura 15. Mapa de la ubicación geográfica de las tabernas muestreadas para la obtención de los mostos.

Tabla 2. Sitios de muestreo de los mostos fermentados de agave para la producción de raicilla artesanal y sus coordenadas de georreferenciación.

MUESTRA	TABERNA	CÓDIGO	LUGAR DE ORIGEN	TIPO DE MUESTRA	FECHA
A	El Ciervo	TMSC	San José del Mosco, Mascota, Jal. 20.5533048,-104.9013914	Mixta	2020
B	Hacienda Don Lalín	TSEH	La Estancia, San Sebastián del Oeste, Jal. 20.7990748, -104.9380049	Mixta	2020
C	Sierra Mascota	TMCM	Centro, Mascota, Jal. 20.5254528,-104.7893733	Mixta	2021
C	El Tío Luis	TXSG	San Gregorio, Mixtlán, Jal. 20.6292880,-104.5564630	Mixta	2021
E	Rancho El Cono	TPCD	El Tuito, Jal. 20.228807,-105.326759	Mixta	2021
F	El Tesoro del Oeste	TSCT	Centro, San Sebastián del Oeste, Jal. 20.7590891,-104.8458774	Mixta	2021

7.2 Microbiología general aplicada

7.2.1 Medios de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó como sustrato de propagación de las levaduras fue agar peptona dextrosa extracto de levadura (YPD, yeast peptone dextosa). (Dextrosa 20 g/L, Peptona 20 g/L, Extracto de levadura 10 g/L, Agar Bacteriológico 15 g/L, pH final (6.5 ± 2).

El medio YPD con la composición anterior se preparó como medio sólido, se preparó con agua destilada, se esterilizó a 120 °C durante 30 minutos en el autoclave a 15 libras. Posteriormente se dejó enfriar 10 minutos a una temperatura que mantuviera el medio líquido para poder vaciarse un volumen de 20 ml en cajas petri de cristal previamente estériles antes de que solidificara. Para evitar la propagación de bacterias, se agregó ceftriaxona a una concentración de 100 mg/L.

7.2.2 Aislamiento, crecimiento y extensión

Para el aislamiento de las levaduras, se recurrió a la técnica de extensión en superficie, que consiste en agregar 100 µL de las muestras colectadas en una caja petri con medio YPD y antibiótico. La muestra se distribuyó uniformemente en la superficie del medio con ayuda de un Asa de Digrafsky hasta que la muestra cubriera completamente el medio de cultivo y se absorbiera en el mismo. Posteriormente, las placas se incubaron por 48 horas a 25°C (Fig. 15)

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se observaron las levaduras que habían crecido y se procedió a aislar la mayor cantidad posible de colonias tratando de identificar diferencias morfológicas a simple vista para obtener especies distintas. Esto se llevó a cabo mediante la técnica de estría cruzada para aislar en lo posible, diversas y definidas colonias de levaduras.



Figura 16. Técnica de extensión en superficie de levaduras aisladas del mosto de agave en medio selectivo YPD con antibiotico para identificar colonias por su morfología.

7.2.2.1 Identificación morfológica de levaduras

La tinción diferencial de Gram, en el caso de levaduras se utiliza para poder referirse a la morfología celular e identificar la presencia de posibles contaminaciones con otros microorganismos. Está compuesto por la solución de cristal violeta, solución de yodo (lugol), decoloración con etanol-acetona y el colorante de fondo Safranina 1%. (Kurtzman, 2011). Además, se pueden realizar procedimientos de coloración simple como azul de metileno, que provee una estimación del porcentaje de células vivas presentes en una muestra de levaduras, o una tinción con safranina que brindaría información sobre la estructura externa e interna de la levadura a nivel microscópico.

Para este trabajo de investigación, se realizó una tinción de gram, se inició con la preparación del frotis, colocando sobre la gradilla un portaobjetos limpio y desengrasado previamente con etanol al 70%. Se colocó una gota de agua destilada al centro del mismo, y se tomó una asada de la levadura a teñir (crecida previamente en medio selectivo YPD sólido) la cual fue disuelta al centro del portaobjetos sobre la gota de agua. Se extendió de manera uniforme y se pasó suavemente por la flama

del mechero. Para comenzar la tinción, se cubrió con colorante violeta de genciana y se mantuvo por un minuto. Sin enjuagar, se escurrió este colorante y se agregó yodo gram, y se dejó en reposo por un minuto. Se lavó con solución alcohol-acetona hasta aclarar. Una vez evaporados los restos de alcohol acetona, se cubrió el frotis con safranina y se incubó un minuto. Se lavó repetidas ocasiones con agua destilada hasta retirar el colorante excedente. Al secar, se colocó sobre el frotis un cubreobjetos y se observó al microscopio con el objetivo 40X y 100X con aceite de inmersión (Fig.16).

Después de realizó una tinción con colorante safranina, el frotis se preparó de la misma forma que el frotis de la tinción de gram, y posteriormente se agregó una gota del colorante, se dejó reposar un minuto y se enjuagó con agua destilada hasta retirar el exceso. Al secar se colocó un cubreobjetos y se observó al microscopio con el objetivo 100X con aceite de inmersión.

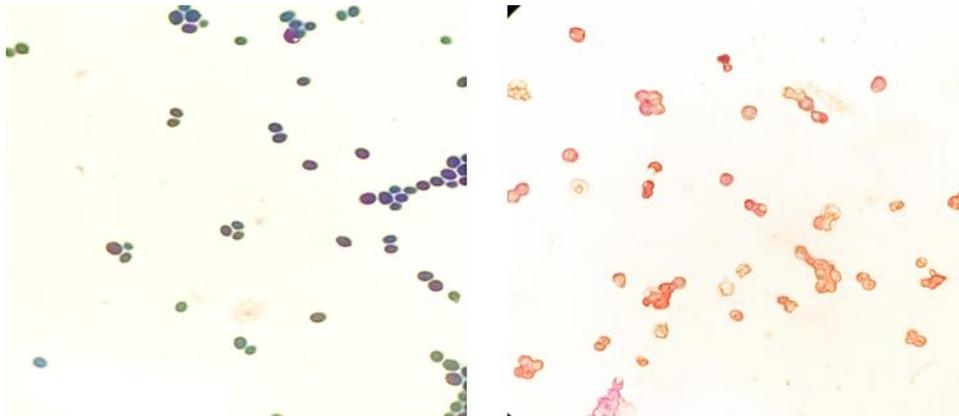


Figura 17. Tinción de levaduras con coloración diferencial para la observación de su morfología, vistas con el objetivo 100X.

7.2.2.2 Conservación de cepas en glicerol

Los ceparios o colecciones de microorganismos son fuentes de recursos genéticos cuyo propósito es la preservación de la diversidad biológica, garantizando su disponibilidad para actividades de docencia, investigación y comerciales.

La conservación de las levaduras aisladas del mosto fermentado de agave se realizó en medio de soporte glicerol al 20% estéril. Inicialmente se preparó medio YPD líquido y se colocaron 5 ml del medio en tubos falcon de 15 ml previamente estériles más 3 asadas de la levadura a conservar y se dejaron en agitación constante de 4000 rpm a 25°C durante 48 horas para su óptimo crecimiento.

Posteriormente se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos y se retiraron 3 ml del sobrenadante. Se agitó el tubo falcon en vórtex para mezclar el pellet con los 2 ml restantes del medio. Se dividió 1 ml y 1 ml en dos tubos eppendorf nuevos de 2 ml previamente estériles y se centrifugó a 5000 rpm durante 3 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregó a cada tubo 1 ml de glicerol al 20% estéril. Se agitó manualmente, se dejó reposar por 5 minutos y se llevó a -20°C para su conservación. Se centrifugó a 8000 rpm durante 2 minutos, se tiró el sobrenadante dejando únicamente el pellet. Se agregó a cada tubo 1 mL de glicerol estéril al 20%. Se agitaron cuidadosamente para homogenizar las levaduras en la solución y se colocaron a -20°C para su conservación.

7.3 Métodos moleculares

7.3.1 Extracción de DNA

Para la extracción del DNA se probaron diversas técnicas de extracción. Inicialmente se tomó como referencia el protocolo encontrado en *Methods in Molecular Biology* por Bartlett S. en 1993, con algunas modificaciones en el proceso por el material disponible, que consistía en preparar el preinóculo de cada cepa de levaduras en medio líquido YPD e incubarlas a 25 °C durante 48 horas. Para el proceso de la lisis celular se utilizó tampón para lisis y se calentó a una temperatura de 65°C. posteriormente una mezcla de fenol-cloroformo en volumen 1:1, isopropanol al 100% y la muestra se lavaba con EtOH al 70%. Al final se llevaba la muestra al concentrador de DNA a 40 °C y se resuspendía el DNA en 50 µL de TE al 0.5X o agua destilada estéril libre de nucleasas.

Después se repitió dicho protocolo pero añadiendo perlas de cristal para agitar en el vórtex en la etapa de la lisis celular y tampoco se obtuvieron resultados positivos. Luego se cambiaron las perlas de corte por 5 minutos en el sonicador ULTRASONIC LC 60 H ELMA, obteniendo como resultado DNA muy degradado, y sin bandas visibles en todas las muestras.

El kit ZR Mini Prep para levaduras, bacterias y hongos, consiste en agregar 70 mg de peso seco de células de levaduras (previamente crecidas en preinóculo de medio líquido YPD durante 24 horas) a un tubo eppendorf y se resuspendieron en 200 μ l de agua inyectable estéril. Se agregó la suspensión al tubo que contenía perlas de corte más 750 μ l de la solución de lisis y se agitó en vortex por 5 minutos. Se centrifugaron los tubos con las perlas de corte a 10,000 rpm durante 1 minuto. Se transfirieron 400 μ l del sobrenadante al tubo con filtro para centrífuga y con tubo para colecta, y se centrifugó a 8,000 rpm durante 1 minuto. Se agregaron 1,200 μ l del buffer de enlace (al cuál se le agregó β -mercaptoetanol a una dilución final de 0.5%) al filtrado del tubo de colecta del paso anterior. Luego se mezcló cuidadosamente y se agregaron 800 μ l nuevamente en tubos de colecta con filtro y se centrifugó 1 minuto a 10,000 rpm. Se tiró el filtrado y se repitió el paso anterior. Se agregaron 200 μ l del buffer de pre lavado de DNA a la columna de un nuevo tubo de colecta y se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto.

Se agregaron 500 μ l del buffer de lavado a un tubo con filtro y se centrifugó a 10,000 rpm en el mismo tubo de colecta anterior. A la columna con filtro se colocó en un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 ml, a la cual se le agregó 80 μ l del buffer de elución. Se centrifugó por 30 segundos a 10,000rpm para eluir el DNA y se mantuvo en refrigeración a -20°C para su conservación. Finalmente se obtuvo DNA de buena calidad de todas las muestras de levaduras analizadas.

7.3.1.1 Electroforesis en gel de agarosa

Para separar el DNA con base a su tamaño se llevó a cabo el proceso de electroforesis con gel de agarosa al 1.2 %. El gel se preparó pesando 200 miligramos de agarosa y disolviéndolos en 20 mL de buffer TAE 1X. La mezcla se

calentó en un horno de microondas hasta homogeneizarla y se dejó enfriar aproximadamente a 60°C para agregar 2 µL de Bromuro de Etidio (BrEt) atendiendo las precauciones de uso.

Se colocó un peine en una base de polipropileno para formar el gel de agarosa y se vació la mezcla evitando la formación de burbujas y se dejó enfriar para lograr la solidificación del mismo. Posteriormente, se llenó la cámara con TAE 1X hasta cubrir el gel y aproximadamente 5 mm sobre él. Se mezclaron 2 µL de colorante naranja G con 5 µL del DNA muestra y se colocó cuidadosamente en cada uno de los pozos formados por el peine sin romperlo ni perforar la base del mismo.

El gel se corrió del polo negativo al positivo a 100 volts por 30 minutos. Se retiró el gel desde la base y se observó en un fotodocumentador DOC-PRINT VX2 marca BIOTECH con la finalidad de observar la integridad y pureza del DNA.

7.3.1.2 Cuantificación de DNA por espectrofotometría

La ley de Beer-Lambert indica que la concentración de una molécula en solución depende de la cantidad de luz absorbida de las moléculas disueltas. Una característica de DNA es que absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260 nm y permite estimar su concentración mediante espectrofotometría. En el caso de DNA genómico o de doble cadena, una densidad óptica equivale a 50 µg/ml (Lehninger 1975).

Para la cuantificación del DNA se realizó una dilución 1:200, agregando 5 µL del DNA muestra y 995 µL de agua inyectable. La muestra se agitó cuidadosamente durante 1 minuto y se tomaron 600 µL de la misma para colocarla en una celda de cuarzo UV/VIS de 1mm de grosor (revisar la medida de la celda). Se leyó la muestra a 230, 260 y 280 nm. El blanco fue agua destilada, obteniendo una relación 260/280 es muy estable, y se considera que un DNA de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0.

7.3.2 Amplificación de la región ITS del DNAr mediante PCR

La amplificación de las regiones ITS-5.8S DNAr se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un volumen total de 25 μ L conteniendo 20 pmol de cada iniciador ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), amortiguador 10X (Invitrogen) (50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8.0, 1% de Triton X-100), 25mM MgCl₂, 0.2 mM de cada uno de los desoxirribonucleótidos (dNTP's), 2.5 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y 100ng de DNA. La amplificación fue realizada en el termociclador Corbett Research CG1-96 PCR programado con las condiciones siguientes: 1 ciclo de desnaturalización inicial de 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos [95 °C, 1 minuto; 55 °C, 1 minuto; 72 °C, 1 minuto] y un ciclo de extensión final de 72 °C durante 10 minutos. Los productos amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 1.2% en regulador TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) teñidos con bromuro de etidio y fotografiados en un transiluminador UV Labnet Tm-26 Dyna Light Dual Intensity. El tamaño de los fragmentos se estimó en comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb (TrackIt 100 bp DNA ladder, Invitrogen). Los productos se purificaron con el kit Quick-RNA para el posterior envío a secuenciación. El producto purificado se visualizó también en un gel de agarosa al 1.2% en el transiluminador ya mencionado.

Para realizar la observación de los productos de PCR, se preparó un gel de agarosa y se desarrolló la electroforesis como se describió anteriormente, empleando un marcador HyperLadder 100bp como guía con la finalidad de conocer el tamaño de los productos de PCR obtenidos el cual corresponde a fragmentos de entre 650 a 1000 pb.

7.3.3 Purificación de los fragmentos amplificados por PCR

Para la purificación de los fragmentos de ADN, se utilizó el método del kit Wizard Genomig DNA Purification, en el que las células de levaduras se suspenden inicialmente en EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) como agente quelante, posteriormente se agregó una solución para precipitación de proteínas, y donde el lavado del DNA se realizó con etanol al 70%. Al DNA se agregaron 50µl de solución rehidratante, se adicionó RNAsa y se incubó a 37°C por 15 minutos. Finalmente se rehidrató el DNA a 65°C durante una hora antes de mantener en refrigeración. El producto obtenido se mostró degradado y con contaminación, probablemente a causa del lavado con etanol. Después se recurrió la técnica del Wizard SV Gel and PCR Clean-up System optimizado en el Laboratorio de Biología Molecular a partir del protocolo original, que consistió en cortar el gel de la electroforesis para recuperar el trozo de gel con el DNA de interés. Se utilizó una solución de lisis para agitar en vórtex e incubar a 65°C hasta disolver. El lavado se realizó con una solución para limpieza de membrana, y la elución se realizó con agua libre de nucleasas. El DNA purificado fue bueno en 8 de 30 muestras, por lo que se descartó como protocolo final.

Finalmente se purificaron los fragmentos amplificados en la PCR a partir de geles de agarosa, empleándose el equipo comercial Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit de Zymo Research®. Posterior a la electroforesis en gel de agarosa, se realizó el corte de los fragmentos de DNA. Se pesaron tubos eppendorf de 1.5 ml previamente estériles y se agregaron los fragmentos de agarosa en los tubos. Se agregó el reactivo ADB en una relación de 3 volúmenes con el peso del fragmento determinado por la diferencia del peso del tubo vacío. Se incubaron los tubos a 55°C durante 5 minutos para disolver la agarosa y se transfirió a una columna colocada en un tubo de colecta del kit. Los tubos se centrifugaron a 8000 rpm durante 60 segundos y se descartó el volumen filtrado. Se agregaron a cada tubo 200µl del reactivo DNA Wash Buffer a cada columna y se centrifugó durante 30 segundos a 8000 rpm. Se descartó el filtrado y se repitió el lavado. Se agregaron 10µl del reactivo DNA Elution Buffer y

20µl de agua inyectable estéril a las columnas de centrifugado, y se colocaron en tubos eppendorf nuevos previamente estériles. Se centrifugaron por 60 segundos a 8000 rpm y se llevaron a -20°C para su conservación.

7.3.4 Obtención y análisis de secuencias

La secuenciación del ADN se llevó a cabo mediante un servicio externo en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) del el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT).

La edición de los electroferogramas se realizó utilizando el programa MEGA 11. El análisis de la variabilidad de las especies de levaduras provenientes de seis sitios de muestreo se realizó con base en los polimorfismos de DNA. Las secuencias fueron comparadas con la base de datos del GenBank utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El análisis de las secuencias se realizó con el programa MEGA 11, donde se alinearon, ajustaron y compararon las secuencias obtenidas contra el material ATCC obtenido en el NCBI-BLAST para confirmar su identidad.

7.4 Diversidad genética mediante la amplificación del gen del citocromo oxidasa P450

Para obtener la diversidad genética de las levaduras aisladas se recurrió a la utilización de la enzima de la citocromo c oxidasa o complejo IV, realizando una PCR con cuatro pares distintos de oligos (Tabla 3).

Tabla 3. Marcadores moleculares utilizados para la prueba de la citocromo C oxidasa.

Forward	Reverse
CYP1A1F	heme2B6
CYP2B6F	heme2C19
CYP1A1F	CYP2C19R
CYP2B6F	CYP2C19R

Las mezclas de reacción para PCR se realizaron en un volumen total de 12.5 μ L conteniendo 10 pmol de cada par de oligos, amortiguador 10X (Invitrogen) (50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8.0, 1% de Triton X-100), 25mM MgCl₂, 0.2 mM de cada uno de los desoxirribonucleótidos (dNTP's), 2.5 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y 100ng de DNA. La amplificación con los oligos CYP2B6F/heme2C19 se realizó en el termociclador Corbett Research CG1-96 PCR con las condiciones siguientes: 1 ciclo de desnaturalización inicial de 95 °C por 5 minutos, 33 ciclos [95 °C, 1 minuto; 56 °C, 1 minuto; 72 °C, 1 minuto] y un ciclo de extensión final de 72 °C durante 10 minutos. Para los pares de oligos CYP1A1F/heme2B6 y CYP2B6F/heme2C19 la temperatura de alineamiento fue de 52°C bajo las mismas condiciones restantes, y para el par de iniciadores CYP2B6F/CYP2C19R la temperatura de alineamiento a 46°C. Se analizaron los productos amplificados en geles de agarosa al 1.5% en regulador TAE 1X teñido con bromuro de etidio y se visualizaron en el transiluminador. Se estimó el tamaño de los fragmentos en comparación con un marcador de peso molecular de 1 kb (TrackIt 1kb DNA ladder, Invitrogen) observado en la reveladora UV retirando la base. Se observó el gel en el DOC-PRINT VX2 y se leyeron los resultados.

7.5 Diversidad biológica de levaduras

El índice de Sorensen es un índice cualitativo que se basa en la relación de presencia-ausencia entre el número de especies comunes en dos áreas (o comunidades) y en el número total de especies (Kent y Coker, 1992). Este índice se expresa de la siguiente manera: $ISS = [c / 1/2(A+B)] 100$, o bien: $ISS = [2c/(A+B)]100$. Donde, ISS = Índice de semejanza de Sorensen , C = Número de especies comunes en ambas comunidades, A = Número total de especies presentes en la comunidad A, y B = Número total de especies presentes en la comunidad B. El índice se expresa en porcentaje dado la multiplicación última que es por 100, lo que nos expresa el porcentaje de semejanza entre las comunidades comparadas.

Este índice trabaja con datos de presencia/ausencia sin involucrar cantidades de individuos de cada especie, por lo que se le conoce como índice binarios. Este índice se obtuvo mediante la construcción de una matriz binaria con los conceptos de presencia y ausencia de especies en la región uno, presencia y ausencia de especies en la región dos, y especies comunes entre regiones.

8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

8.1 Muestreo para el aislamiento de levaduras

Al realizar la colecta de las muestras de las cuales se aislaron las levaduras, primero se identificó el género y especie de los agaves utilizados para la elaboración de la raicilla (Tabla 5), con la finalidad de relacionar si el tipo de agave empleado influía o no en el tipo de levaduras obtenidas en cada muestreo.

Tabla 3. Agaves utilizados en cada taberna para la elaboración de raicilla y su porcentaje como materia prima por ciclo de producción donde: TMCS: Taberna El Ciervo, Mascota. TSEH: Taberna Hda. Lalín, TMCM: Taberna Sierra Mascota, TXSG: El Tío Luis, TPCD: Taberna Don Chalío, TSCT: Taberna Tesoro del Oeste.

Muestra	Taberna	Materia prima	Porcentaje
A	TMSC	<i>A. maximiliana</i>	85%
		<i>A. inaquidens</i>	10%
		<i>A. valenciana</i>	5%
B	TSEH	<i>A. maximiliana</i>	80%
		<i>A. inaquidens</i>	20%
C	TMCM	<i>A. maximiliana</i>	100%
D	TXSG	<i>A. maximiliana</i>	75%
		<i>A. inaquidens</i>	25%
E	TPCD	<i>A. angustifolia</i>	80%
		<i>A. chico Aguiar y</i>	20%
		<i>A. rhodacantha</i>	
F	TSCT	<i>A. maximiliana</i>	80%
		<i>A. inaquidens</i>	20%

En la tabla 5 se puede observar que el 50% de las tabernas emplean principalmente dos especies de agaves para la elaboración de raicilla, *A. maximiliana* y *A. inaquidens*. Por otra parte, se observó que el 20% de las tabernas utilizan especies de *Agave* de la costa, *A. angustifolia*, *A. chico Aguiar* y *A. rhodacantha*; el 20% de las tabernas utilizan *A. valenciana* en su producción, mientras que el 20% de las tabernas utilizan sólo *A. maximiliana* para la producción de raicilla.

A continuación se muestra el número de levaduras aisladas de cada lugar de muestreo, obteniéndose un total de 30 aislamientos de los mostos de agave, los

cuales fueron analizadas posteriormente por diversos métodos moleculares para identificar su taxonomía y diversidad (Tabla 6).

Tabla 4. Número de levaduras encontradas por muestra

TABERNA	Número de especies diferentes de LEVADURAS AISLADAS
TMSC	3
TSEH	5
TMCM	7
TXSG	6
TPCD	4
TSCT	5

8.2 Microbiología general aplicada

8.2.1 Aislamiento e identificación de levaduras

De las seis tabernas muestreadas, se lograron aislar un total de 30 cepas con apariencia distinta según su crecimiento en el medio selectivo a nivel macroscópico (fig. 17). En el aislamiento de A) *Pichia cecembensis* se observan las colonias irregulares, filamentosas, extendidas y planas con margen hialino, textura pulvurulenta y color aperlado mate. En el caso de B) *Saccharomyces pastorianus* las colonias son de forma irregular, planas y extendidas, con margen semidelineado y textura pulverulenta. Las colonias de C) *Kluyveromyces marxianus* son irregulares, de contorno desvanecido, apariencia húmeda, color beige brillante. D) *Saccharomyces mikatae* muestra colonias minúsculas, elevadas y abultadas, bien definidas, de apariencia sólida, con contorno delimitado y de color perla blanquecinas. E) *Saccharomyces cerevisiae* forma colonias ligeramente

extendidas, con contorno definido y ligeramente traslúcido, de apariencia cremosa y color blanco.

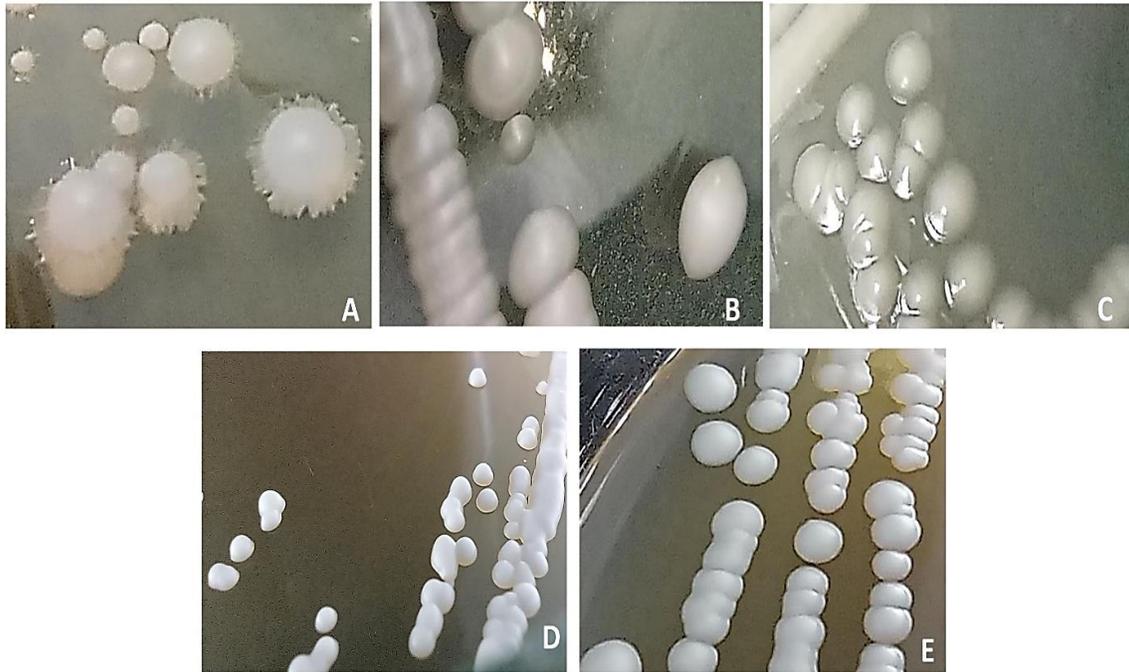


Figura 18. Morfología macroscópica de las levaduras aisladas de raicilla en medio selectivo YPD. A) *Pichia cecembensis* B) *Saccharomyces pastorianus*, C) *Kluyveromyces marxianus*, D) *Saccharomyces mikatae* y E) *Saccharomyces cerevisiae*.

Se determinaron sus características morfológicas a nivel microscópico mediante la observación post-tinción, donde se identificaron levaduras esféricas con una vacuola notable, también ovoides cercanas a pseudomicelios, algunas más redondeadas y otras se observaban piriformes con varias ascosporas en su interior (Fig. 18)

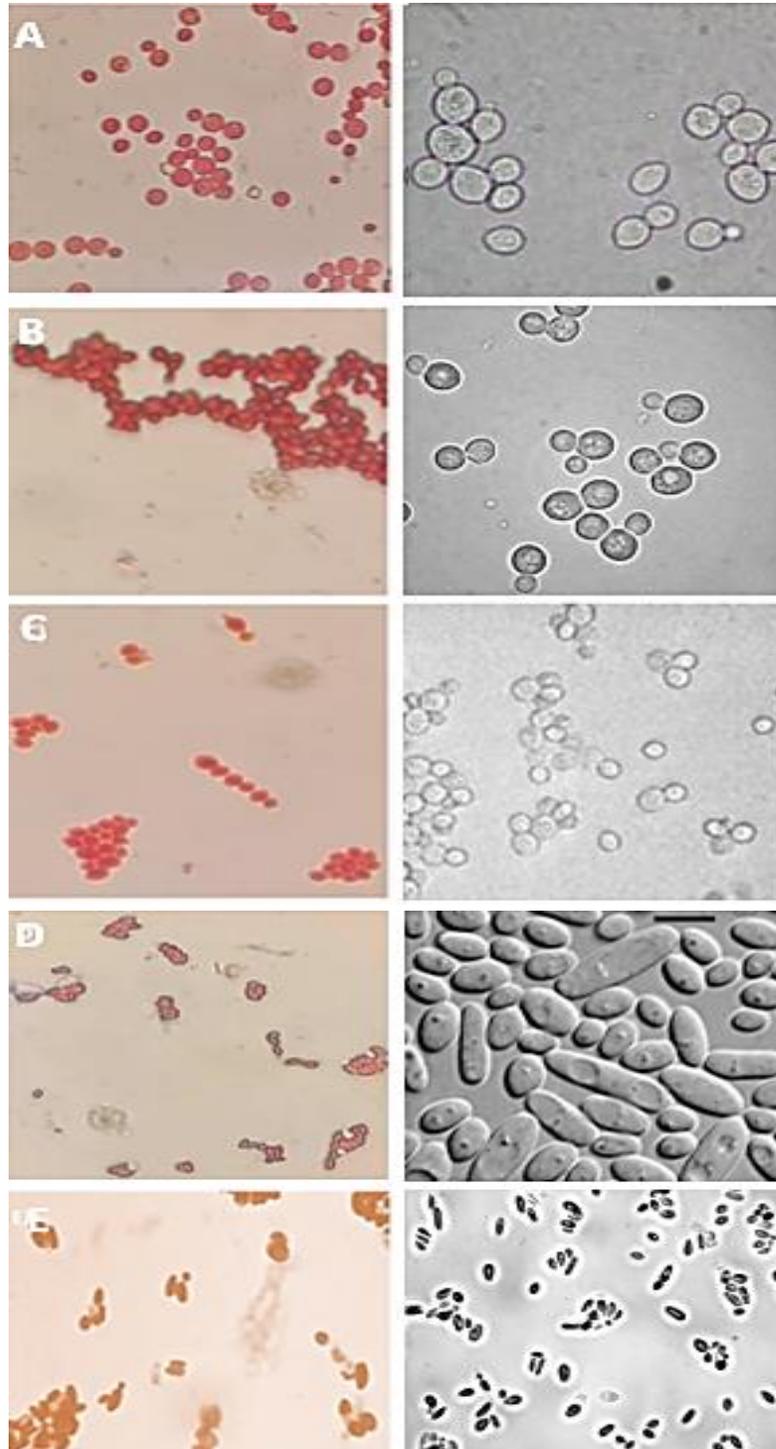


Figura 19. Morfología de las levaduras aisladas de los mostos de raicilla teñidas con safranina. A) *Saccharomyces cerevisiae*, B) *Saccharomyces pastorianus*, C) *Saccharomyces mikatae*, D) *Pichia cecembensis* y D) *Kluyveromyces marxianus*. (izquierda: levaduras aisladas de raicilla, derecha: levaduras de referencia)

Según la literatura reportada de *Saccharomyces cerevisiae*, la morfología tiene identidad con la reportada por Walteros en 2020, que avaluó cepas de dicha especie para la producción de cerveza colombiana. La morfología identificada de *Saccharomyces pastorianus* coincide ligeramente con una cepa caracterizada por Potter en 2018, donde analizó su capacidad fermentativa con nanotecnología. En el caso de *Saccharomyces mikatae* la estructura coincide en gran parte con la reportada por Oda en 2021, que evaluó también su capacidad fermentativa en la elaboración de pan y algunas de sus actividades enzimáticas a nivel molecular. Finalmente, *Pichia cecembensis* ha sido aislada de una papaya en descomposición por Bhadra en 2007, quien la describió con forma esferoidal o alargada, con formación de pseudohifas, con una o más ascosporas, además determinó su capacidad para fermentar β -glucosa, cuya morfología descrita coincide con la observada en las levaduras *Pichia cecembensis* aisladas del mosto de raicilla. Particularmente, en *Kluyveromyces marxianus*, Lane et al., en 2011 reportaron su morfología en su trabajo de investigación sobre la diversidad fisiológica y metabólica en dicha levadura, donde determinan que posee la capacidad de llevar a cabo la fermentación de lactosa e inulina. Dicha morfología también coincide en gran medida con la reportada en éste trabajo de investigación.

8.2.2 Elaboración de un cepario

Para la constitución del cepario, se lograron incluir las 30 cepas aisladas inicialmente, se decidió no descartar ninguna sin importar el género o la especie, para futuras investigaciones donde puedan determinarse con exactitud si las características entre cepas del mismo género son similares.

Tabla 5. Cepas de levaduras aisladas de mostos de raicilla que constituyen el cepario del Laboratorio de Biología Molecular.

SEH01	<i>Pichia cecembensis</i>	MCM05	<i>S. cerevisiae</i>
SEH02	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MCM06	<i>S. mikatae</i>
SEH03	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	MCM07	<i>S. cerevisiae</i>
SEH04	<i>P. cecembensis</i>	SCT01	<i>S. mikatae</i>
SEH05	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	SCT02	<i>S. mikatae</i>
SEH06	<i>P. cecembensis</i>	SCT04	<i>S. cerevisiae</i>
MSC01	<i>S. cerevisiae</i>	SCT05	<i>S. mikatae</i>
MSC02	<i>K. marxianus</i>	PCD01	<i>S. mikatae</i>
MSC03	<i>P. cecembensis</i>	PCD02	<i>S. cerevisiae</i>
MSC04	<i>K. marxianus</i>	PCD03	<i>S. cerevisiae</i>
MSC05	<i>K. marxianus</i>	PCD04	<i>K. marxianus</i>
MCM01	<i>S. cerevisiae</i>	PCD05	<i>S. cerevisiae</i>
MCM02	<i>S. cerevisiae</i>	XSG01	<i>S. cerevisiae</i>
MCM03	<i>K. marxianus</i>	XSG02	<i>P. cecembensis</i>
MCM04	<i>Saccharomyces mikatae</i>	XSG03	<i>S. cerevisiae</i>

8.3 Métodos moleculares

8.3.1 Extracción de DNA

Después de probar diversos métodos para la extracción del DNA, se concluyó que el mejor de ellos fue el kit ZR miniprep para levaduras, hongos y bacterias ya que resultó ser más efectivo que otros métodos enzimáticos, debido a que contiene un tubo con perlas de corte que facilita la lisis de la pared celular para la extracción del DNA. En la Fig. 20, se muestra un ejemplo de los geles de agarosa al 1.0% donde se observan las bandas del DNA extraído de 14 levaduras aisladas de tres tabernas: C) TMCM, D) TXSG y E) TPCD.

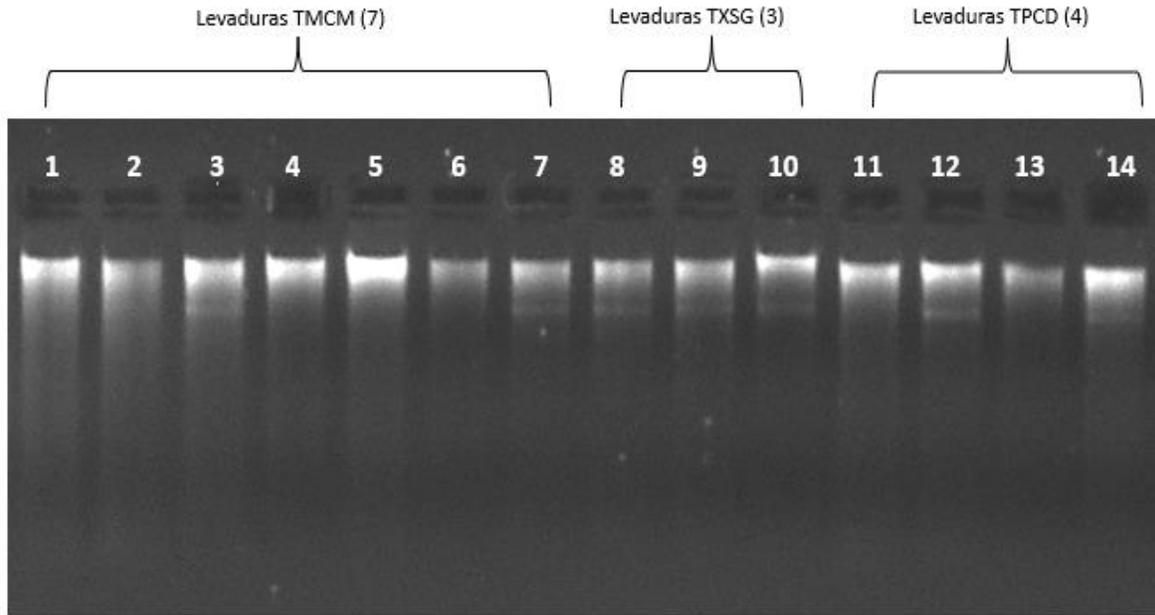


Figura 20. Gel de agarosa al 1.0% que muestra los productos de la extracción del DNA de 14 levaduras aisladas de fermentaciones para la elaboración de raicilla artesanal.

8.3.2 Cuantificación de DNA por espectrofotometría

El DNA extraído de las 30 levaduras nativas de mostos de raicilla, se obtuvo con una pureza elevada, los valores obtenidos respecto a la relación 260/280 y 260/230 se observan en la tabla 8. Un DNA de pureza aceptable debería tener al menos en la misma relación un valor >1.6 , un valor de la misma relación <1.6 indicaría contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas.

Segura, (2014), menciona la absorbancia a 230 nm como indicador de contaminantes, como sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos. DNA más puro con un valor 260/230 entre 1.8 – 2.0- Menos de 1.8 indicaría contaminantes en la muestra, sin embargo, avisa que dicha relación resulta mucha más variable que la relación 260/280 pues dependerá de diversos factores, entre ellos la concentración del DNA o la composición del tampón de resuspensión de la muestra.

Tabla 6. Cuantificación de DNA relación 260/280 indica la concentración del mismo.

TABERNA	260/230	260/280
A) TMSC	0.43	1.56
B) TSEH	0.41	1.85
C) TMCM	0.70	1.61
D) TXSG	0.53	1.75
E) TPCD	0.80	1.47
F) TSCT	0.89	1.86

Por lo tanto las levaduras de las tabernas B y F se encuentran en concentración óptima (>1.8), las levaduras de las tabernas C Y D en una concentración aceptable, y las de las tabernas A y E concentración baja. En cuanto a la relación 260/230, todas las muestras de las seis tabernas están en el rango <1.8 , lo que indica que tendrían contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas.

8.3.3 Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR

Los productos de amplificación obtenidos en la PCR fueron separados en una electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.5% se procedió a la visualización del ADN mediante exposición a luz UV. Los oligos ITS1 e ITS4 permitieron la amplificación de fragmentos de entre 650 y 1100 pb aproximadamente (Fig. 20) las cuales fueron comparadas con un marcador de peso molecular de 100pb.

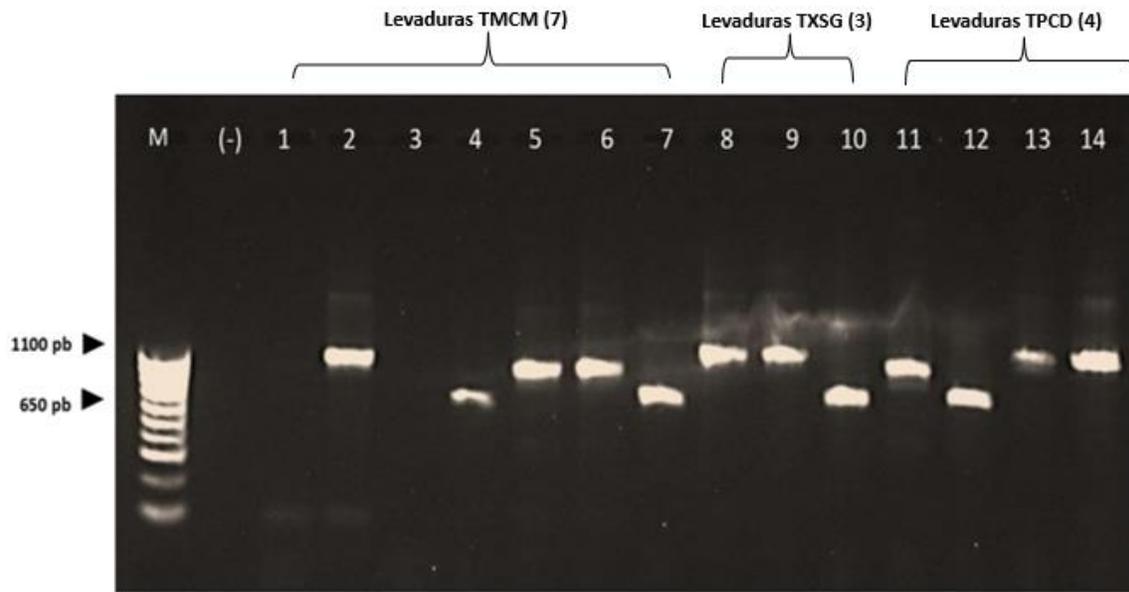


Figura 21. Gel de agarosa al 1.5% que muestra los productos de la amplificación de la región ITS del rDNA de 14 levaduras aisladas de fermentaciones de tres tabernas C)TMCM, D)TXSG y E)TPCD con los iniciadores ITS1 e ITS4 que se compararon con un marcador de peso molecular de 100 pb.

8.3.4 Identificación molecular de levaduras por secuenciación

Mediante el análisis de los resultados de la secuenciación del ITS del rDNA de las levaduras aisladas y su posterior comparación con los datos reportados en el GenBank, se identificaron tres géneros y cinco especies distintas entre las que podemos encontrar *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces mikatae*, *Kluyveromyces marxianus*, y *Pichia cecembensis* (Tabla 9).

Con el alineamiento múltiple de las secuencias de las levaduras aisladas de los mostos de raicilla, y comparadas con la cepa TIPO de las levaduras reportadas en el GenBank del NCBI se confirmó el género y especie de las cepas. Se logró identificar a *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces mikatae* y *Pichia cecembensis*, donde se obtuvo un porcentaje de identidad del 95% en promedio. (Fig. 22). Se analizaron también los electroferogramas obtenidos de las secuenciaciones de las diferentes levaduras para corroborar su identidad (Fig. 22).

Tabla 7. Levaduras identificadas en los mostos de agave para la elaboración de raicilla y su porcentaje de identidad con las cepas reportadas el GenBank del NCBI.

CLAVE LBM	ESPECIE IDENTIFICADA	% IDENTIDAD	NO. ACCESIÓN NCBI
MCM02	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	72.0%	NR_111007.1
MCM03	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	91.37%	NR_111251.1
MCM04	<i>Saccharomyces mikatae</i>	97.66%	NR_111354.1
MCM06	<i>Saccharomyces mikatae</i>	97.66%	NR_111354.1
MCM07	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	76.11%	NR_111007.1
MSC01	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	70.47%	NR_111007.1
MSC02	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	83.62%	NR_111251.1
MSC03	<i>Pichia cecembensis</i>	90.61%	NR_164078.1
MSC04	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	80.79%	NR_111251.1
MSC05	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	87.03%	NR_111251.1
PCD01	<i>Saccharomyces mikatae</i>	97.76%	NR_111354.1
PCD04	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	97.42%	NR_111251.1
PCD05	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	93.22%	NR_111007.1
SCT04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67.05%	NR_111007.1
SCT05	<i>Saccharomyces mikatae</i>	97.41%	NR_111354.1
SEH01	<i>Pichia cecembensis</i>	81.42%	NR_164078.1
SEH02	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	72.18%	NR_111007.1
SEH03	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	82.95%	NR_165985.1
SEH05	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	92.33%	NR_111251.1
SEH06	<i>Pichia cecembensis</i>	75.93%	NR_164078.1
XSG01	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	88.09%	NR_111007.1
XSG02	<i>Pichia cecembensis</i>	95.50%	NR_164078.1

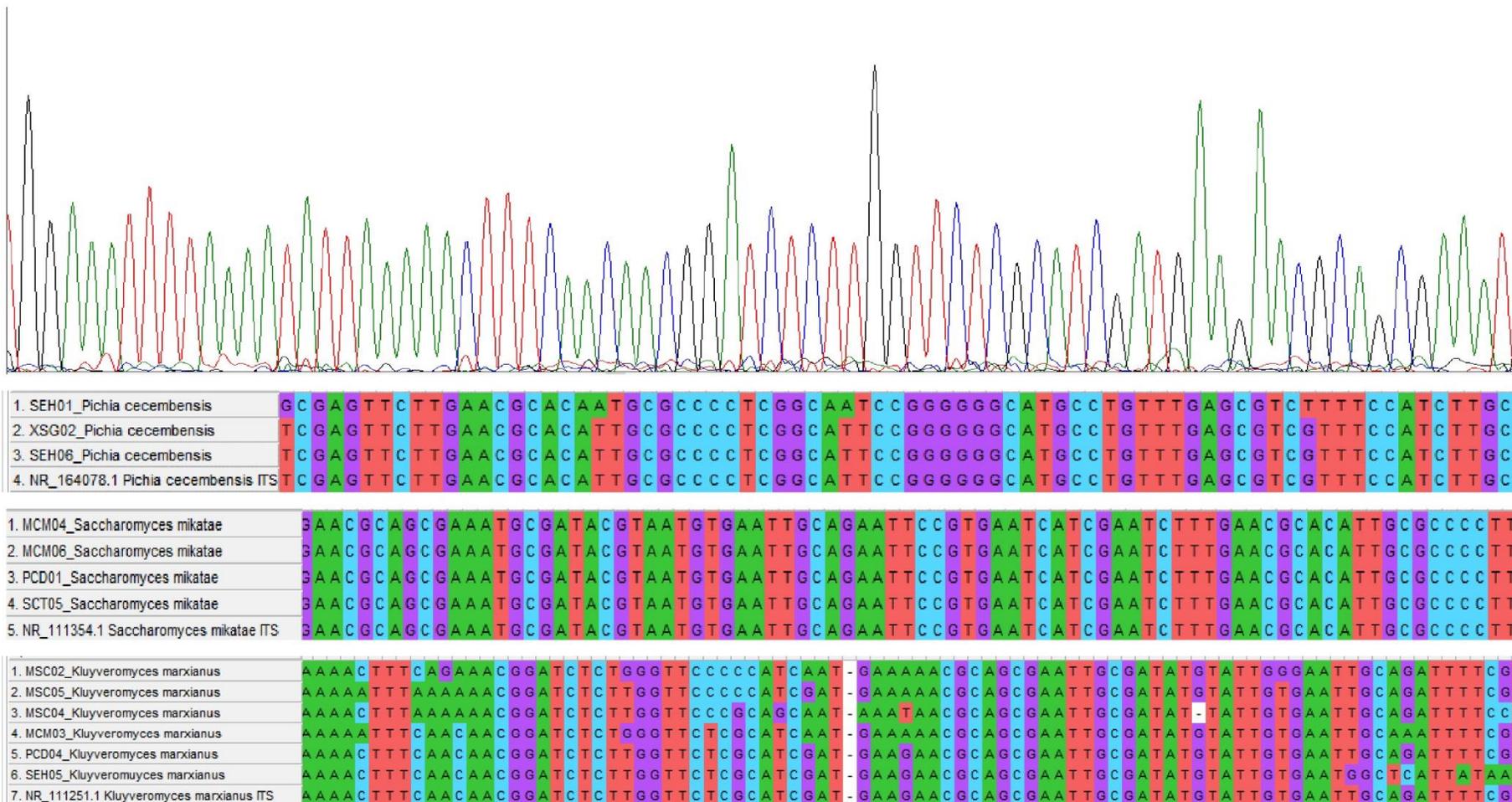


Figura 22. Alineamiento múltiple de las secuenciaciones de las levaduras aisladas de mostos de raiclla vs. la cepa TIPO reportada en el GenBank del NCBI. El porcentaje de identidad es de 95% en promedio.

8.3.5 Abundancia y relatividad de levaduras nativas

Las especies identificadas tuvieron un porcentaje de identidad con la base de datos del GenBank de entre el 82% y el 98%. La especie más abundante identificada fue *Saccharomyces cerevisiae* 40.89% del total de los aislados, mayoritariamente en las muestras D (TXSG), E (TPDC) y C (TMCM) y en menor cantidad en la muestra B (TSEH) (Fig. 23).

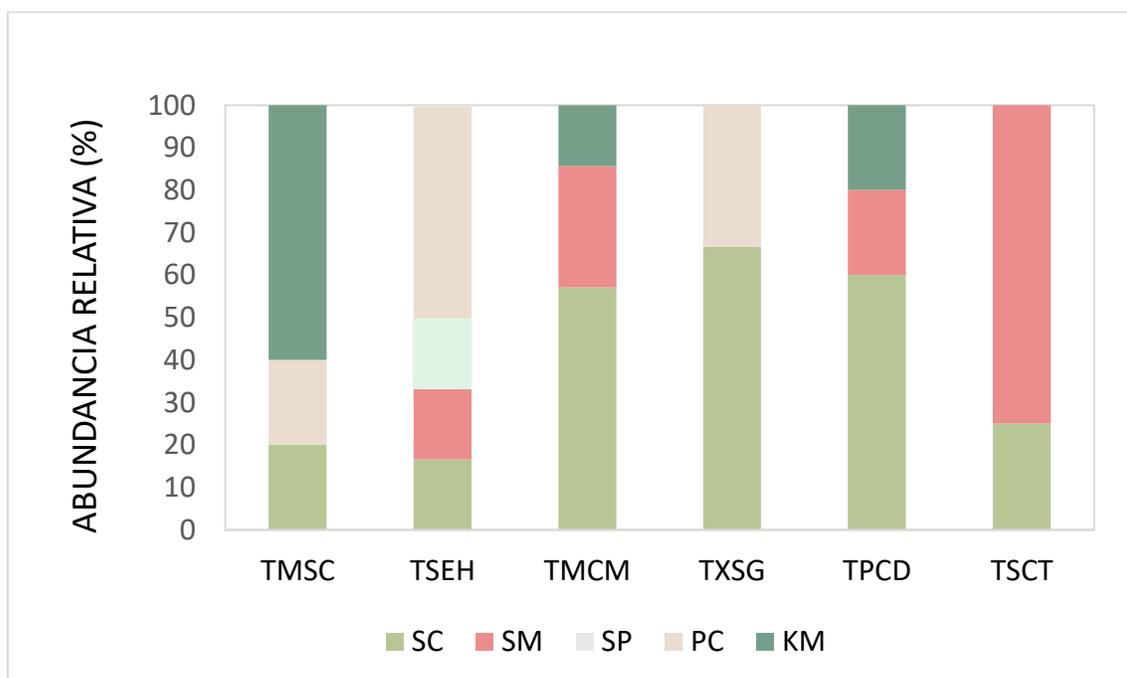


Figura 23. Abundancia relativa (%) de las especies de levaduras identificadas en muestras de fermento de raicilla artesanal; SC: *Saccharomyces cerevisiae*, SM: *Saccharomyces mikatae*, SP: *Saccharomyces pastorianus*, PC: *Pichia cecembensis*, KM: *Kluyveromyces marxianus* y su distribución en las tabernas muestreadas; A) TMSC, B) TSEH, C) TMCM, D) TXSG, E) TPCD y F) TSCT.

Saccharomyces cerevisiae es la especie de levadura que domina en la producción de bebidas alcohólicas a nivel mundial, y las cepas particulares de esta especie empleadas en la fermentación ejercen una profunda influencia en las características de sabor y aroma de diferentes bebidas (Walker, 2016). Además, se conoce que a

una temperatura de 40 °C obtiene un efecto positivo en la producción de etanol, aumentando la productividad y eficiencia en la fermentación del maguey, esta levadura ha demostrado una buena capacidad fermentativa y producción de compuestos volátiles, lo que confirma su potencial uso como cultivo iniciador en la fermentación del mezcal (Ruíz, 2019).

Saccharomyces pastorianus se identificó solamente en la muestra B (TSEH) y representó el 2.77% de los aislamientos, la cual es un híbrido natural de *S. eubayanus* y *S. cerevisiae* (Gallone et al., 2018) considerada una levadura de importancia industrial que está involucrada en el proceso de producción de bebidas alcohólicas como la cerveza Lager (Rainieri, 2006) y que ha sido identificada con propiedades fermentativas a bajas temperaturas (cercanas a los 5°C) (Gibson y Lity 2017) , además de que no ha sido reportada con anterioridad en fermentaciones de bebidas destiladas de agave.

Saccharomyces mikatae (23.36%) se encontró en las muestras B, C, E y F. Dicha levadura es considerada una levadura silvestre que se había reportado exclusivamente en el medio ambiente natural de Japón al aislarse del suelo y hojas en descomposición (Naumov et al. 2000) y que Hutzler en marzo de 2021, la catalogó como una levadura con restricción regional la cual no ha sido asociada con ambientes de fermentación industrial (Bellón, 2013).

Kluyveromyces marxianus representó el 15.71% de las levaduras aisladas, y se encontró en las muestras A, C, y E. Se ha reportado constantemente en fermentaciones no alcohólicas de agave americana (Lara, 2017), y de forma espontánea en fermentación alcohólica para la producción de mezcal con *Agave cupreata* (Pérez, 2013) en la cual produjo el mayor contenido de etanol en comparación con otras levaduras aisladas.

También se encontró *Pichia cecembensis* en un 17.18% que estaba presente en las muestras A, B y D. Bhadra en (2007) aisló varias cepas de levaduras de una fruta de papaya en descomposición (*Carica papaya*) y cuyos rasgos fenotípicos como la forma esferoidal o alargada, y ascos con una o más ascosporas, además de características bioquímicas como su capacidad para fermentar D-glucosa y la incapacidad para asimilar nitrato sugirieron su afiliación al género *Pichia*, con

coincidencias a nivel genético con varias especies del mismo género, por lo que se propuso asignar la nueva especie *Pichia cecembensis*. Esta levadura también ha sido considerada una levadura de biocontrol contra el moho azul causado por *Penicillium expansum* (Liu, 2017) pero no hay reportes de estar presente en agave ni en fermentaciones de bebidas destiladas.

Según el índice de similitud de Sorensen, se concluye que las especies de levaduras encontradas en la Costa Sur y en la Sierra Occidental del estado de Jalisco tienen un 75% de similitud, y nos dice que a medida que nos acercamos a valores de 100, la similitud de especies de las regiones son más similares; mientras más alejado a 100 sea el valor del IS, más distintas serán las especies reportadas para dicho índice.

Estudios por simulación de poblaciones con patrones de abundancia de especies indican que la cobertura (probabilidad de que el intervalo calculado con 95% de confiabilidad efectivamente cubra el parámetro) depende no solo del tamaño de cada muestra y del número de muestras que se promedien, sino también del método de estimación utilizado.

Se registró la abundancia y diversidad de especies de los seis sitios de muestreo distintos (A,B,C,D,E,F) de la zona productora de raicilla. Del total de especies registradas el 40% son características de fermentaciones para la producción de bebidas destiladas a partir de agave y el 60% no se habían reportado con anterioridad en fermentaciones de este tipo. *Saccharomyces cerevisiae* está presente en el 100% de los sitios muestreados. *Pichia cecembensis* en el 50%, *Kluyveromyces marxianus* en el 50%, *Saccharomyces pastorianus* en el 16.6% y *Saccharomyces mikatae* se encontró en el 66% de los sitios.

Se realizó también una tabla comparativa de las levaduras encontradas en las fermentaciones de algunas bebidas destiladas de agave (Tabla 10) donde resaltan *Clavispora lusitaniae*, *Pichia fermentans*, *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces*

spp., *Zygosaccharomyces spp.*, entre otras; mientras que en éste trabajo de investigación se encontraron en los mostos de raicilla 3 géneros y 5 especies, entre ellas *Pichia cecembensis*, *Saccharomyces pastorianus*, y *Saccharomyces mikatae*, levaduras no reportadas hasta el momento en fermentaciones de bebidas destiladas a partir de agave.

Tabla 8. Comparación de levaduras aisladas en fermentaciones de bebidas destiladas de agave vs. levaduras aisladas de mostos de raicilla

Autores	Bebida	Levaduras encontradas
Barba de la Rosa et al., 2008	Mezcal de <i>Agave Salmiana</i> producido en SLP	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Clavispora lusitaniae</i> • <i>Pichia fermentans</i> • <i>Kluyveromyces marxianus</i>
Verdugo-Valdez et al., 2011	Mezcal de <i>Agave Salmiana</i> producido en SLP	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Saccharomyces spp.</i> • <i>Kluyveromyces marxianus</i> • <i>Pichia kluyveri</i> • <i>Zygosaccharomyces bailii</i> • <i>Clavispora lusitaniae</i> • <i>Torulaspota spp</i> • <i>Candida ethanolica</i>
Segura García et al., 2017.	Mezcal de <i>Agave Angustifolia</i> producido en Oaxaca.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Candida spp.</i> • <i>Clavispora lusitaniae</i> • <i>Debaryomyces spp.</i> • <i>Pichia spp.</i> • <i>Rhodospordium spp.</i> • <i>Rhodotorula spp.</i> • <i>Saccharomyces Cereviseae</i> • <i>Torulaspota spp.</i> • <i>Zygosaccharomyces spp.</i>
Juárez Aviña et al., 2021	Raicilla Artesanal del estado de Jalisco	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Saccharomyces cereviseae</i> • <i>Saccharomyces pastorianus</i> • <i>Saccharomyces mikatae</i> • <i>Pichia kudriavzevii</i> • <i>Kluyvemomyces marxianus</i>

8.4 Diversidad genética de levaduras

Para obtener la diversidad genética, se realizó un análisis de la región de la citocromo P450 mediante cuatro pares distintos de oligos, cuyos geles de agarosa se muestran en la figura 24. Mediante la construcción de un dendrograma, utilizando la , se realizó el agrupamiento de los patrones PCR interdelta obtenidos para todas las cepas analizadas, con la finalidad de visualizar cómo se relacionan y/o agrupan totalidad de los individuos con base a las semejanzas en sus perfiles moleculares. (Fig. 25).

El carril M en todos los geles muestra el marcador molecular de 1kb , los carriles de 1-30 muestran los perfiles obtenidos con la PCR utilizando los oligos P450. Se obtuvo un promedio de 12 perfiles distintos entre los cuatro geles, sin embargo se observó variabilidad de perfiles sin que coincidieran las similitudes por carriles entre ellos. Los perfiles podrían indicar que las levaduras no pertenecen a la misma especie si no comparten el patron de bandeo, por lo que se debe considerar también el resultado del estudio morfofisiológico y la secuenciación de las regiones ITS-5.8S de cada cepa para comprobar su identidad.

.Para algunas especies de levaduras los patrones de bandas son muy similares lo que resulta complicado para la identificación como es el caso de los carriles 14 y 15 en el gel D, correspondientes a *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces mikatae*, que se muestran en la figura 24.

Puesto que durante la reacción PCR se utilizan temperaturas de hibridación de cebadores bajas, las reacciones suelen ser bastante sensibles a la concentración de cebador. Concentraciones de cebadores diferentes pueden resultar en la generación de patrones de bandas diferentes.

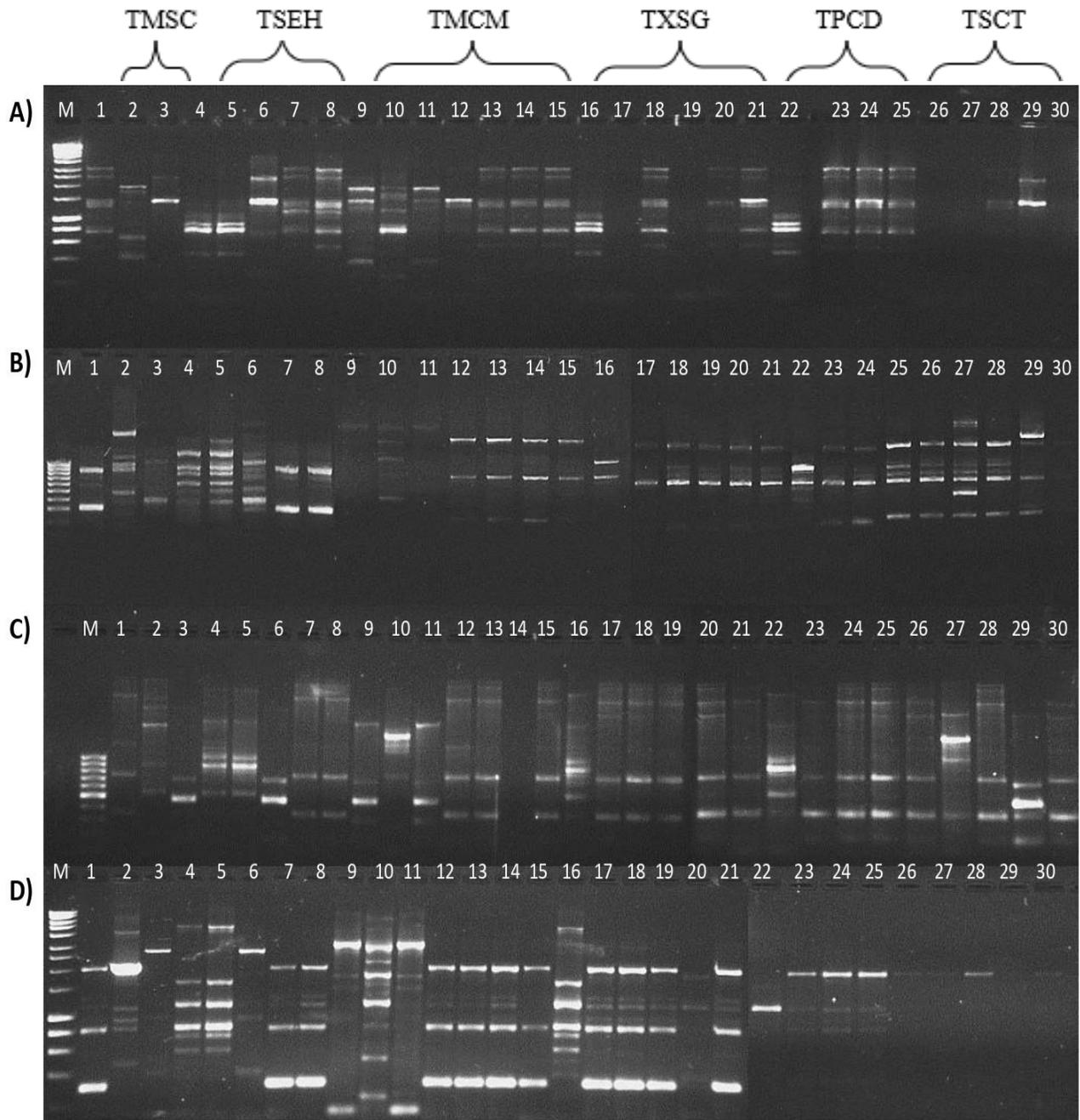


Figura 24. A), B), C) y D) Geles de agarosa al 1.5% que muestran los perfiles obtenidos con la PCR utilizando los oligos CYT P450 para la caracterización de las 30 levaduras aisladas de los mostos para la elaboración de raicilla. El tamaño de las bandas fue estimado en comparación con un marcador de 1kb..

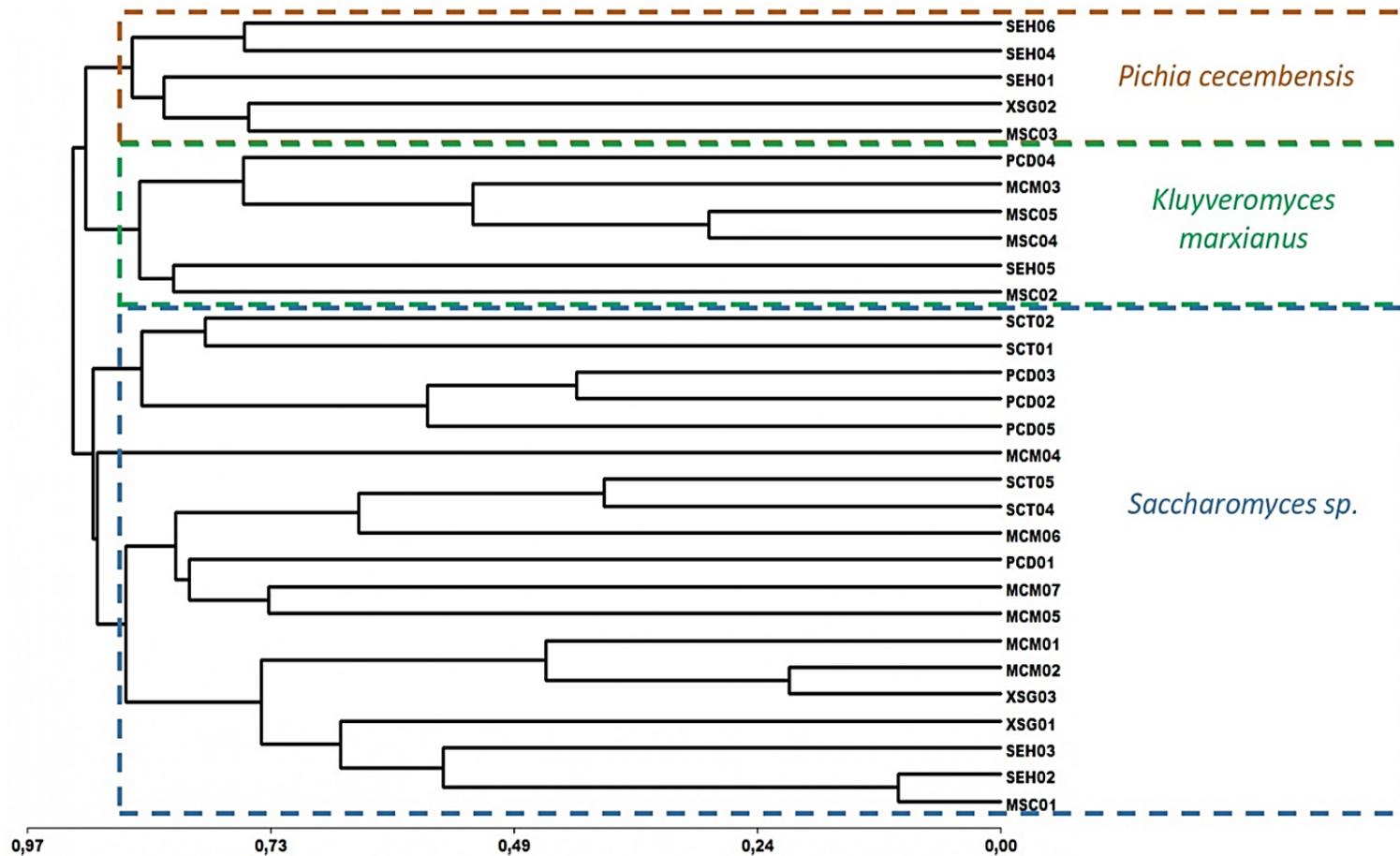


Figura 25. Análisis de conglomerados de los patrones generados con el uso de la COX de las 22 levaduras aislamientos de fermentación de raicilla artesanal y secuenciadas. El dendrograma se obtuvo mediante Kimura 2 y las distancias de las ramas expresadas como porcentaje de similitud. Las líneas discontinuas incluyen aislamientos pertenecientes al mismo género. Las especies dentro de los distintos géneros se muestran con el mismo color.

8.5 Relación filogenética de levaduras

Posteriormente se realizó el alineamiento múltiple de los fragmentos de las secuencias, y se construyó el árbol filogenético con el parámetro de Kimura 2 y el método de neighbour-joining respectivamente, utilizando el software Mega 11. Para proporcionar fidelidad al análisis filogenético, el método Bootstrap se realizó utilizando 1000 repeticiones.

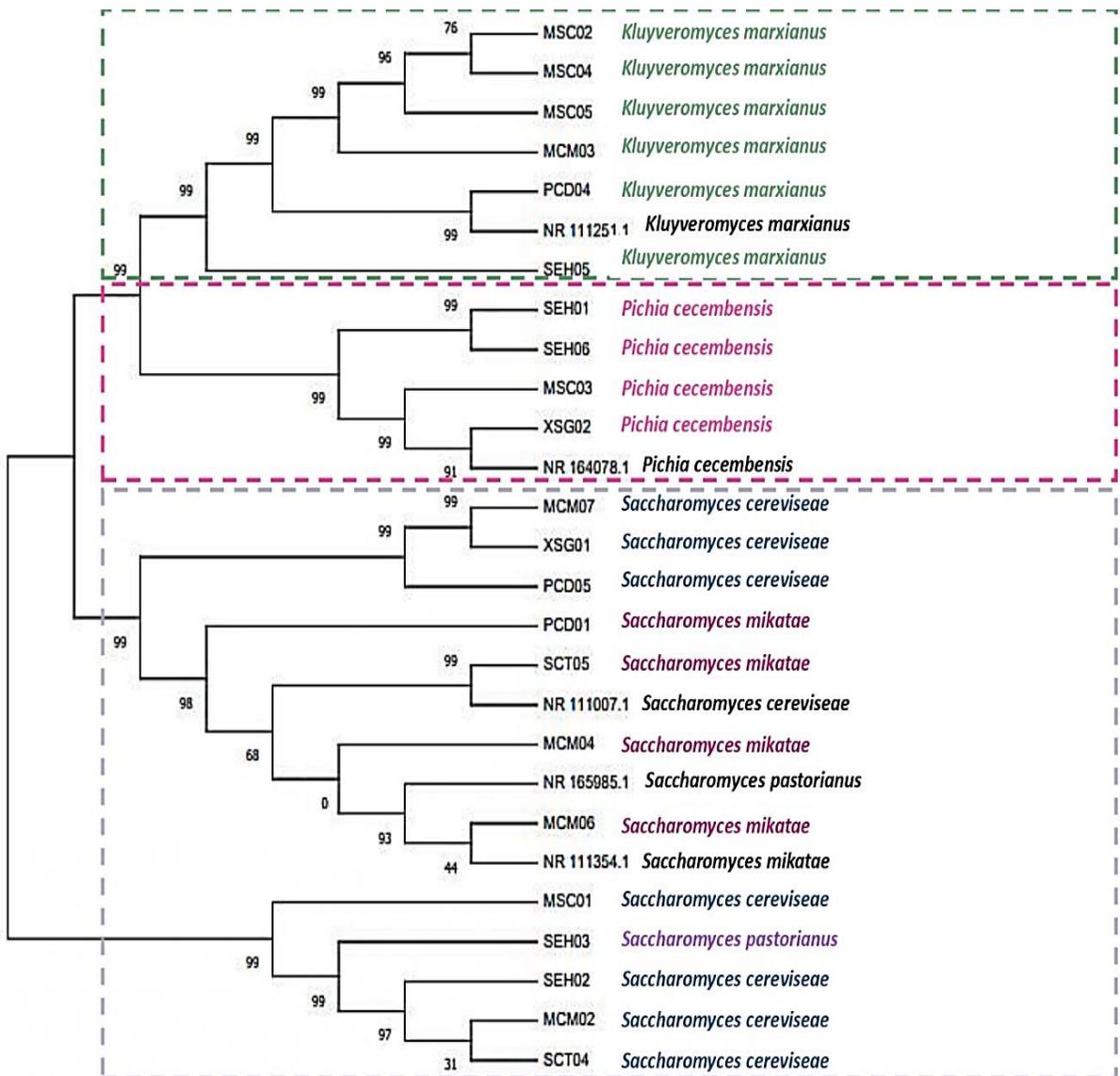


Figura 26. Relación filogenética de los aislados de levadura en función de los análisis de unión de vecinos más cercanos de las ITS1–5.8S rDNA–ITS2. Los 22 aislamientos se agrupan en las cajas de líneas discontinuas que incluyen aislamientos pertenecientes al mismo género. Las cepas con el mismo color son muestras de la misma especie, y se compararon además con el material TIPO presente en el GenBank utilizando el algoritmo BLASTn.

El árbol filogenético mostró la formación de tres ramas principales y los valores de arranque en promedio de 99% válida la robustez de la ramificación patrón (Fig. 26). Los aislamientos pertenecientes al mismo género se agruparon adecuadamente en los casos de *Kluyveromyces marxianus* y *Pichia cecembensis*. Sin embargo, en el caso del género *Saccharomyces* no se distinguen grupos específicos por especie en todas las levaduras (Fig. 26). Esto puede deberse a que la similitud entre sus secuencias genéticas es hasta de un 90%. Se puede observar que las especies de levaduras aisladas están estrechamente relacionadas filogenéticamente, como lo verifican las secuencias ITS1–5.8S rDNA–ITS2.

Segura, en (2010) menciona que las 4 técnicas más utilizadas para la identificación de levaduras son: secuenciación de las regiones ribosomales (siendo la región D1/D2 del gen 26S la más utilizada), el estudio del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) de las regiones ribosomales, principalmente las regiones ITS-5.8S, electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (PCR-DGGE) empleando iniciadores universales y PCR en tiempo real. Él determinó mediante una PCR-RFLP de la región ITS-5.8S de 104 levaduras mediante RFLP de la región ITS-5.8S, y reportó el tamaño de los fragmentos de restricción de dichas regiones. Sin embargo mencionó que al revisar dichos patrones, se percató de que para algunas especies de levaduras existen más de un patrón reportado por diferentes autores con un promedio de variación en el tamaño de las bandas de 14 pb. Tambipen menciona que algunas enzimas no diferencian entre especies, como en el caso de *Hpa II* y *ScrF I* para *S. bayanus* y *S. pastorianus*. Concluye que en la mayoría de los casos la técnica de RFLP de las regiones ITS-5.8S es válida y confiable para la identificación de las levaduras más comunes.

Una investigación futura podría estudiar las características que brindan al destilado final cada una de estas especies, en especial *Pichia cecembensis*, *Saccharomyces mikatae* y *Saccharomyces pastorianus*, que son levaduras presentes en los seis sitios de muestreo y que no han sido reportadas en fermentaciones de bebidas destiladas de agave hasta antes de esta investigación.

9. CONCLUSIONES

- Se aislaron 30 levaduras de seis mostos fermentados para la elaboración de raicilla artesanal del estado de Jalisco, de las cuales 26 fueron obtenidas de la sierra y 4 de la costa .
- Se logró identificar mediante la secuenciación de la región ITS1-5.8S rDNA-ITS2 de las levaduras y al compararlas con lo reportado en el GenBank, tres géneros distintos y cinco especies, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pastorianus*, *Pichia cecembensis* y *Kluyveromyces marxianus*, todas ellas sin ninguna restricción regional o patrón de distribución entre las muestras.
- Según el índice de Sorensen que las especies de levaduras encontradas en la costa y las aisladas de la sierra son similares en un 75%.
- Se demostró que el uso de los marcadores moleculares CYTP450 resultó útil para obtener la diversidad genética de poblaciones de levaduras de mostos de raicilla, pues los perfiles obtenidos con este análisis coinciden perfectamente con el árbol filogenético generado, lo cual demuestra que es una eficiente opción de identificación y caracterización de levaduras.
- Se obtuvo por primera vez un aislado de *Saccharomyces mikatae* fuera del continente asiático con un porcentaje de identidad del 98% y se asoció por primera vez a la fermentación de destilados de agave, en el caso particular de la raicilla.
- De acuerdo a la hipótesis planteada en éste trabajo de investigación, se concluyó que las levaduras que se encuentran en las fermentaciones de los mostos para la elaboración de raicilla en la Costa Sur y en la Sierra Occidental no difieren significativamente en cantidad, ya que el promedio de levaduras aisladas por taberna en la costa fue de 4, mientras que en la sierra fue de 5. Además de que dichas especies no son determinadas por la materia prima utilizada para la elaboración de la raicilla, puesto que las especies identificadas se encuentran por igual en fermentaciones de diferentes especies de agave.

10. REFERENCIAS

- Alonso-Rivera, C. (2007). Manejo campesino en el sistema de producción del maguey Papalote (*Agave cupreata* Trel. & A. Berger.), para la elaboración de mezcal en la región de Chilapa, Gro (Tesis de Maestría. Puebla, México. Colegio de Post-graduados, Campus Puebla).
- Álvarez, J. (2016). Aislamiento y caracterización genética y enológica de levaduras vínicas autóctonas de uva Prieto Picudo y caracterización aromática de sus vinos. (Tesis doctoral, Centro de Biotecnología Industrial, SENA, Colombia).
- Álvarez, N., Gerritsen, P. (2013). Construyendo poderes locales: Microdestilerías y *agave azul* en el sur de Jalisco. *Editorial Universitaria*. CU Costa Sur. Universidad de Guadalajara p.144
- Aragón-Parada, J., Rodríguez, A., Munguía-Lino, G., De-Nova, J. A., Salinas-Rodríguez, M. M., Carrillo-Reyes, P. (2021). Las plantas vasculares endémicas de la Sierra Madre del Sur, México. *Botanical Sciences*, 99(3): 643-660.
- Arredondo-Arrizón J. (2021) *Vidas y Bebidas Temporada 2: Raicilla* - Episodio 2. <https://www.youtube.com/watch?v=RJa0c20DhHk&t=228s>. Revisado el 14/05/21.
- Arrizón-Gaviño J. (2020). Bebidas fermentadas de agave. CIATEJ MX. <https://ciatej.mx/el-ciatej/comunicacion/Noticias/Bebidas-fermentadas-de-agave/157>. Revisado el 24/05/2021.
- Bhadra, B., Sreenivas, R., Naveen, N., Chaturvedi, P., Sarkar, K., Shivaji, S. (2007). *Pichia cecembensis* sp. nov. isolated from a papaya fruit (*Carica papaya* L., *Caricaceae*). *FEMS yeast research*, 7(4), p.579-584. doi: 10.1111/j.1567-1364.2007.00215.x
- Bellon, R., Schmid, F., Capone, L., Dunn, L., Chambers, J. (2013). Introducing a new breed of wine yeast: interspecific hybridization between a commercial *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast and *Saccharomyces mikatae*. *PLoS one*, 8(4), e62053. doi:10.1371/journal.pone.0062053
- Camacho-Ruiz, R.M., Flores-Montaña, J.L., Espinoza-Andrews, H., Moreno-Vilet, L. (2016). Caracterización de fructanos de agave comerciales por HP-SEC,

HPLC, y DSC. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ).

Carbonero-Zalduegui, P. (1975). *Bioquímica de las fermentaciones*. Universidad Politécnica de Madrid pp.10-11

Casas-Acevedo, A., Aguilar-González, N., De la Garza-Toledo, H., Morlett-Chávez, A., Montet, D., Rodríguez-Herrera, R. (2015). Importancia de las levaduras *no-Saccharomyces* durante la fermentación de bebidas alcohólicas. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, (65): 73-79.

Carrillo-Trueba, A. (2007). Los destilados de agave en México y su denominación de origen. *Ciencias*, (087). <https://www.revistacienciasunam.com/>. Revisado el 11/04/21

Chávez-Parga, M. D. C., Hernández, E. P., Hernández, J. C. G. (2016). Revisión del agave y el mezcal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(1): 148-164. DOI:10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.49552

Chávez, S. (2021). Historia y origen del mezcal. *La Luna Mezcal*. <https://www.lalunamezcal.com/>. Revisado el 14/05/21

Christoph, N., Bauer, C. (2007). Flavor of spirit drinks: Raw materials, fermentation, distillation, and ageing. In *Flavors and fragrances* (pp. 219-239). Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-540-49339-6_10.

Clemente-Jiménez, J.M., Mingorance-Carzola, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F.J., Rodríguez-Vico, F. (2005) Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *Int J Food Microbiol* 98: 301–308. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.06.007

Colunga-García Marín, Zizumbo-Villarreal P., Zizumbo-Villarreal D. (2007). El tequila y otros mezcales del centro-occidente de México: domesticación, diversidad y conservación de germoplasma. En *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves*, pp.113-131.

Córdoba, F. (2021) *Vidas y Bebidas Temporada 2: Raicilla - Episodio 2*. <https://www.youtube.com/watch?v=RJa0c20DhHk&t=228s>. Revisado el 14/05/21.

- De León-Rodríguez, A., González-Hernández, L., Barba de la Rosa, A.P., Escalante-Minakata, P., López, M. (2006) Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave salmiana*. *J Agric Food Chem* 54: 1337–1341. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02359.x
- Dueñas, P. J. (2021) *Vidas y Bebidas Temporada 2: Raicilla* - Episodio 2. <https://www.youtube.com/watch?v=RJa0c20DhHk&t=228s>. Revisado el 14/05/21.
- 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*, 46(6): 626-630. doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02359.x
- Escalante, T., Morrone, J. J. (2002). Métodos para medir la biodiversidad. *Acta Zoológica Mexicana*, (85):195-196.
- Esteve-Zarzoso, B., Peris-Torán, M.J., García-Maiquez, E., Uruburu, F., Querol, A. 2001. Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Journal of Applied Environmental Microbiology* 67: 2056-2061. doi.org/10.1128/AEM.67.5.2056-2061.2001
- Flores Berrios, E. P., Alba González, J. F., Arrizon Gavino, J. P., Romano, P., Capece, A., Gschaedler Mathis, A. (2005). The uses of AFLP for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity between yeasts isolated from Mexican agave-distilled beverages and from grape musts. *Letters in applied microbiology*, 41(2): 147-152. doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01738.x
- Gallone, B., Mertens, S., Gordon, J. L., Maere, S., Verstrepen, K. J., Steensels, J. (2018). Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts. *Current Opinion in Biotechnology*, 49: 148-155. doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.005
- García-Barrón, S. (2012). Efecto de la región de procedencia del agave y las condiciones de fermentación sobre el perfil aromático de mezcal. *Guadalajara: CIATEJ* (Trabajo de Maestría, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

- García-Mendoza A. (2007) Los agaves de México. *Ciencias*, julio-sep. 087 Universidad Autónoma de México. Distrito Federal, México. pp. 14-23. *Red de revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*
- García-Mendoza, A.J. y Franco-Martínez I. S (2018). Actualización de la información de las especies y subespecies de magueyes de Oaxaca, con énfasis en las especies mezcaleras. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. NE012.
- Garibay, M. M. (2019). *Caracterización de la diversidad de levaduras presentes durante el proceso de fermentación del mezcal en el estado de Guerrero* (Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Guerrero).
- Godínez-Hernández, C. I., Aguirre-Rivera, J. R., Juárez-Flores, B. I., Ortiz-Pérez, M. D., Becerra-Jiménez, J. (2016). Extracción y caracterización de fructanos de *Agave salmiana*. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 22(1): 59-72.
- González-Huezo, A., Monti-Colombani B. (2006). Rutas culturales de Jalisco. Itinerarios para conocer la riqueza patrimonial. *En Itinerarios culturales y rutas del patrimonio*. Patrimonio Cultural y Turismo 15. Cuadernos, p.88-99. México: Consejo Nacional para la Cultura y las Artes (CONACULTA).
- Gschaedler, A. C., Flores-Berrios, E. P., Reinhart-Kirchmayr, M., Segura García, L. E. (2018). Item 1023/581. Repositorio CIATEJ. <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1023/581>. Revisado el 18/08/21
- Guevara-Vázquez, E., Valadez-Moctezuma, E., Acosta-Ramos, M., Espinosa-Solares, T., Villanueva-Verduzco, C. (2009). Identificación de levaduras asociadas al huitlacoche. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 15(3):225-230.
- Hutzler, M., Michel, M., Kunz, O., Kuusisto, T., Magalhães, F., Krogerus, K., Gibson, B. (2021). Unique brewing-relevant properties of a strain of *Saccharomyces jurei* isolated from ash (*Fraxinus excelsior*). *Frontiers in microbiology*, 12, p.681.
- Illsley, C., Vega, E., Pisanty, I., Tlacotempa, A., García, P., Morales, P., Calzada, M. (2007). Maguey papalote: hacia el manejo campesino sustentable de un

- recurso colectivo en el trópico seco de Guerrero, México. *En lo Ancestral hay Futuro: del Tequila, los Mezcales y otros Agaves*, 1, p.319-340.
- IMPI, 2022. Información de expedientes electrónicos de propiedad industrial. <http://www.impi.gob.mx>. Revisado el 03/09/21
- Jacques, H.C., López, H.A., Anaya, G.C., Sifuentes, R.A., Taillandier, P., Ramón P.F. (2005). Identificación de levaduras aisladas de mostos de mezcal: identificación morfológica-bioquímica vs molecular. Congreso Ibero-Americano de Ingeniería de Alimentos. CYTED-IPN-UA. Puerto Vallarta, Jalisco, México.
- Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., Pretorius, I. S. (2006). The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. Institute for Wine Biotechnology, Department of Viticulture & Oenology. doi.org/10.21548/27-1-1475
- Kent, M., & Coker, P. (1992). *Vegetation Description and Analysis: A Practical Approach* (Ed.2). pp. 167-169. ISBN 9781119962397. New York: John Wiley and Sons.
- Kirchmayr, M. R., Segura-García, L. E., Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., de la Rosa, M., Mathis, A. G. (2017). Impact of environmental conditions and process modifications on microbial diversity, fermentation efficiency and chemical profile during the fermentation of Mezcal in Oaxaca. *LWT-Food Science and Technology*, 79: 160-169. doi: 10.1016/j.lwt.2016.12.052
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. 5ta. Edición. ISBN:9780080931272. Elsevier. P.87.
- Lane, M. M., Burke, N., Karreman, R., Wolfe, K. H., O'Byrne, C. P., Morrissey, J. P. (2011). Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100(4), pp.507-519.
- Lappe, P. et al., (2008) Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic no distilled and distilled *Agave* beverages. *Federation de European Microbiological Societies*, 8(7): 1037- 1052.
- Lara-Hidalgo, C., Grajales-Lagunes, A., Ruiz-Cabrera, M. A., Ventura-Canseco, C., Gutiérrez-Miceli, F. A., Ruiz-Valdiviezo, V. M., Archila, M. A. (2017). *Agave*

americana honey fermentation by *Kluyveromyces marxianus* strain for “comiteco” production, a spirit from Mexican southeast. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16(3),: 771-779.

Liu, J., Sui, Y., Xie, Z., Chi, M. (2018). Transcriptome profiling reveals differential gene expression associated with changes in the morphology and stress tolerance of the biocontrol yeast, *Pichia cecembensis*. *Biological Control*, 120, pp.36-42. doi: 10.1016/j.biocontrol.2017.05.010

López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., Franco-Cendejas, R. (2014). Basic stains in the microbiology laboratory. *Investigación en Discapacidad*, 3(1), pp.10-18.

Loviso, C. L., Libkind, D. (2018). Síntesis y regulación de compuestos del aroma y el sabor derivados de la levadura en la cerveza: ésteres. *Revista argentina de microbiología*, 50(4): 436-446.

Macías, A., Valenzuela A. (2009). “El tequila en tiempos de la mundialización”. *Comercio Exterior*, Vol. 59 (6): 459-472.

Mansilla, N.L (2018). Estudio de proteínas involucradas en la biogénesis de la citocromo C oxidasa y su papel en el metabolismo energético, el desarrollo vegetal y la respuesta a estrés (Tesis doctoral, Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL-CONICET)). Biblioteca virtual UNL.

Martínez-Hernández, A., Pastrana-Chávez, J., Sánchez-Villarreal, A., Lara-Reyna, J., Herrera-Estrella, L., Herrera-Estrella, A., Simpson-Williamson, J. (2007). Genómica de *Agave tequilana*: Identificación de genes útiles para la industria tequilera y el desarrollo de usos alternativos del agave.

Martínez Rivera, L. M., Gerritsen, P., Rosales Adame, J. J., Moreno Hernández, A., Contreras M, S., Solís M, A., & Olguín L, J. L. (2007). Implicaciones socioambientales de la expansión del cultivo de *Agave azul* (1995–2002) en el municipio de Tonaya, Jalisco, México. *En lo ancestral hay futuro: Del tequila, los mezcales y otros agaves*, pp. 265-284.

Mendoza, M. (2005). Importancia de la identificación de levaduras. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(1),: 15-23.

- Miranda-Castilleja, D. E., Ortiz-Barrera, E., Arvizu-Medrano, S. M., Ramiro-Pacheco, J., Aldrete-Tapia, J. A., Martínez-Peniche, R. Á. (2015). Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces spp.* nativas de viñedos en Querétaro, México. *Agrociencia*, 49(7): 759-773.
- Moreno Hernández, A. (2010). Factores asociados a la sustentabilidad de agroecosistemas de *Agave azul (Agave tequilana Weber)* en la sierra de Amula, Jalisco: propuesta metodológica para su medición (Tesis doctoral: Colegio de Postgraduados).
- Naumov, G. I., James, S. A., Naumova, E. S., Louis, E. J., Roberts, I. N. (2000). Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(5): 1931-1942. doi.org/10.1099/00207713-50-5-1931
- Nelson, D. L., Cuchillo Foix, C. M., Lehninger, A. L., Cox, M. M. (2005). *Lehninger: Principios de Bioquímica* (4a. ed.). Barcelona: Omega.
- Nikulin, J., Krogerus, K., Gibson, B. (2018). Alternative *Saccharomyces* interspecies hybrid combinations and their potential for low-temperature wort fermentation yeast. 35(1): 113-127. doi: 10.1002/yea.3246
- Nolasco-Cancino, H., Santiago-Urbina, J. A., Wachter, C., Ruíz-Terán, F. (2018). Predominant yeasts during artesanal mezcal fermentation and their capacity to ferment maguey. doi:10.3389/fmicb.2018.02900
- Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2005. Bebidas alcohólicas, Especificaciones del Tequila, Diario Oficial de la Federación. Revisado 06/01/22.
- Oda, Y., Tanizaki, S., Yokoyama-Ohtsuka, M., Sakurai, H. (2021). Interspecific hybrid between *Saccharomyces mikatae* and *Saccharomyces cerevisiae* as an alternative strain for bread making. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, pp.127-129.

- Pérez, P. C. (2012). *CCDC56, una proteína esencial para la formación de la citocromo C oxidasa en células humanas* (Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid).
- Pina, C., Santos, C., Couto, J. A., Hogg, T. (2004). Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*—influence of different culture conditions. *Food Microbiology*, 21(4),: 439-447. doi:10.1016/j.fm.2003.10.009
- Potter, G., Swart, C. W., van Wyk, P. W., Duvenhage, M. M., Coetsee, E., Swart, H. C., Speers, R. A. (2018). Compositional, ultrastructural and nanotechnological characterization of the SMA strain of *Saccharomyces pastorianus*: Towards a more complete fermentation yeast cell analysis. *Plos one*, 13(7), e0200552.
- Puerto, M.G., Prudencio-Guerrero, A.L. (2009). Caracterización del agroecosistema tradicional y diversidad in situ de agaves mezcaleros en Monte Grande, Tolimán, Jalisco (Tesis de ingeniería, Universidad de Guadalajara).
- Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F., Manzanares, P. (2001). Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International journal of food microbiology*, 70(3): 283-289. doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00552-9
- Romo, E. A., Ortega, J. L. C., Sánchez, R. E. (2016). Comercio informal en el desarrollo turístico en la región de Puerto Vallarta y Bahía de Banderas. *Examen de tendencias del turismo en el umbral del siglo xxi*, p.167.
- Ruiz-Terán, F., Martínez-Zepeda, P. N., Geyer-de la Merced, S. Y., Nolasco-Cancino, H., Santiago-Urbina, J. A. (2019). Mezcal: indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains and their potential as starter cultures. *Food science and biotechnology*, 28(2): 459-467. doi.org/10.1007/s10068-018-0490-2
- Salas, A. M. B. (2019). Aprovechamiento de los subproductos valiosos de la industria del mezcal en Durango. *Revista Ciencia Administrativa*, Colaboraciones de cuerpos académicos en innovación tecnológica. 12, p.14-23.

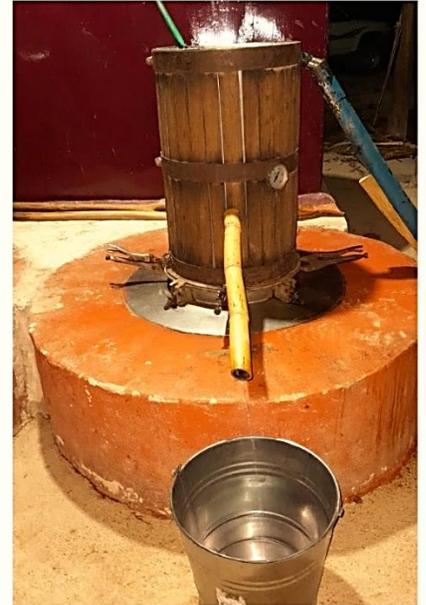
- Secretaría de Salud (2015). *Normas Oficiales Mexicanas*. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/salud>. Revisado el 16/12/21.
- Segura, G. L. E., Kirchmayr, M.R., Flores, B.E.P., Gschaedler, M.A.C. (2010). PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas. *e-Gnosis* 8: 1– 12.
- Simpson, J., A., Martínez, Hernández., M. J., Juárez, A.S., Delgado-Sandoval, A., Sánchez-Villarreal, C., (2011.) Genomic resources and transcriptome mining in *Agave tequilana* GCB. *Bioenergy* 3: 25–36.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., White, M. M. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the national academy of Sciences*, 109(16): 6241-6246. doi: 10.1037/pnas.1117018109
- Telechea, A., Juez, R., Lombardo, N., Riesco, M., Turri, M. (2015). Bacterias lácticas durante la fermentación alcohólica de vinos mendocinos.
- Trujillo, L. E., Menéndez, C., Ochogavía, M. E., Hernández, I., Borrás, O., Rodríguez, R., Hernández, L. (2009). Engineering drought and salt tolerance in plants using SodERF3, a novel sugarcane ethylene responsive factor. *Bioteconología Aplicada*, 26(2): 168-171.
- Uscanga, B. A., Pacheco, J. S., François, J. (2005). Estudio de la variación de la composición de los polisacáridos contenidos en la pared celular de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae*. *e-Gnosis*, (3), 0.
- Vargas, G. J., Peñuela, M., Echeverri, M., Ortiz, M. E., Escobar, M. C., Quintero, J. C. (2001). Producción de alcohol por fermentación con levaduras libres e inmovilizadas. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, (22): 91-97.
- Vásquez, J.A., Ramírez-Castrillón, M., Monsalve, Z.I. (2016). Actualización en caracterización molecular de levaduras de interés industrial. *Rev. Colombiana de Biotecnología* Vol. XVIII No. 2: 129-139. doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61530

- Vázquez-García, J., Vargas-Rodríguez, Y., Cházaro-Basáñez, M. (2007). Diversidad, endemismo, abundancia y rareza de especies de Agave en Jalisco, México. En *Agaves del Occidente de México*. Serie fronteras de Biodiversidad 3. (Ed.1) (pp.23-31). Universidad de Guadalajara.
- Varillas Moreno, G. E. (2019). Aislamiento e identificación de levaduras nativas causantes del deterioro en bebidas no carbonatadas a base de fruta. (Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma).
- Walteros Pinzón, C. D. (2020). Caracterización de cepas de levadura colombiana *Saccharomyces cerevisiae* para su potencial uso en la producción de cerveza "Colombian Ale".
- Whittaker, R. H. (1972). Evolution and measurement of species diversity. *Taxon*, 21(2-3): 213-251. doi.org/10.2307/1218190
- Zurita-Rendón, O.B. (2007). Intervención de factores nucleares en el ensamblaje del complejo IV (citocromo C oxidasa) de *Saccharomyces cerevisiae*". (Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México). <https://repositorio.unam.mx/contenidos/218912>. Revisado el 26/03/22

ANEXOS



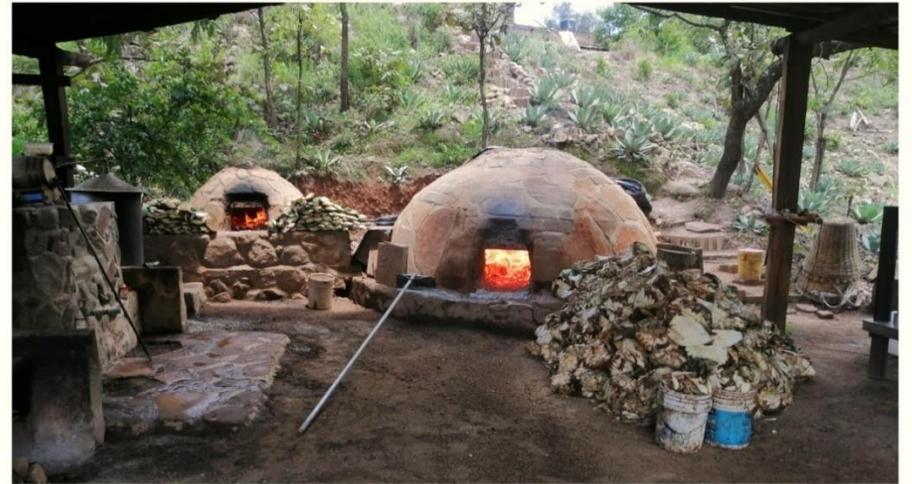
Taberna “Sierra Mascota”, Mascota, Jalisco.



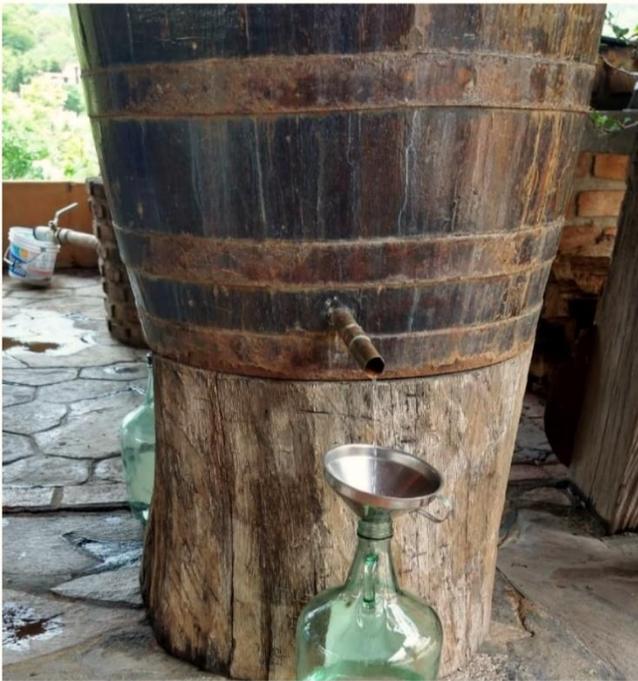
Taberna "Rancho El Cono", Cabo Corrientes, Jalisco.



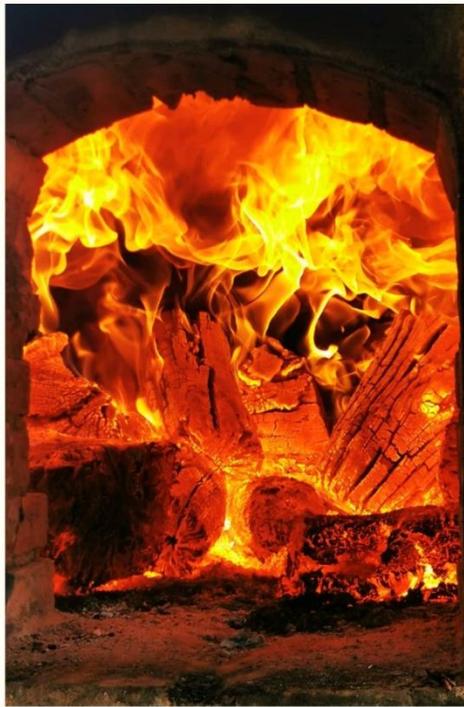
Taberna “El Ciervo”, San José del Mosco, Mascota, Jalisco.



Taberna “El Tio Luis”, San Gregorio, Mixtlán, Jalisco.



Taberna “Hacienda Don Lalín”, La Estancia, SSO, Jalisco.



Taberna “Tesoro del Oeste”, San Sebastian del Oeste, Jalisco.