



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

**METAGENÓMICA DE LOS CONSORCIOS MICROBIANOS
ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DEL MEZCAL ARTESANAL
DE *Agave angustifolia***

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

Presenta:

JAZMÍN HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

Bajo la supervisión de: Teodoro Espinosa Solares, Dr.



Chapingo, Estado de México, agosto 2026

**METAGENÓMICA DE LOS CONSORCIOS MICROBIANOS
ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DEL MEZCAL ARTESANAL
DE *Agave angustifolia***

Tesis realizada por **JAZMÍN HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

DIRECTOR



DR. TEODORO ESPINOSA SOLARES

CO-DIRECTORA



DRA. THALIA GUADALUPE OCHOA BERNAL

ASESOR



DR. ARTEMIO PÉREZ LÓPEZ

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS USADAS	ix
DEDICATORIAS	x
AGRADECIMIENTOS	xi
DATOS BIOGRÁFICOS	xii
RESUMEN GENERAL	xiii
GENERAL ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Literatura citada	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1. El mezcal: marco general	6
2.1.1. Categorías del mezcal	6
2.1.2. Regiones con denominación de origen y zonas productoras.....	8
2.2. El agave como materia prima	10
2.2.1. Especies de agave utilizadas en la producción de mezcal	10
2.2.2. Fisiología y metabolismo	12
2.2.2.1. El metabolismo ácido de las crasuláceas.....	12
2.2.3. Composición química	14
2.2.3.1. Azúcares fermentables en el mosto de agave.....	14
2.3. Fermentación espontánea del mezcal	15
2.3.1. Fermentación	15
2.3.2. Diversidad microbiana en el mosto del mezcal	16
2.4. Análisis ómicos de procesos fermentativos	24
2.4.1. Fundamentos de la metagenómica.....	24
2.4.2. Metagenómica shotgun	25
2.5. Literatura citada	26
3. ANÁLISIS METAGENÓMICO DEL MOSTO DEL MEZCAL	34

3.1. Resumen	34
Abstract	35
3.2. Introducción	36
3.3. Materiales y métodos	37
3.3.1. Proceso de producción de mezcal a partir de <i>Agave angustifolia</i>	37
3.3.2. Recolección de muestras de jugo de agave	39
3.3.3. Cuantificación de sólidos solubles	39
3.3.4. Determinación de azúcares reductores totales en agave crudo y cocido....	39
3.3.5. Determinación de azúcares reductores totales en jugo de agave.....	40
3.3.6. Azúcares reductores directos en agave cocido	40
3.3.7. Riqueza alcohólica.....	41
Jugo de agave	41
Bagazo	41
Vinaza y flemaza.....	41
3.3.8. Extracción de ADN.....	41
3.3.9. Secuenciación de ADN	43
3.3.10. Bioinformática	43
3.4. Resultados y discusión	44
3.4.1. Sólidos solubles totales	44
3.4.2. Azúcares reductores totales en agave crudo y cocido.....	45
3.4.3. Azúcares reductores directos.....	45
3.4.4. Riqueza alcohólica.....	46
Jugo de agave	46
Bagazo de agave.....	47
Vinaza y flemaza.....	49
3.4.5. Fermentación y consumo de azúcares reductores totales.....	50
3.4.6. Perfil taxonómico durante la fermentación del mosto de <i>Agave angustifolia</i>	51
3.4.7. Dinámica microbiana durante la etapa de fermentación	56
3.5. Conclusiones	59

3.6. Literatura citada	60
4. PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL MEZCAL ARTESANAL EN EL PALENQUE MEZCAL ÚNICO, TLACOLULA DE MATAMOROS, OAXACA, MÉXICO	66
4.1. Resumen	66
Abstract	67
4.2. Introducción	68
4.3. Materiales y métodos	68
4.4. Resultados y discusión	69
4.4.1. Proceso de producción de mezcal artesanal	69
Fase de campo: Selección y cosecha del agave “el jimado”	69
Cocción de las piñas de agave	70
Horno de cocción	71
Muestreo de piña cocida dentro del horno	75
Extracción de azúcares: Molienda	77
Etapas de la fermentación	79
Destilación	81
4.5. Conclusiones	84
4.6. Literatura citada	85
5. CONCLUSIONES GENERALES	87
6. ANEXOS	88
Anexo 1. Relación de la cantidad de jugo de mosto de <i>Agave angustifolia</i> para el análisis de azúcares reductores totales.	88
Anexo 2. Las 10 bacterias más abundantes durante la fermentación del mosto de <i>Agave angustifolia</i> y sus funciones en procesos de fermentación	88
6.1. Literatura citada	92

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Producción de mezcal por tipo de maguey referido a 45 % Alc. Vol.....	11
Cuadro 2. Distribución de microorganismos bacterianos y levaduras identificados en el mosto de mezcal de distintas regiones de México.	20
Cuadro 3. Distribución de microorganismos bacterianos y levaduras identificados en el mosto de mezcal de distintas regiones de México (continuación).	21
Cuadro 4. Distribución de microorganismos bacterianos y levaduras identificados en el mosto de mezcal de distintas regiones de México (continuación).	22
Cuadro 5. Distribución de microorganismos bacterianos y levaduras identificados en el mosto de mezcal de distintas regiones de México (continuación).	23
Cuadro 6. Riqueza alcohólica del bagazo agotado al final de la destilación.	48
Cuadro 7. Valores de pH y de riqueza alcohólica de la vinaza de cada alambique, correspondientes a cada una de las cinco tinajas de fermentación.	50
Cuadro 8. Cantidad de sólidos solubles (°Brix) presentes en el jugo del mosto y volumen requerido en mL para el análisis de azúcares reductores.	88
Cuadro 9. Especies bacterianas encontradas durante la fermentación del mosto de <i>Agave angustifolia</i>	89
Cuadro 10. Especies bacterianas encontradas durante la fermentación del mosto de <i>Agave angustifolia</i> (continuación).	90
Cuadro 11. Especies bacterianas encontradas durante la fermentación del mosto de <i>Agave angustifolia</i> (continuación).	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estados productores de mezcal a nivel nacional en 2025. Adaptado de COMERCAM (2025).....	9
Figura 2. Ciclo del metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) en agave para la fijación y reutilización del CO ₂ . PPCK: fosfoenolpiruvato carboxilasa kinasa; TDT: transportador de dicarboxilato de tonoplasto; PPDK-RP: proteína reguladora del piruvato ortofosfato diquinasa. Adaptado de Yin et al. (2018).	14
Figura 3. Distribución de bacterias reportadas en mezcal de Durango, San Luis Potosí y Tamaulipas. Elaboración propia a partir de datos recopilados de Escalante-Minakata et al. (2008), Narvaez-Zapata et al. (2010), Verdugo Valdez et al. (2011), Arrizon et al. (2012), Páez-Lerma et al. (2013), Martínez-Estrada et al. (2024).	17
Figura 4. Distribución de levaduras en cuatro estados de México. Elaboración propia a partir de datos recopilados de Escalante-Minakata et al. (2008), Verdugo Valdez et al. (2011), Arrizon et al. (2012), Páez-Lerma et al. (2013), Pérez et al. (2013), Kirchmayr et al. (2017), Nolasco-Cancino et al. (2018), Espinoza-Martinez et al. (2023).	18
Figura 5. Proceso de producción de mezcal a partir de <i>Agave angustifolia</i> en el palenque artesanal Mezcal Único, en Tlaculola de Matamoros, Oaxaca.....	38
Figura 6. Consumo de sólidos solubles (°Brix) en función de la temperatura interna de las tinas durante la fermentación del mosto.	44
Figura 7. Cinética del aumento de la riqueza alcohólica y del pH durante la fermentación del mosto de agave.	47
Figura 8. Riqueza alcohólica de la fracción sólida (bagazo) del mosto de agave proveniente de las tinas de fermentación.....	48
Figura 9. Comportamiento del consumo de azúcares y la producción de alcohol durante la etapa de fermentación en el Palenque Mezcal Único, Tlacolula de Matamoros, Oaxaca, México.....	51
Figura 10. Dinámica de la abundancia relativa (>1%) de los géneros bacterianos identificados durante la etapa de fermentación del mosto de <i>Agave angustifolia</i>	52
Figura 11. Diversidad taxonómica de especies bacterianas con abundancia > 1% en muestras de mosto de <i>Agave angustifolia</i>	53
Figura 12. Composición taxonómica a nivel de especies de levaduras en las cinco tinas de fermentación del mosto de <i>Agave angustifolia</i>	56

Figura 13. Análisis NMDS basado en las distancias de Bray-Curtis que muestra la variación en la estructura de la comunidad microbiana durante la fermentación del mosto de agave. Los puntos representan muestras individuales y las elipses, la dispersión por día de fermentación.	57
Figura 14. Análisis de redundancia (RDA) de la comunidad bacteriana en función de las variables fisicoquímicas durante la fermentación del mosto de <i>Agave angustifolia</i>	58
Figura 15. Jimado de la piña de agave mediante el uso de coa durante la etapa de cosecha.	70
Figura 16. Ruta de traslado de las piñas de agave de La Unión a la destilería Mezcal Único.	70
Figura 17. Partes de la piña de agave cruda: A) corazón, B) penca y C) cogollo.	71
Figura 18. Horno de bóveda utilizado para cocer piñas de agave.	72
Figura 19. Acomodo de las piñas en el horno de bóveda en forma de luna.	73
Figura 20. Tapado del horno con materiales (petates, lonas de plástico, tierra y llojuela) que favorecen la cocción de las piñas de agave.	73
Figura 21. Hidratación del horno de bóveda durante el segundo día de cocción.	74
Figura 22. Procedimiento de muestreo de las piñas de agave cocidas en horno de bóveda.	75
Figura 23. Grado de cocción de las piñas de agave: A) coloración amarilla, B) coloración café.	76
Figura 24. Destapado del horno tras el tiempo de cocción establecido.	77
Figura 25. Primera molienda de piñas cocidas en hebradora de agave.	78
Figura 26. Molienda de las fibras de agave mediante tahona de piedra de cantera, accionada por un motor.	78
Figura 27. Mosto de <i>Agave angustifolia</i> en reposo durante las primeras 25 horas de fermentación.	79
Figura 28. Formulación de las tinas de fermentación mediante la compactación del bagazo de <i>Agave angustifolia</i>	80
Figura 29. Destilación del mosto fermentado de <i>Agave angustifolia</i> en alambiques de cobre.	82

ABREVIATURAS USADAS

°Brix: Grados Brix

°C: Grados Celsius

ADN: Ácido desoxirribonucleico

bp: pares de bases (del inglés, *base pairs*)

FastQ: formato de almacenamiento de datos de secuenciación de ADN o ARN sin procesar.

g: Gramo

mL: Mililitro

ng/μL: Nanogramos por microlitro)

pH: Potencial de hidrógeno

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

μL: Microlitro

DEDICATORIAS

A Dios,

A mi familia,

*A todos aquellos amigos que se cuentan con los dedos de una mano
& para quienes ya no están físicamente conmigo, pero viven por siempre
en mi corazón y en mi memoria.*

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada que hizo posible la realización de este proyecto. A la Dirección General de Investigación y Posgrado (DGIPS) por la financiación de los proyectos Metagenómica y metabolómica de mosto de mezcal de espadín, tabasiche y medrecuishe de la región de Xitlapehua, Oaxaca (25017-C-62) y Metabolómica de la fermentación del mosto de mezcal espadín en Tlacolula de Matamoros, Oaxaca (26061-C-629). De igual forma, agradezco a mi comité asesor por compartir sus conocimientos y guiarme a lo largo del desarrollo de esta investigación. A todos los integrantes del Palenque Mezcal Único de Tlacolula de Matamoros, Oaxaca, México, por abrirnos las puertas para estudiar el proceso de producción del mezcal, sin ellos, no hubiera sido posible el estudio de las comunidades microbianas en el mosto de agave. Asimismo, expreso mi agradecimiento al equipo del Laboratorio de Biología Molecular del Lanisaf, al equipo de Bioprocesos, a los maestros mezcaleros Don Osvaldo y Don Jaime, de Xitlapehua, Oaxaca, y a todas aquellas personas que, con sus valiosas observaciones y sugerencias, enriquecieron el desarrollo de esta investigación.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre	Jazmín Hernández Hernández
Fecha de nacimiento	27 de octubre de 2001
Lugar de nacimiento	Platón Sánchez, Veracruz, México
CURP	HEHJ011027MVZRRZA5
Profesión	Ingeniería Agroindustrial
Cédula profesional	14508771

Desarrollo académico

Licenciatura (2019-2022)

Universidad Politécnica de Huejutla, Hgo. (UPH).

Preparatoria (2016-2019)

Telebachillerato (TEBAEV) sede Platón Sánchez, Ver., México.

RESUMEN GENERAL

METAGENÓMICA DE LOS CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DEL MEZCAL ARTESANAL DE *Agave angustifolia*

En México, las bebidas alcohólicas elaboradas a partir de agaves mediante fermentación espontánea representan un pilar de enorme valor económico, cultural y biotecnológico. Entre ellas, destaca el mezcal artesanal, cuyo perfil sensorial está determinado por consorcios microbianos que producen etanol y compuestos volátiles clave. Sin embargo, la caracterización taxonómica profunda de alta resolución de estas comunidades mediante enfoques independientes de cultivo ha sido históricamente limitada. El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar la estructura, diversidad y dinámica de la comunidad microbiana asociada a la fermentación del mosto de *Agave angustifolia* en el palenque artesanal Mezcal Único (Tlacolula de Matamoros, Oaxaca, México), así como evaluar su sucesión ecológica y su correlación con parámetros fisicoquímicos operacionales. Para ello, se recolectaron muestras en cinco tinajas de madera durante cuatro días consecutivos. El ADN fue secuenciado mediante un enfoque masivo de metagenómica shotgun. El análisis bioinformático reveló una clara sucesión microbiana a lo largo del proceso fermentativo. A nivel bacteriano, se identificó la dominancia de las familias *Lactobacillaceae* y *Acetobacteraceae*, sobresaliendo las especies *Lentilactobacillus hilgardii*, *Lactiplantibacillus plantarum* y *Levilactobacillus brevis*. *Saccharomyces cerevisiae* presentó la mayor abundancia relativa en todas las etapas, coexistiendo en proporciones menores con *Torulaspora delbrueckii* y *Zygosaccharomyces rouxii*. El análisis ecológico de escalamiento multidimensional no métrico basado en las distancias de Bray-Curtis mostró una separación de los consorcios según el día de fermentación, con un índice de *stress* altamente confiable (0.0386). Estos cambios se correlacionaron estrechamente con el descenso de sólidos solubles y de azúcares reductores totales, el incremento de la riqueza alcohólica y las fluctuaciones térmicas del mosto. Los resultados obtenidos no solo amplían el conocimiento sobre la ecología microbiana del mezcal oaxaqueño, sino que también proporcionan bases científicas y metodológicas sólidas para propuestas de optimización de procesos, control de calidad, valorización de subproductos y protección biotecnológica del saber tradicional.

Palabras clave: *Agave angustifolia*, metagenómica shotgun, dinámica microbiana, sucesión ecológica, Oaxaca.

Tesis de Maestría en Ciencias. Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Jazmín Hernández Hernández

Director de tesis: Dr. Teodoro Espinosa Solares

GENERAL ABSTRACT

METAGENOMICS OF MICROBIAL CONSORTIA ASSOCIATED WITH THE FERMENTATION OF ARTISANAL MEZCAL FROM *Agave angustifolia*

In Mexico, alcoholic beverages made from agaves through spontaneous fermentation represent a pillar of immense economic, cultural, and biotechnological value. Among these, artisanal mezcal stands out; its sensory profile is determined by microbial communities that produce ethanol and key volatile compounds. However, in-depth and high-resolution taxonomic characterization, using culture-independent approaches, has historically been limited. The objective of this study was to characterize the structure, diversity, and dynamics of the microbial community associated with the fermentation of *Agave angustifolia* must at the artisanal Mezcal Único distillery (Tlacolula de Matamoros, Oaxaca, Mexico), as well as to evaluate its ecological succession and its correlation with operational physicochemical parameters. To this end, kinetic samples were collected from five wooden vats over four consecutive days. DNA was sequenced using a high-throughput shotgun metagenomics approach. Bioinformatic analysis revealed a clear microbial succession throughout the fermentation process. At the bacterial level, the Lactobacillaceae and Acetobacteraceae families were found to be dominant, with the species *Lencilactobacillus hilgardii*, *Lactiplantibacillus plantarum*, and *Levilactobacillus brevis* standing out. *Saccharomyces cerevisiae* showed the highest relative abundance at all stages, coexisting in smaller proportions with non-*Saccharomyces* yeasts *Torulaspora delbrueckii* and *Zygosaccharomyces rouxii*. The Non-Metric Multidimensional Scaling ecological analysis based on Bray-Curtis distances confirmed the separation of the microbial communities according to the day of fermentation, with a highly reliable Stress Index (0.0386). These changes correlated closely with decreases in soluble solids (°Brix) and total reducing sugars, increases in alcohol content, and temperature fluctuations in the must. The results not only expand our understanding of the microbial ecology of Oaxacan mezcal but also provide a rigorous scientific and methodological foundation for proposals to optimize processes, improve quality control, valorize byproducts, and biotechnologically protect traditional knowledge.

Keywords: *Agave angustifolia*, shotgun metagenomics, microbial dynamics, ecological succession, Oaxaca.

Master's Thesis in Science. Program of Agro-Food Science and Technology,
Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Jazmín Hernández Hernández

Advisor: Teodoro Espinosa Solares, Dr.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El mezcal es una bebida alcohólica destilada profundamente ligada a la identidad biocultural y la historia de México. Protegida bajo una estricta Denominación de Origen, la norma oficial mexicana NOM-070-SCFI-2016 (2017) establece que esta bebida debe elaborarse al 100% con materias primas de maguey o agave, mediante la destilación de jugos fermentados por microorganismos, ya sean espontáneos o cultivados, extraídos de cabezas maduras previamente cocidas.

Desde el punto de vista socioeconómico, la industria del mezcal ha experimentado un crecimiento sin precedentes en la última década; el estado de Oaxaca se consolida como el epicentro de este sector al aportar el 90.70% de la producción total nacional, seguido de entidades como Puebla con el 4.94% (COMERCAM, 2025).

A pesar de su relevancia macroeconómica, el núcleo de la producción artesanal y ancestral del mezcal descansa en un fenómeno biotecnológico altamente complejo e impredecible: la fermentación espontánea o silvestre. A diferencia de otros sectores agroalimentarios globalizados que emplean cultivos iniciadores comerciales (starters) monoclonales, el bouquet, el aroma y la autenticidad sensorial que distinguen a cada lote de mezcal (Avila-Reyes et al., 2025) se deben a la actividad metabólica coordinada de consorcios polimicrobianos nativos de bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas y una amplia diversidad de levaduras sacaromicéticas y no sacaromicéticas presentes de forma endémica en los palenques. Estos microorganismos no solo metabolizan los azúcares reductores derivados de la hidrólisis térmica de los frútanos del agave, sino que también sintetizan metabolitos secundarios (ésteres, alcoholes

superiores, ácidos orgánicos y furanos) (Rodríguez et al., 2006) que esculpen el perfil aromático de la bebida.

En los últimos años, la emergencia de las ciencias ómicas (Biswas & Sarkar, 2018) ha revolucionado la comprensión de los sistemas fermentativos, específicamente, la metagenómica *shotgun* (secuenciación masiva de escopeta) se presenta como una de las herramientas biotecnológicas más robustas en la actualidad (Cortés-López et al., 2020), ya que permite la extracción y secuenciación directa del ADN genómico total de una muestra ambiental sin asilamiento previo (Márquez-Godoy & González-Escobedo, 2022). A diferencia de la secuenciación dirigida de amplicones (como el gen 16S rRNA o la región ITS), que se limita a describir “quiénes están presentes” en la comunidad, el enfoque *shotgun* ofrece la resolución analítica para identificar microorganismos a nivel de especie, rastrear linajes finos y dilucidar el potencial funcional (Puig-Castellví et al., 2023) y las rutas metabólicas activas del microbioma (Aguiar-Pulido et al., 2016).

Diversos estudios han abordado la fermentación del mezcal en distintas regiones, por ejemplo, Kirchmayr et al. (2017), realizaron un estudio durante dos años consecutivos en dos destilerías de mezcal en Oaxaca para identificar levaduras y bacterias durante la fermentación, combinando técnicas tradicionales y moleculares. Torres-Velázquez et al. (2022) analizaron la fermentación espontánea del mezcal en Durango con técnicas moleculares con el fin de identificar la población bacteriana y evaluar su potencial en el control del proceso fermentativo. En estudios más recientes, Kirchmayr et al. (2024) aplicaron técnicas de cultivo y metagenómica para obtener información de lotes específicos de la composición bacteriana en mezcales del estado de Guerrero.

Si bien estos estudios han generado conocimiento relevante sobre el entendimiento detallado de las comunidades microbianas en mezcales, no obstante, aún existe una brecha respecto a los que se producen en Oaxaca, el estado con mayor producción a nivel nacional.

Bajo esta premisa, el objetivo de esta investigación fue estudiar la fermentación del mosto de *Agave angustifolia* en condiciones reales de producción artesanal en el municipio de Tlacolula de Matamoros, Oaxaca. A través de una aproximación metagenómica de alta resolución, combinada con el seguimiento riguroso de parámetros cinéticos agroindustriales, para descifrar la arquitectura y la sucesión de los consorcios nativos, sentando bases biotecnológicas esenciales para la estandarización controlada, la reproducibilidad y la salvaguarda de la denominación de origen del mezcal artesanal mexicano, sin alterar las valiosas prácticas tradicionales que le otorgan su mística y excelencia internacional.

El presente trabajo está dividido en cuatro capítulos:

Capítulo 1. Este capítulo ofrece una introducción general acerca del mezcal y los estudios metagenómicos realizados.

Capítulo 2. En esta sección se presenta el estado del arte del mezcal, las bacterias y levaduras encontradas en diferentes estados de la Republica Mexicana.

Capítulo 3. Esta sección se centra en el estudio metagenómico aplicado en el mosto de *Agave angustifolia* para la producción de mezcal en el Palenque Artesanal Mezcal, ubicado en Tlacolula de Matamoros, Oaxaca, México.

Capítulo 4. Se presenta el estudio del proceso de producción de mezcal realizado en el Palenque Artesanal Mezcal, ubicado en Tlacolula de Matamoros, Oaxaca, México, en la que se detalla cada etapa que involucra la preparación del mezcal.

Para la redacción de este trabajo se utilizaron dos herramientas de apoyo para la escritura académica. Particularmente, se empleó Grammarly Premium (complemento para Microsoft Word), basada en inteligencia artificial, para la revisión y mejora de la redacción, la gramática y la ortografía; asimismo, se utilizó EndNote 2025 (Bld 21347; Clarivate) como gestor bibliográfico para la organización de las referencias y la inserción de citas conforme al estilo correspondiente al manual de la tesis.

1.1. Literatura citada

- Aguilar-Pulido, V., Huang, W., Suarez-Ulloa, V., Cickovski, T., Mathee, K., & Narasimhan, G. (2016). Metagenomics, Metatranscriptomics, and Metabolomics Approaches for Microbiome Analysis. *Evol Bioinform Online*, 12(Suppl 1), 5–16. <https://doi.org/10.4137/EBO.S36436>
- Avila-Reyes, S. V., Jimenez-Aparicio, A. R., Melgar-Lalanne, G., Fajardo-Espinoza, F. S., & Hernandez-Sanchez, H. (2025). Mezcal: A Review of Chemistry, Processing, and Potential Health Benefits. *Foods*, 14(8). <https://doi.org/10.3390/foods14081408>
- Biswas, R., & Sarkar, A. (2018). *Omics Tools in Soil Microbiology The State of the Art* (Vol. 3). https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-10-6178-3_3
- COMERCAM. (2025). *Informe estadístico 2025*. https://comercam-dom.org.mx/wp-content/uploads/2025/06/INFORME_PUBLICO2025.pdf
- Cortés-López, N. G., Ordóñez-Baquera, P. L., & Domínguez-Viveros, J. (2020). Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 11(4), 1150–1173. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i4.5202>
- Kirchmayr, M. R., Segura-García, L. E., Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., de la Rosa, M., & Gschaedler Mathis, A. (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. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.052>
- Kirchmayr, M. R., Vital-López, L., Arellano-Plaza, M., Gschaedler, A. C., Larralde-Corona, C. P., & Narváez-Zapata, J. A. (2024). Bacterial community inferred by metagenomic analysis in an artisanal mezcal distillery in Guerrero, Mexico. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 58. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103159>
- Márquez-Godoy, J. N., & González-Escobedo, R. (2022). Tecnologías ómicas para la exploración de la biocostra del suelo. *Revista Terra Latinoamericana*, 40. <https://doi.org/10.28940/terra.v40i0.1062>
- NOM-070-SCFI-2016, N. O. M. (2017). *NORMA Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones*. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5472787&fecha=23/02/2017#gsc.tab=0
- Puig-Castellví, F., Pacheco-Tapia, R., Deslande, M., Jia, M., Andrikopoulos, P., Chechi, K., Bonnefond, A., Froguel, P., & Dumas, M.-E. (2023). Advances in the integration of metabolomics and metagenomics for human gut microbiome and their clinical applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 167. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117248>
- Rodríguez, A. D. L., Hernández, L. G., Rosa, A. P. B. d. I., Minakata, P. E., & IÓPEZ, M. G. (2006). Characterization of Volatile Compounds of Mezcal,

an Ethnic Alcoholic Beverage Obtained from Agave salmiana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54. <https://doi.org/10.1021/jf052154+>

Torres-Velázquez, D. S., Rojas-Contreras, J. A., Soto-Cruz, N. Ó., Utriz Estrada, N., López Miranda, J., Kirchmayr, M., & Páez-Lerma, J. B. (2022). Bacterial population monitoring during alcoholic fermentation of mezcal in Durango by DGGE. *International Journal of Agriculture and Natural Resources*, 49(2). <https://doi.org/10.7764/ijanr.v49i2.2367>

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. El mezcal: marco general

La Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones, define al mezcal como bebida alcohólica destilada mexicana, 100 % de maguey o agave, obtenida por destilación de jugos fermentados con microorganismos espontáneos o cultivados, extraídos de cabezas maduras de magueyes o agaves cocidos. El líquido obtenido posee un aroma y un sabor derivados de la especie de maguey o agave utilizada. Los factores que intervienen en las cualidades sensoriales del mezcal son el tipo de suelo, la topografía, el clima, el agua, el productor autorizado, el maestro mezcalero, la graduación alcohólica y los microorganismos (Arellano-Plaza et al., 2022). Para nombrar al producto final del agave como mezcal y que sea reconocido como una bebida con denominación de origen, la NOM-070-SCFI-2016 establece requisitos que deben cumplir los productores respecto del proceso de producción, así como las regiones de México donde se puede producir el mezcal y los tipos de agave permitidos. Con el fin de preservar el patrimonio cultural de cada región que produce mezcal, así como proteger la identidad de este producto.

2.1.1. Categorías del mezcal

El mezcal, como bebida fermentada y destilada, tiene una larga historia en México, ya que no solo se produce en una sola región, sino también en diversas regiones del país, lo que ha dado lugar a variantes. La NOM-070-SCFI-2016 establece tres categorías de mezcal: mezcal, mezcal artesanal y mezcal ancestral, que se diferencian por el método de producción. Las diversas variantes dentro de cada categoría comparten un proceso general de producción que incluye la cosecha, la cocción, la molienda, la fermentación y la destilación del

agave. Sin embargo, las etapas se llevan a cabo con diferencias respecto de las prácticas tradicionales en el uso de equipos, materiales y fuentes de energía, así como en la incorporación de herramientas tecnológicas específicas según la categoría de mezcal que se desee obtener.

A continuación, se presenta una lista en la que se exponen las diferencias entre estas categorías:

1. Mezcal

- a. Cocción: cocimiento de cabezas o jugos de maguey o agave en hornos de pozo, mampostería o autoclave
- b. Molienda: tahona, molino chileno o egipcio, trapiche, desgarradora, tren de molinos o difusor.
- c. Fermentación: en recipientes de madera, piletas de mampostería o tanques de acero inoxidable.
- d. Destilación: alambiques, destiladores continuos o columnas de cobre o acero inoxidable.

2. Mezcal artesanal

- a. Cocción: cocimiento de cabezas de maguey o de agave en hornos de pozo o en hornos elevados de mampostería.
- b. Molienda: con mazo, tahona, molino chileno o egipcio, trapiche o desgarradora.
- c. Fermentación: oquedades en piedra, suelo o tronco, piletas de mampostería, recipientes de madera o barro, pieles de animal, cuyo proceso puede incluir la fibra del maguey o agave (bagazo).
- d. Destilación: con fuego directo en alambiques de caldera de cobre u olla de barro y montera de barro, madera, cobre o acero inoxidable; cuyo proceso puede incluir la fibra del maguey o agave (bagazo).

3. Mezcal ancestral

- a. Cocción: cocimiento de cabezas de maguey o agave en hornos de pozo.
- b. Molienda: con mazo, tahona, molino chileno o egipcio.

- c. Fermentación: oquedades en piedra, suelo o tronco, piletas de mampostería, recipientes de madera o barro, pieles de animal, cuyo proceso puede incluir la fibra del maguey o agave (bagazo).
- d. Destilación: con fuego directo en olla de barro y montera de barro o madera; cuyo proceso puede incluir la fibra del maguey o agave (bagazo).

Todas estas diferencias en los métodos de producción se relacionan con las condiciones geográficas, culturales y productivas de las distintas regiones mezcaleras del país, lo que da lugar a una diversidad de prácticas y expresiones regionales. En el siguiente apartado se describen las zonas productoras de mezcal en el territorio mexicano y su relevancia para la producción nacional.

2.1.2. Regiones con denominación de origen y zonas productoras

Se ha reportado que los cuatro principales estados productores de mezcal son Oaxaca, Durango, Michoacán y Puebla. Cada uno de estos estados cuenta con la Denominación de Origen (DO), una categoría que reconoce los productos como exclusivos en función de su ubicación geográfica, de las prácticas tradicionales de producción y de la materia prima empleada (Tortorelli, 2010). Desde 1994, México ha obtenido la denominación de origen para el mezcal, siendo los estados de Guerrero, Oaxaca, Durango, San Luis Potosí y Zacatecas los primeros en recibir dicha protección (IMPI, 1994).

La **Figura 1** muestra que Oaxaca es el principal estado productor de mezcal y concentra el mayor volumen de producción a nivel nacional. En esta entidad, *Agave angustifolia* es la especie más utilizada en los siete distritos del Valle Central, conocidos como la “Región del Mezcal”, que se componen de los municipios de Tlacolula, Yautepec, Miahuatlán, Ejutla, Ocotlán, Zimatlán y Sola de Vega (Bautista & Ramírez, 2008).

En el estado de Durango, diversos municipios cuentan con poblaciones silvestres de agaves que cuentan con permisos para el aprovechamiento del maguey en la elaboración de mezcal. Entre los predios autorizados se encuentran San

Francisco del Manzanal, Nicolás Romero, Tomás Urbina, Valle Florido, Libertad e Independencia, Colonia Minerva, Pino Suárez, Matamoros, 18 de marzo y Antonio Gaxiola (Barraza et al., 2014). Por su parte, Michoacán, considerado el tercer estado con mayor producción de mezcal, cuenta con 29 municipios con denominación de origen (Ruiz-Camou et al., 2023), entre los que destacan Acuitzo, Aguililla, Ario, Buenavista, Charo, Chinicuila, Coalcomá de Vázquez Pallares, Cotija, Cojumatlán de Régules, Erongarícuaro, La Huacana, Tacámbaro, Turicato, Tzitzio, Hidalgo, Salvador Escalante, entre otros.

En el caso del estado de Puebla, este abarca 115 municipios con Denominación de Origen del mezcal, lo que lo posiciona como el segundo estado con mayor número de localidades reconocidas con este distintivo. Entre los municipios con DO se encuentran Acajete, Acatlán de Osorio, Acatzingo, Acteopan, Ahuatlán, Ahuehuetitla, Ajalpan, Albino Zertuche, Altepexi, Amozoc, Aquixtle, Atexcal, Atlixco, Atoyatempa, Atzala, Axutla, Caltepec, entre otros. Asimismo, San Luis Potosí, sexto estado productor de mezcal, cuenta con 57 municipios con denominación de origen. Mientras que Zacatecas cuenta con 54 municipios validados, Tamaulipas con 11 y Guanajuato con únicamente 2 municipios, de acuerdo con el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI, 2015).

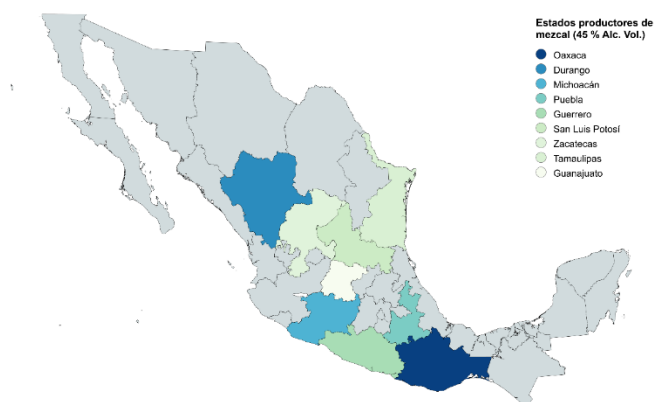


Figura 1. Estados productores de mezcal a nivel nacional en 2025. Adaptado de COMERCAM (2025).

2.2. El agave como materia prima

2.2.1. Especies de agave utilizadas en la producción de mezcal

El mezcal se obtiene a partir de diferentes especies del género *Agave*, perteneciente a la familia Asparagaceae y subfamilia Agavoideae, cuya distribución natural se extiende desde el sur de los Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela (García, 2007). Este género abarca aproximadamente 210 especies, de las cuales 159 se encuentran presentes en México, lo que representa cerca del 75 % del total; de estas, 129 son endémicas del territorio mexicano (García Mendoza et al., 2019). Esta amplia diversidad botánica ha favorecido el aprovechamiento del agave para la obtención de productos alimentarios, bebidas y artesanías.

Por muchos años, los azúcares del agave han sido usados para la producción de bebidas alcohólicas fermentadas como el aguamiel y pulque (Astudillo-Melgar et al., 2025; Castañeda-Ovando et al., 2023; Lappe-Oliveras et al., 2008). Mientras que otras bebidas de esta planta deben someterse a fermentación y destilación, los jugos extraídos del agave cocido se someten a estas etapas para obtener tequila, mezcal, bacanora, raicilla y sotol (Aldrete-Tapia et al., 2020; Gutiérrez-Coronado et al., 2007).

En particular, la producción de mezcal se caracteriza por emplear una gran diversidad de especies de agave. Se estima que alrededor de 42 especies pueden utilizarse para la preparación de esta bebida ancestral (Colunga et al., 2007), lo que la distingue de otras bebidas de agave que emplean una sola especie. La diversidad de especies influye en la composición química del mosto, especialmente en el contenido de carbohidratos fermentables, lo que afecta la dinámica microbiana durante la fermentación espontánea y, en consecuencia, el perfil sensorial del destilado (Michel-Cuello et al., 2021). Sin embargo, la preferencia por determinadas especies depende de factores como la disponibilidad de la materia prima, el rendimiento fermentativo, las características sensoriales y la demanda del mercado. De acuerdo con datos del Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM, 2025), el uso de las

diferentes especies de agave en la producción de mezcal presenta una distribución variable entre los estados productores.

Cuadro 1. Producción de mezcal por tipo de maguey referido a 45 % Alc. Vol.

No.	Tipo de maguey	Porcentaje que representa
1	Maguey espadín (<i>Agave angustifolia</i>)	85.0 %
2	Maguey cenizo (<i>Agave durangensis</i>)	2.47 %
3	Maguey tobalá (<i>Agave potatorum</i>)	1.00 %
4	Maguey verde (<i>Agave salmiana</i>)	0.83 %
5	Maguey papalote (<i>Agave cupreata</i>)	0.68 %
6	Maguey azul (<i>Agave tequilana</i>)	0.67 %
7	Maguey tepeztate (<i>Agave marmorata</i>)	0.46 %
8	Maguey cuishe (<i>Agave karwinskii</i>)	0.44 %
9	Ensamblés	5.54 %

Fuente: COMERCAM, 2025.

Como se observa en el **Cuadro 1**, el maguey espadín (*Agave angustifolia*) predomina en la producción de mezcal debido a su alta disponibilidad, su ciclo de maduración y su elevado rendimiento en azúcares fermentables. En contraste, otras especies como *Agave durangensis*, *A. potatorum* y *A. cupreata* no se emplean de manera constante debido a su escasa disponibilidad en algunas regiones, tiempo de maduración prolongado y su *status* de conservación (Arellano-Plaza et al., 2022).

Por otro lado, en algunas regiones mezcaleras se elaboran ensamblés de agave, que consisten en la combinación de dos o más especies en un mismo lote de producción de mezcal. Esta práctica tradicional es una estrategia que responde a la disponibilidad de las especies de agave. Esta mezcla de distintas especies de agave aporta una mayor complejidad fermentativa, reflejada en el aroma, el sabor y la calidad del destilado, lo que favorece la generación de expresiones sensoriales únicas del mezcal, ya que las diferentes concentraciones de azúcares y la microbiota bacteriana asociada a cada especie influyen en la

formación de compuestos aromáticos distintivos. La versatilidad del agave espadín ha propiciado su uso como complemento en diversos ensambles con agaves silvestres, los cuales presentan tiempos de maduración más prolongados o rara vez se encuentran en el ambiente natural (Rieger, 2025).

2.2.2. Fisiología y metabolismo

2.2.2.1. El metabolismo ácido de las crasuláceas

El metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) es una vía fotosintética presente en diversas familias botánicas, tales como Agavaceae, Aizoaceae, Asteraceae, Cactaceae, Crassulaceae y Orchidaceae, estas hacen uso de la enzima málica NADP para la descarboxilación de ácidos orgánicos, mientras que las familias Asclepiadaceae, Bromeliaceae, Euphorbiaceae y Liliaceae emplean la carboxiquinasa PEP (Osmond, 1978).

Las especies del género *Agave* usan este mecanismo fisiológico para adaptarse a los ambientes calurosos y secos con el propósito de emplear eficientemente el consumo de agua a causa de los ambientes áridos y semiáridos (Stewart, 2015). Básicamente, la fotosíntesis del CAM ocurre cuando los estomas se abren de noche para intercambiar ácidos orgánicos y gases, mientras que durante el día se mantienen cerrados, lo que reduce la pérdida de agua (Orlov et al., 2022).

La **Figura 2** describe visualmente el metabolismo CAM, en el que se divide en cuatro fases principales que ocurren a lo largo del ciclo día-noche.

Fase I (noche): durante la noche, los estomas comienzan a abrirse para permitir la entrada de CO₂ atmosférico mediante la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), lo que genera oxaloacetato (OAA), que es reducido a malato por la NAD(P)-malato deshidrogenasa (MDH) y se almacena como ácido málico (Borland et al., 2014).

Fase II (amanecer): el incremento de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) durante las primeras horas de la mañana provoca la disminución progresiva de la actividad de la PEPC y la activación de la enzima ribulosa-1,5-bifosfato

carboxilasa/oxigenasa (RUBISCO), dando lugar a un metabolismo simultáneo de tipo CAM y C3 (Griffiths, 1989).

Fase III (día): en esta fase, los estomas se encuentran cerrados y no hay entrada de CO₂ del exterior, lo que provoca la descarboxilación del malato; internamente, se libera CO₂ en el interior de la célula para ser fijado por la RUBISCO en el ciclo de Calvin, lo que permite la síntesis de carbohidratos (Osmond, 1978).

Fase IV (final del día): el agotamiento de los ácidos orgánicos acumulados durante la fase I provoca una disminución de la presión interna de CO₂; en consecuencia, los estomas vuelven a abrirse parcialmente para transpirar y captar CO₂ (Griffiths, 1989). Durante este proceso, aumenta el contenido de ácidos orgánicos, lo cual, a su vez, provoca una disminución del pH (Nobel & Valenzuela, 1987).

El metabolismo ácido de las crasuláceas permite un balance hídrico al usar el agua eficientemente (WUE), debido a la captura nocturna de CO₂ durante periodos de menor evotranspiración (Borland et al., 2014), a su vez, el CAM está relacionado con la acumulación del principal carbohidrato soluble en agua (WSC), los fructanos (Escamilla-Treviño, 2011), polímero que constituye la principal reserva energética en los tejidos del agave, que al someterse a hidrólisis térmica se descomponen a mono y disacáridos fermentables, estos son metabolizados por acción de los microorganismos nativos durante la fermentación del mosto para producir bebidas alcohólicas (Colon-Gonzalez et al., 2025).

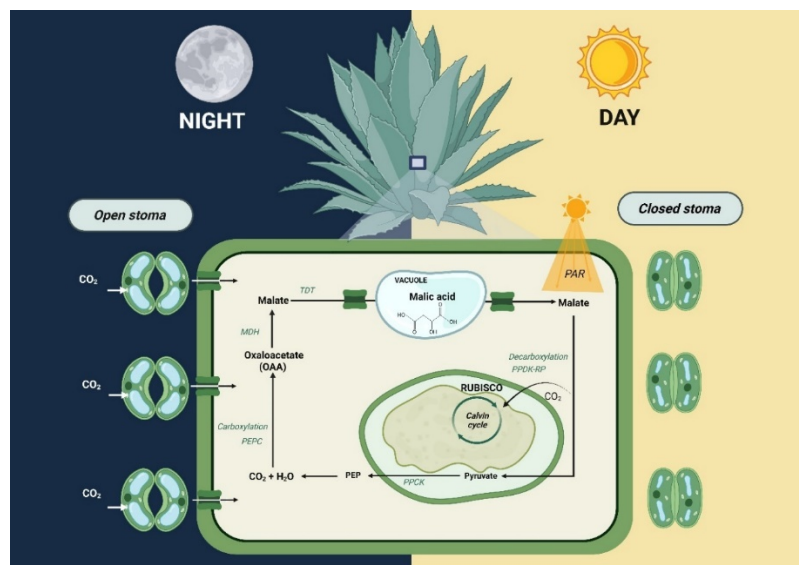


Figura 2. Ciclo del metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) en agave para la fijación y reutilización del CO₂. PPCK: fosfoenolpiruvato carboxilasa kinasa; TDT: transportador de dicarboxilato de tonoplasto; PPDK-RP: proteína reguladora del piruvato ortofosfato diquinasa. Adaptado de Yin et al. (2018).

2.2.3. Composición química

2.2.3.1. Azúcares fermentables en el mosto de agave

Antes de que los españoles introdujeran la caña de azúcar a México, los agaves constituían una fuente de azúcares y fibras para las poblaciones mesoamericanas (Ávila et al., 2012). Tradicionalmente, su uso más relevante ha sido como materia prima para la producción de bebidas alcohólicas, como el mezcal, el pulque, el tequila, la bacanora y la raicilla, entre otros.

Además, el agave es una fuente de productos con valor agregado, como jarabe de agave, fibras dietéticas y fructanos. Estos últimos favorecen el crecimiento de bacterias benéficas en el tracto digestivo, presentan efectos antioxidantes, facilitan la absorción de calcio y pueden contribuir a disminuir el riesgo de diversas enfermedades, como la obesidad, el sobrepeso y la diabetes (Espinosa-Andrews et al., 2021).

Los agaves almacenan carbohidratos solubles en agua, los fructanos, que constituyen su principal reserva energética. Durante la cocción del agave, estos

polisacáridos sufren hidrólisis térmica, lo que permite su separación en azúcares simples como fructosa y glucosa, que pueden ser metabolizados por los microorganismos durante la fermentación para producir etanol (Escamilla-Treviño, 2011).

Los fructanos del agave son carbohidratos de reserva formados por cadenas de fructosa con estructura ramificada, unidas mediante enlaces glucosídicos $\beta(2-1)$ y $\beta(2-6)$ (Verma et al., 2021). Los fructanos del agave también contienen carbohidratos estructurales: arabinosa, manosa y xilosa, que forman parte de la pared celular del tejido vegetal (Jiménez-Rodríguez et al., 2021). La cantidad y composición de los carbohidratos del agave dependen de la edad de la planta, los agaves jóvenes de 1-3 años contienen azúcares simples, fructosa y glucosa; los agaves de 4-6 años están compuestos mayoritariamente por fructanos (Marquez-Lopez et al., 2022). En la industria alimentaria, los fructanos se utilizan como edulcorantes, agentes espesantes, sustitutos de la sacarosa y para mejorar la textura de diversos alimentos (Radosavljevic et al., 2024).

El *Agave angustifolia* Haw. tiene un alto contenido de fructanos y sucrosa, mientras que el *A. potatorum* Zucc. contiene glucosa, fructosa y fructooligosacáridos (FOS); la cantidad puede variar dependiendo de la edad de la planta, zona de producción y condiciones climáticas que afectan el desarrollo de fructanos (Marquez-Lopez et al., 2022).

2.3. Fermentación espontánea del mezcal

2.3.1. Fermentación

El proceso de fermentación espontánea se lleva a cabo por la microbiota natural presente en el jugo de agave, que desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la actividad fermentativa (Aldrete-Tapia et al., 2020). Además, la formación de la comunidad microbiana se origina a partir de diversas fuentes que van desde la cosecha de las piñas y del entorno donde se lleva a cabo la fermentación; la vegetación del ambiente, el equipo de molienda, los recipientes utilizados para la colecta del jugo de agave y vectores biológicos: moscas

(Lachance, 1995), además de los remanentes de consorcios microbianos almacenados en las tinas de madera que no son lavadas. El tiempo de fermentación dura de 5 a 7 días, con una temperatura que varía en un rango de 26 a 28 °C, mientras que el pH se encuentra entre 4.3 y 4.8, parámetros que favorecen el crecimiento de los microorganismos (Espinoza-Martínez et al., 2023).

La comunidad microbiana involucrada en este tipo de fermentaciones está conformada por bacterias ácido lácticas, levaduras del género *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* (Maluleke et al., 2023). El perfil sensorial de la bebida se construye a partir de los metabolitos producidos por los microorganismos que integran el consorcio microbiano y generados durante el proceso fermentativo (Chen et al., 2026). Estos metabolitos se originan a partir del consumo y la transformación de azúcares fermentables, siendo convertidos a etanol y otros compuestos que contribuyen a las características aromáticas y sensoriales del mezcal (Aldrete-Tapia et al., 2020).

En el jugo de agave, las levaduras de la especie *Saccharomyces* producen compuestos como alcoholes, furanos y terpenos; por otro lado, las levaduras no-*Saccharomyces* producen alcoholes superiores, benzaldehído y acetoína, lo que contribuye a la complejidad del aroma y el sabor de la bebida (Díaz-Montaño, 2025).

El estudio de la comunidad microbiana permite comprender las funciones de los microorganismos en la fermentación espontánea. Esto se puede lograr mediante estudios de última generación que permitan caracterizar la diversidad y la estructura metabólica de los microorganismos durante la fermentación.

2.3.2. Diversidad microbiana en el mosto del mezcal

El mosto de agave es un ecosistema microbiano en el que interactúan diversos tipos de bacterias y levaduras (Kirchmayr et al., 2017); esta biodiversidad determina las características sensoriales del mezcal durante la fermentación del

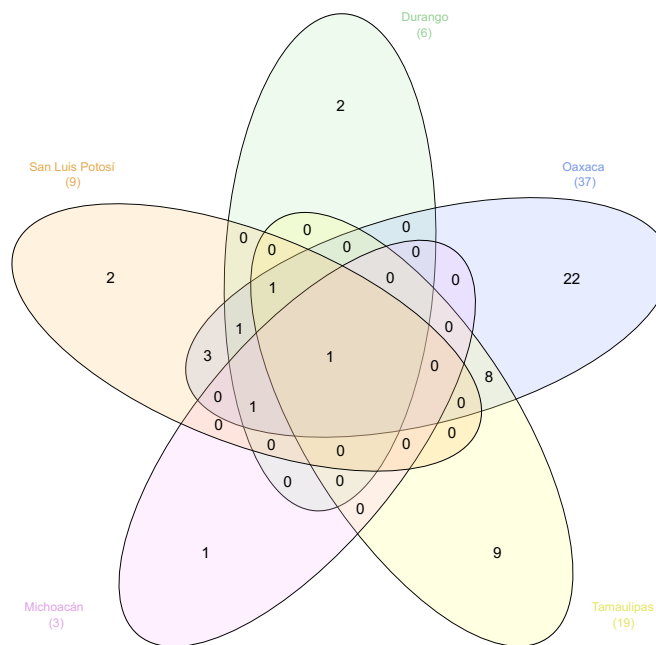
jugo de agave, que a su vez están influidas por la especie de agave, las prácticas tradicionales de producción y las condiciones climáticas (Torres-Velázquez et al., 2022).

Durante la fermentación espontánea, se ha reportado la presencia de bacterias ácido lácticas y ácido acéticas, así como de levaduras fermentativas y no fermentativas, que participan en la transformación de los azúcares fermentables, en la producción de etanol y en la síntesis de metabolitos secundarios. La **Figura 3** muestra que los diversos estudios realizados en las regiones productoras de mezcal en México han identificado géneros bacterianos como *Zymomonas*, *Lactobacillus*, *Weissella* (Escalante-Minakata et al., 2008), *Leuconostoc*, *Acetobacter* y *Gluconobacter* (Páez-Lerma et al., 2013), así como levaduras pertenecientes a los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Candida*, *Torulaspora* y *Hanseniaspora* (Kirchmayr et al., 2017), entre otros. La identificación de estos microorganismos se realiza principalmente mediante el análisis del gen 16S rRNA en bacterias (Rodicio & Mendoza, 2003), de las regiones ITS y D1/D2 en levaduras, y del gen 28S rRNA en hongos (Schoch et al., 2012).



Figura 3. Distribución de bacterias reportadas en mezcal de Durango, San Luis Potosí y Tamaulipas. Elaboración propia a partir de datos recopilados de

Respecto a las levaduras, la **Figura 4** indica que los estudios realizados en Oaxaca presentan la mayor cantidad de especies exclusivas. No obstante, *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae* se identificaron como especies comunes en todos los estados analizados. La variabilidad regional y la presencia de taxones específicos podrían deberse tanto a las condiciones locales de los distintos procesos de producción del mezcal como a las metodologías de clasificación taxonómica empleadas en cada estudio.



El **Cuadro 2** presenta una recopilación de los principales microorganismos (bacterias y levaduras) identificados en mostos de diferentes especies de agave, así como las técnicas de identificación y las regiones de estudio. La información

mostrada refleja la gran diversidad de microorganismos asociados a la fermentación de distintos mostos de agave. Estos datos contextualizan la diversidad microbiana asociada a la fermentación de distintos agaves.

Cuadro 2. Distribución de microorganismos bacterianos y levaduras identificados en el mosto de mezcal de distintas regiones de México.

Bacteria	Levadura	Agave	Técnica de identificación	Lugar de estudio	Referencia
<i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>Mobilis</i>	<i>Clavispora lusitaniae</i>	Maguey pulquero (<i>Agave salmiana</i>)	16S rDNA e ITS	San Luis Potosí	Escalante-Minakata et al. (2008)
<i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>Pomaceae</i>	<i>Pichia fermentans</i>				
<i>Weissella cibaria</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>				
<i>Weissella paramesenteroides</i>					
<i>Lactobacillus pontis</i>					
<i>Lactobacillus kefir</i>					
<i>Lactobacillus plantarum</i>					
<i>Pediococcus parvulus</i>		Agave espadín (<i>Agave angustifolia</i>), agave <i>A. lechugilla</i> y agave americana (<i>A. americana</i>)	Electroforesis en gel gradiente (DGGE) del gen 16S rRNA	San Carlos, Tamaulipas	Narvaez-Zapata et al. (2010)
<i>Lactibacillus brevis</i>					
<i>Lactobacillus composti</i>					
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>					
<i>Lactobacillus plantarum</i>					
<i>Weissella</i> sp.					
<i>Bacillus</i> sp.					
<i>Lactibacillus brevis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Maguey pulquero (<i>Agave salmiana</i>)	ITS-5.8S rRNA, región D1 gen 26S rRNA	San Luis Potosí	Verdugo Valdez et al. (2011)
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>				
<i>Lactobacillus ghanensis</i>	<i>Pichia kluyveri</i>				
<i>Lactobacillus harbinensis</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>				
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Clavispora lusitaniae</i>				
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>				
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Candida ethanolica</i>				
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Saccharomyces exiguous</i>				

Cuadro 3. Distribución de microorganismos bacterianos y levaduras identificados en el mosto de mezcal de distintas regiones de México (continuación).

Bacteria	Levadura	Agave	Técnica de identificación	Lugar de estudio	Referencia
	<i>Zigosaccharomyces bisporus</i>	Agave espadín (<i>Agave angustifolia</i>)	PCR del gen ARNr 5.8 (ITS 5.8) y de la región D1/D2 del gen ARNr 26S	Tamaulipas	Arrizon et al. (2012)
	<i>Torulaspora delbrueckii</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Candida apicola</i> <i>Candida zemplinina</i> <i>Candida boidinii</i> <i>Candida parapilopsis</i> <i>Pichia anomala</i> <i>Schizosaccharomyces pombe</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> <i>Cryptococcus albidus</i> <i>Hanseniaspora osmophila</i>				
<i>Leuconostoc</i> spp.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Agave cenizo (<i>Agave duranguensis</i>)	Región ITS1-5.8S-ITS2	Durango	Páez-Lerma et al. (2013)
<i>Oenococcus oeni</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>				
<i>Weisella</i> spp.	<i>Candida diversa</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i>				
<i>Acetobacter pasteurianus</i> <i>Acetobacter tropicalis</i> <i>Acetobacter senegalensis</i> <i>Gluconobacter</i> spp. <i>Komagataeibacter saccharivorans</i> <i>Zymomonas mobilis</i>	<i>Pichia fermentans</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i>				

Cuadro 4. Distribución de microorganismos bacterianos y levaduras identificados en el mosto de mezcal de distintas regiones de México (continuación).

Bacteria	Levadura	Agave	Técnica de identificación	Lugar de estudio	Referencia
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Agave papalote (<i>Agave cupreata</i>)		Michoacán	Pérez et al. (2013)
	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>drosophilarum</i> <i>Candida apicola</i>	Mosto agave	Región del gen D1/D2 de LSU 26S rRNA	Oaxaca	Kirchmayr et al. (2017)
	<i>Candida boidinii</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Candida rugosa</i> <i>Candida zemplinina</i> <i>Citeromyces matritensis</i> <i>Clavispora lusitaniae</i> <i>Cryptococcus albidus</i> <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> <i>Hanseniaspora osmophila</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>lactis</i> var. <i>drosophilarum</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Meyerozyma guilliermondii</i> <i>Pichia fermentans</i> <i>Pichia kluyveri</i> <i>Pichia kudriavzevii</i> <i>Pichia manshurica</i> <i>Pichia membranifaciens</i> <i>Pseudozyma prolifica</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Schizosaccharomyces pombe</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i> <i>Zygosaccharomyces bailii</i> <i>Pichia kudriavzevii</i>				
	<i>Pichia manshurica</i>	Agave espadín (<i>Agave angustifolia</i>)	Gen 26S rRNA dominio D1/D2 amplificado con PCR	Oaxaca	Nolasco-Cancino et al. (2018)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i>				

Cuadro 5. Distribución de microorganismos bacterianos y levaduras identificados en el mosto de mezcal de distintas regiones de México (continuación).

Bacteria	Levadura	Agave	Técnica de identificación	Lugar de estudio	Referencia
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Agave espadín (<i>Agave Angustifolia</i>) y agave tobalá (<i>Agave potatorum</i>)	PCR gen 5.8S, ITS1, ITS4	Oaxaca	Espinoza-Martinez et al. (2023)
	<i>Candida parapsilosis</i> <i>Meyerozyma guilliermondi</i> <i>Meyerozyma carabbica</i> <i>Meyerozyma carpophila</i> <i>Metarhizium flavoride</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i> <i>Clavispora lusitaniae</i> <i>Yarrowia lipolytica</i> <i>Pichia kluyveri</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Agave cenizo (<i>Agave duranguensis</i>)	PCR 26S amplificación de la región D1/D2 LSU	Durango	Martínez-Estrada et al. (2024)
	<i>K. marxianus</i> <i>Z. bailii</i> <i>P. manshurica</i> <i>T. delbrueckii</i> <i>P. kluyveri</i> <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> <i>C. lusitaniae</i>				
<i>Acetobacter</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Weissella</i> <i>Lactobacillus</i>		Agave papalote (<i>Agave cupreata</i>)	PCR del gen 16S ARNr	Guerrero	Kirchmayr et al. (2024)

2.4. Análisis ómicos de procesos fermentativos

2.4.1. Fundamentos de la metagenómica

La metagenómica es un campo interdisciplinario que abarca el ámbito experimental y la aplicación de métodos computacionales, como la bioinformática, con el objetivo de estudiar las comunidades microbianas a partir de muestras ambientales, sin necesidad de aislar ni cultivar previamente los microorganismos presentes (S. Liu et al., 2025).

El desarrollo de la metagenómica surgió de la necesidad de explorar microorganismos no cultivables, limitados por los protocolos de cultivo convencionales, que solo permiten estudiar una pequeña fracción de los microorganismos presentes en los ecosistemas (Kukkar et al., 2026). Esto se puede lograr mediante el análisis de la extracción de ADN total de una muestra para acceder a los genomas de los microorganismos presentes en una comunidad, lo que facilita la identificación de poblaciones microbianas desconocidas y amplía el conocimiento sobre la diversidad microbiana en distintos ecosistemas (Handelsman et al., 1998).

La aplicación de la metagenómica puede realizarse mediante dos enfoques, según los objetivos de la investigación: la secuenciación dirigida o basada en amplicones y la metagenómica shotgun (Nam et al., 2023). La secuenciación basada en amplicones consiste en la amplificación y secuenciación de regiones específicas del gen, llamadas marcadores filogenéticos (Halderman & Lane, 2017). Entre los marcadores más usados se encuentran el gen 16S rRNA para identificar bacterias y arqueas (Case et al., 2007; Kinoshita et al., 2021), el gen 18S rRNA para la clasificación taxonómica en algas y hongos (Banos et al., 2018) y el espaciador transcrito interno (ITS), dividido en ITS1 e ITS2, para la identificación fúngica a nivel de especie (Igwe et al., 2026). Estos análisis caracterizan la comunidad microbiana presente en una muestra, respondiendo a la pregunta de ¿quiénes están ahí?

Aunque, la secuenciación basada en amplicones proporciona muy poca información sobre las funciones de los microorganismos dentro del microbioma (Dwivedi et al., 2026). Esta limitación puede evitarse mediante la aplicación de la metagenómica shotgun, un enfoque capaz de realizar la clasificación taxonómica y elucidar las funciones y capacidades metabólicas de las comunidades microbianas (Sanschagrin & Yergeau, 2014).

En términos metodológicos, los estudios metagenómicos implican la recolección de la muestra ambiental, la extracción del ADN, la secuenciación masiva y el procesamiento de las lecturas mediante análisis bioinformáticos que permiten identificar los microorganismos (Zhang et al., 2021).

El estudio de las comunidades microbianas mediante el uso de la metagenómica puede aplicarse a diversos microbiomas, que van desde muestras humanas (tracto oral y gastrointestinal, piel), hasta ambientales (suelo, agua) y hasta cualquier tipo de alimento fermentado (Lemos & Moreno, 2026; Srinivas et al., 2022).

La importancia de realizar este tipo de investigaciones en alimentos fermentados tradicionales permite comprender la dinámica microbiana que transforma los sustratos en compuestos aromáticos y metabólicos que les confieren la particularidad a esos productos.

2.4.2. Metagenómica shotgun

La metagenómica shotgun, también conocida como secuenciación de escopeta, es un método que analiza el ADN total de una muestra ambiental. A diferencia de la secuenciación basada en amplicones, esta técnica no analiza un locus genómico del ADN (Sharpton, 2014), sino que examina todos los genes del ADN total de la muestra (Plaza et al., 2025).

A diferencia de la secuenciación basada en amplicones, la metagenómica shotgun permite la identificación de los microorganismos desde diferentes

dimensiones; arqueas, bacterias, hongos y virus, así como el análisis filogenético (Khurshid et al., 2026; Zhou et al., 2022).

El flujo de trabajo consta de la caracterización del ADN microbiano total mediante la secuenciación de nucleótidos para obtener millones de lecturas; seguidamente, son sometidas a un control de calidad para eliminar secuencias de baja calidad; estas pueden ensamblarse para obtener la clasificación taxonómica y la anotación funcional de la actividad metabólica de los microorganismos dentro del microbioma a partir de la predicción de los genes (Quince et al., 2017). La información obtenida de los genes presentes en la comunidad microbiana permite identificar el perfil funcional y predecir las vías metabólicas mediante la base de datos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Das & Tamang, 2023).

Una de las desventajas de realizar metagenómica shotgun en estudios es su alto costo (La Reau et al., 2023) y la complejidad del análisis bioinformático, que requiere recursos computacionales y experiencia (Kuzmichenko et al., 2025). Sin embargo, la metagenómica shotgun es una herramienta poderosa para estudiar la estructura y la función de las comunidades microbianas en sistemas fermentativos como el mezcal, en los que existe una relación entre la degradación de azúcares del agave mediada por microorganismos y la formación de compuestos volátiles de la bebida (Chacon-Vargas et al., 2020; De la Torre-González et al., 2020).

2.5. Literatura citada

- Aldrete-Tapia, J. A., Escalante-Minakata, P., Martinez-Peniche, R. A., Tamplin, M. L., & Hernandez-Iturriaga, M. (2020). Yeast and bacterial diversity, dynamics and fermentative kinetics during small-scale tequila spontaneous fermentation. *Food Microbiol*, 86, 103339. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103339>
- Arellano-Plaza, M., Paez-Lerma, J. B., Soto-Cruz, N. O., Kirchmayr, M. R., & Gschaedler Mathis, A. (2022). Mezcal Production in Mexico: Between Tradition and Commercial Exploitation. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.832532>

- Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A., & Monsan, P. (2012). Fructanase and fructosyltransferase activity of non-Saccharomyces yeasts isolated from fermenting musts of Mezcal. *Bioresource Technology*, 110, 560–565. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.112>
- Astudillo-Melgar, F., Hernández-Chávez, G., Rodríguez-Alegría, M. E., Ochoa-Leyva, A., López Munguía, A., & Escalante, A. (2025). Evaluating the temporal stability of the core microbiota in traditional Mexican pulque fermentation. *Food Bioscience*, 71. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.107306>
- Avila-Reyes, S. V., Jimenez-Aparicio, A. R., Melgar-Lalanne, G., Fajardo-Espinoza, F. S., & Hernandez-Sanchez, H. (2025). Mezcal: A Review of Chemistry, Processing, and Potential Health Benefits. *Foods*, 14(8). <https://doi.org/10.3390/foods14081408>
- Ávila, R. N., Rivas, B. P., Hernández, R. M., & Chirinos, M. (2012). Content of total, Reducing and Non-Reducing Sugars. *Multiciencias*, 12, 129–135.
- Banos, S., Lentendu, G., Kopf, A., Wubet, T., Glockner, F. O., & Reich, M. (2018). A comprehensive fungi-specific 18S rRNA gene sequence primer toolkit suited for diverse research issues and sequencing platforms. *BMC Microbiol*, 18(1), 190. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1331-4>
- Barraza, S. S., Domínguez, P. A. C., & A., E. (2014). La producción de mezcal en el municipio de Durango, Mexico. *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*, 10, 65–74.
- Bautista, J. A., & Ramírez, J. J. (2008). Agricultura y pluractividad de los pequeños productores de agave en la región del mezcal, Oaxaca, México. *Agricultura Técnica en México*, 34, 443–451.
- Borland, A. M., Hartwell, J., Weston, D. J., Schlauch, K. A., Tschaplinski, T. J., Tuskan, G. A., Yang, X., & Cushman, J. C. (2014). Engineering crassulacean acid metabolism to improve water-use efficiency. *Trends Plant Sci*, 19(5), 327–338. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.01.006>
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmstrom, C., Doolittle, W. F., & Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol*, 73(1), 278–288. <https://doi.org/10.1128/AEM.01177-06>
- Castañeda-Ovando, A., Moreno-Vilet, L., Jaimez-Ordaz, J., Ramírez-Godínez, J., Pérez-Escalante, E., Cruz-Guerrero, A. E., Contreras-López, E., Alatorre-Santamaría, S. A., Guzmán-Rodríguez, F. J., & González-Olivares, L. G. (2023). Aguamiel syrup as a technological diversification product: Composition, bioactivity and present panorama. *Future Foods*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2023.100249>
- Chacon-Vargas, K., Torres, J., Giles-Gomez, M., Escalante, A., & Gibbons, J. G. (2020). Genomic profiling of bacterial and fungal communities and their predictive functionality during pulque fermentation by whole-genome shotgun sequencing. *Sci Rep*, 10(1), 15115. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71864-4>
- Chen, G., Huang, Q., Ding, S., Cheng, Y., Lu, M., Zhou, X., Huang, J., Huang, Y., Guan, J., Cao, M., & Li, W. (2026). Microbial community dynamics in spontaneous fermentation of *Vitis quinquangularis* Rehd. Wine across

- Southwest China: Correlations with volatile compounds. *Food Research International*, 227. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.118233>
- Colon-Gonzalez, M., Aguirre-Dugua, X., Guerrero-Osornio, M. G., Avelar-Rivas, J. A., DeLuna, A., Mancera, E., & Morales, L. (2025). Thriving in Adversity: Yeasts in the Agave Fermentation Environment. *Yeast*, 42(1-3), 16–30. <https://doi.org/10.1002/yea.3989>
- Colunga, P. M. G., Zizumbo, D. V., & Martínez, J. T. (2007). *Tradiciones en el aprovechamiento de los agaves mexicanos: una aportación a la protección legal y conservación de su diversidad biológica y cultural*.
- COMERCAM. (2025). *Informe estadístico 2025*. https://comercam-dom.org.mx/wp-content/uploads/2025/06/INFORME_PUBLICO2025.pdf
- Cruz, C. L. V., López, M. D. M., Valencia, R. E., & Palma, J. C. (2022). Cambios en las propiedades fisicoquímicas del mezcal de Oaxaca, producidos por la destilación en cobre y acero inoxidable. *Revista del Centro de Graduados e Investigación en cobre y acero inoxidable*, 37, 14–20.
- Das, S., & Tamang, J. P. (2023). Metagenomics and metabolomics of Toddy, an Indian fermented date palm beverage. *Food Res Int*, 172, 113205. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113205>
- De la Torre-González, F. J., Narváez-Zapata, J. A., Taillandier, P., & Larralde-Corona, C. P. (2020). Mezcal as a Novel Source of Mixed Yeasts Inocula for Wine Fermentation. *Processes*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/pr8101296>
- Díaz-Montaño, D. M. (2025). Influence of selected native yeast strains on fermentation behavior and chemical profile in Agave tequilana (blue Weber agave) juice fermentation for tequila production. *Food Bioscience*, 63. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105552>
- Dwivedi, J., Shukla, M. M., Upadhyay, A., Wal, A., Sharma, K. K., & Gasmi, A. (2026). From 16S rRNA to deep learning: Evolution of computational approaches in human microbiome studies. *Comput Biol Chem*, 121, 108852. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2025.108852>
- Escalante-Minakata, P., Blaschek, H. P., Barba de la Rosa, A. P., Santos, L., & De Leon-Rodriguez, A. (2008). Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of Agave salmiana. *Lett Appl Microbiol*, 46(6), 626–630. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02359.x>
- Escamilla-Treviño, L. L. (2011). Potential of Plants from the Genus Agave as Bioenergy Crops. *BioEnergy Research*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s12155-011-9159-x>
- Espinosa-Andrews, H., Urías-Silvas, J. E., & Morales-Hernández, N. (2021). The role of agave fructans in health and food applications: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 114, 585–598. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.022>
- Espinoza-Martinez, V. A., Alvarez-Gutierrez, P. E., Palma-Cruz, F. d. J., Enriquez-Valencia, R., Ramirez-Lopez, M. P., Lopez-Sanchez, C., & Vazquez-Lopez, H. G. (2023). Influence of the Biotechnological Process of Mezcal Fermentation on Yeast Diversity in Four palenques of Oaxaca, Mexico. *Beverages*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/beverages9040099>

- García, A. J. M. (2007). Los agaves de México. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*.
- García Mendoza, A. J., Franco Martínez, I. S., & Sandoval Gutiérrez, D. (2019). Cuatro especies nuevas de Agave (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México. *Acta Botanica Mexicana*(126). <https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1461>
- Griffiths, H. (1989). Crassulacean Acid Metabolism: a Re-appraisal of Physiological Plasticity in Form and Function. In *Advances in Botanical Research Volume 15* (pp. 43–92). [https://doi.org/10.1016/s0065-2296\(08\)60044-0](https://doi.org/10.1016/s0065-2296(08)60044-0)
- Gutiérrez-Coronado, M. L., Acedo-Félix, E., & Valenzuela-Quintanar, A. I. (2007). Industria Del Bacanora Y Su Proceso De Elaboración Bacanora Industry and Its Process of Production. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(5), 394–404. <https://doi.org/10.1080/11358120709487718>
- Halderman, A. A., & Lane, A. P. (2017). Organism and Microbiome Analysis: Techniques and Implications for Chronic Rhinosinusitis. *Otolaryngol Clin North Am*, 50(3), 521–532. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2017.01.004>
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry and Biology*, 5, R245–R249. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90108-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90108-9)
- Igwe, D. O., Iheahalu, O. C., Graves, J., Sam, R., Quinteros, F., Esimai, C. C., & Ude, G. N. (2026). Start codon targeted and internal transcribed spacer markers: Effective tools for assessment of genetic diversity, population study and DNA barcoding of wild and edible mushroom collections. *The Microbe*, 10. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2025.100642>
- IMPI. (1994). *Denominacion de Origen Mezcal Oax, Gro, SLP, Zac, Dgo*. Retrieved from <https://comercam-dom.org.mx/wp-content/uploads/2022/04/DOF-1994.11.28-Denominacion-de-Origen-Mezcal-Oax-Gro-SLP-Zac-Dgo.pdf>
- IMPI. (2015). *Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial*. Retrieved from <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/695078/5.Mezcal.02.10.2015.pdf>
- Jiménez-Rodríguez, A., Heredia-Olea, E., Barba-Dávila, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Antunes-Ricardo, M. (2021). Polysaccharides from Agave salmiana bagasse improves the storage stability and the cellular uptake of indomethacin nanoemulsions. *Food and Bioprocess Processing*, 127, 114–127. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2021.02.008>
- Khurshid, A. W., Muzamil, S. B., Elboughdiri, N., Kriaa, K., Maatki, C., Hadrich, B., Singh, J., & Singh, R. (2026). Food metagenomics integrated with multi-Omics and AI: Functional insights, microbiome engineering and predictive bioprocessing for sustainable food preservation. *Trends in Food Science & Technology*, 169. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2026.105566>
- Kinoshita, Y., Niwa, H., Uchida-Fujii, E., & Nukada, T. (2021). Establishment and assessment of an amplicon sequencing method targeting the 16S-ITS-23S

- rRNA operon for analysis of the equine gut microbiome. *Sci Rep*, 11(1), 11884. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91425-7>
- Kirchmayr, M. R., Segura-García, L. E., Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., de la Rosa, M., & Gschaedler Mathis, A. (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. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.052>
- Kirchmayr, M. R., Vital-López, L., Arellano-Plaza, M., Gschaedler, A. C., Larralde-Corona, C. P., & Narváez-Zapata, J. A. (2024). Bacterial community inferred by metagenomic analysis in an artisanal mezcal distillery in Guerrero, Mexico. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 58. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103159>
- Kukkar, D., Chopra, C., Kim, K.-H., & Rajesh, P. (2026). Progress in bioinformatics tools for analysis of metagenomically isolated microbiome: Current status and future prospects. *Gene Reports*, 43. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2026.102437>
- Kuzmichenko, P., Fedorov, D., Galeeva, J., Postoeva, A., Krieger, E., Kudryavtsev, A., Pavlenko, A., Vvedensky, A., Starikova, E., Govorun, V., & Ilina, E. (2025). Comparing alignment and de-novo approaches for gut microbiota metagenomic data analysis reveals differences in taxonomic resolution and novel functional insights. *Sci Rep*, 15(1), 42423. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-26617-6>
- La Reau, A. J., Strom, N. B., Filvaroff, E., Mavrommatis, K., Ward, T. L., & Knights, D. (2023). Shallow shotgun sequencing reduces technical variation in microbiome analysis. *Sci Rep*, 13(1), 7668. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33489-1>
- Lachance, M. A. (1995). Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 68, 151–160.
- Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizon-Gavino, J., Herrera-Suarez, T., Garcia-Mendoza, A., & Gschaedler-Mathis, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Res*, 8(7), 1037–1052. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00430.x>
- Liu, S., Rodriguez, J. S., Munteanu, V., Ronkowski, C., Sharma, N. K., Alser, M., Andreace, F., Blekhman, R., Blaszczyk, D., Chikhi, R., Crandall, K. A., Della Libera, K., Francis, D., Frolova, A., Gancz, A. S., Huntley, N. E., Jaiswal, P., Kosciolk, T., Labaj, P. P.,...Mangul, S. (2025). Analysis of metagenomic data. *Nat Rev Methods Primers*, 5. <https://doi.org/10.1038/s43586-024-00376-6>
- Maluleke, E., Lekganyane, M. A., & Moganedi, K. L. M. (2023). Microbial Diversity of Marula Wine during Spontaneous Fermentation. *Fermentation*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/fermentation9100862>
- Marquez-Lopez, R. E., Santiago-Garcia, P. A., & Lopez, M. G. (2022). Agave Fructans in Oaxaca's Emblematic Specimens: Agave angustifolia Haw. and Agave potatorum Zucc. *Plants (Basel)*, 11(14). <https://doi.org/10.3390/plants11141834>

- Martínez-Estrada, S. C., Narváez-Zapata, J. A., Rodríguez-Herrera, R., Grijalva-Ávila, J., Gurrola-Reyes, J. N., Larralde-Corona, C. P., & Chairez-Hernández, I. (2024). Diversity of Culturable Yeasts Associated with the Technification Level in the Process of Mezcal Production in the State of Durango. *Fermentation*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/fermentation10030147>
- Méndez-Ortiz, O. H., Martínez-Morales, T. K., & González-Rios, L. L. (2017). Bioethanol production from Agave lechuguilla biomass pretreated by autohydrolysis. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16(2), 467–476.
- Michel-Cuello, C., Aguilar-Rivera, N., LÓPez-Palacios, C., & CÁRdenas-González, J. F. (2021). Fermentable carbohydrate metabolism in maguey mezcalero potosino (Agave salmiana): HPLC characterization and evaluation. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 49(1). <https://doi.org/10.15835/nbha49112154>
- Moreno, W. J. F. J. L. M. V. A. (2026). Micro- and nanoplastics, metagenomics, and food systems: toward an integrated perspective. *Current Opinion in Food Science*, 68. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cofs.2026.101379>
- Nam, N. N., Do, H. D. K., Loan Trinh, K. T., & Lee, N. Y. (2023). Metagenomics: An Effective Approach for Exploring Microbial Diversity and Functions. *Foods*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/foods12112140>
- Narvaez-Zapata, J. A., Rojas-Herrera, R. A., Rodriguez-Luna, I. C., & Larralde-Corona, C. P. (2010). Culture-independent analysis of lactic acid bacteria diversity associated with mezcal fermentation. *Curr Microbiol*, 61(5), 444–450. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9636-z>
- Nobel, P. S., & Valenzuela, A. G. (1987). Environmental responses and productivity of the CAM plant, Agave tequilana. *Agricultural and Forest Meteorology* 39(4), 319–334. [https://doi.org/10.1016/0168-1923\(87\)90024-4](https://doi.org/10.1016/0168-1923(87)90024-4)
- Nolasco-Cancino, H., Santiago-Urbina, J. A., Wachter, C., & Ruiz-Teran, F. (2018). Predominant Yeasts During Artisanal Mezcal Fermentation and Their Capacity to Ferment Maguey Juice. *Front Microbiol*, 9, 2900. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02900>
- Nolasco, H. C., Martínez, D. J., Terán, F. R., & Urbina, J. A. S. (2022). Behavior of the volatile compounds regulated by the Mexican Official Standard NOM-070-2016 during the distillation of artisanal Mezcal. *Biotechnia*, 24, 20–27.
- Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016, B. a. M. E. (2016). *Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones*. Norma Oficial Mexicana, Diario Oficial de la Federación. https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/6437/seeco11_C/seeco11_C.html
- Orlov, N. M., Viktorova, V. A., & Eskov, A. K. (2022). CAM (Crassulacean Acid Metabolism) Photosynthesis in Vascular Epiphytes. *Biology Bulletin Reviews*, 12(5), 527–543. <https://doi.org/10.1134/s2079086422050073>

- Osmond, C. B. (1978). Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. *Annual Review of Plant Physiology*, 29, 379–414. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.29.060178.002115>
- Páez-Lerma, J. B., Arias-García, A., Rutiaga-Quiñones, O. M., Barrio, E., & Soto-Cruz, N. O. (2013). Yeasts Isolated from the Alcoholic Fermentation of Agave duranguensis During Mezcal Production. *Food Biotechnology*, 27(4), 342–356. <https://doi.org/10.1080/08905436.2013.840788>
- Paszkot, J., Gasinski, A., & Kawa-Rygielska, J. (2023). Evaluation of volatile compound profiles and sensory properties of dark and pale beers fermented by different strains of brewing yeast. *Sci Rep*, 13(1), 6725. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33246-4>
- Pérez, E., Hernández, J. C. G., Parga, M. C. C., & Penagos, C. C. (2013). Caracterización fermentativa de levaduras productoras de etanol a partir de jugo de Agave cupreata en la elaboración de mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12, 451–461.
- Plaza, F. O., Quinquis, B., Thirion, F., Gilles, M., Morabito, C., Valeille, K., Martin, R., Guidet, B., Kern, C., & Pécastaings, S. (2025). Assessment of protocols for characterization of the human skin microbiome using shotgun metagenomics and comparative analysis with 16S metabarcoding. *Microbiol Spectrum*, 13(12). <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/spectrum.01732-25>
- Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat Biotechnol*, 35(9), 833–844. <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>
- Radosavljevic, M., Belovic, M., Cvetanovic Kljakic, A., & Torbica, A. (2024). Production, modification and degradation of fructans and fructooligosaccharides by enzymes originated from plants. *Int J Biol Macromol*, 269(Pt 1), 131668. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131668>
- Rieger, I. A. (2025). “Rewilding” the Mezcal Market: Cultural Practices and the Conservation of Agaves in Oaxaca, Mexico. *Wild*, 2(2). <https://doi.org/10.3390/wild2020020>
- Rios-Gonzalez, L. J., Medina-Morales, M. A., Rodriguez-De la Garza, J. A., Romero-Galarza, A., Medina, D. D., & Morales-Martinez, T. K. (2021). Comparison of dilute acid pretreatment of agave assisted by microwave versus ultrasound to enhance enzymatic hydrolysis. *Bioresour Technol*, 319, 124099. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124099>
- Ruiz-Camou, C., Núñez, J., & Musule, R. (2023). Evaluating the environmental performance of mezcal production in Michoacán, México: A life cycle assessment approach. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 28(12), 1658–1671. <https://doi.org/10.1007/s11367-023-02237-y>
- Sanschagrin, S., & Yergeau, E. (2014). Next-generation sequencing of 16S ribosomal RNA gene amplicons. *J Vis Exp*(90). <https://doi.org/10.3791/51709>
- Sharpton, T. J. (2014). An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Front Plant Sci*, 5, 209. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00209>

- Srinivas, M., O'Sullivan, O., Cotter, P. D., Sinderen, D. V., & Kenny, J. G. (2022). The Application of Metagenomics to Study Microbial Communities and Develop Desirable Traits in Fermented Foods. *Foods*, 11(20). <https://doi.org/10.3390/foods11203297>
- Stanzer, D., Hanousek Cica, K., Blesic, M., Smajic Murtic, M., Mrvcic, J., & Spaho, N. (2023). Alcoholic Fermentation as a Source of Congeners in Fruit Spirits. *Foods*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/foods12101951>
- Stewart, J. R. (2015). Agave as a model CAM crop system for a warming and drying world. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00684>
- Torres-Velázquez, D. S., Rojas-Contreras, J. A., Soto-Cruz, N. Ó., Utriz Estrada, N., López Miranda, J., Kirchmayr, M., & Páez-Lerma, J. B. (2022). Bacterial population monitoring during alcoholic fermentation of mezcal in Durango by DGGE. *International Journal of Agriculture and Natural Resources*, 49(2). <https://doi.org/10.7764/ijanr.v49i2.2367>
- Tortorelli, C. E. (2010). Indicaciones geográficas y denominaciones de origen propiedad intelectual en progreso. *Revista Chilena de Derecho*, 32, 207–239.
- Vera, A. M. G., Santiago, P. A. G., & López, M. G. (2009). Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de mezcal de Agave angustifolia y Agave potatorum. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 32, 273–279.
- Verdugo Valdez, A., Segura Garcia, L., Kirchmayr, M., Ramirez Rodriguez, P., Gonzalez Esquinca, A., Coria, R., & Gschaedler Mathis, A. (2011). Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from Agave salmiana. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100(4), 497–506. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9605-y>
- Verma, D. K., Patel, A. R., Thakur, M., Singh, S., Tripathy, S., Srivastav, P. P., Chávez-González, M. L., Gupta, A. K., & Aguilar, C. N. (2021). A review of the composition and toxicology of fructans, and their applications in foods and health. *Journal of Food Composition and Analysis*, 99. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103884>
- Yin, H., Guo, H. B., Weston, D. J., Borland, A. M., Ranjan, P., Abraham, P. E., Jawdy, S. S., Wachira, J., Tuskan, G. A., Tschaplinski, T. J., Wulfschleger, S. D., Guo, H., Hettich, R. L., Gross, S. M., Wang, Z., Visel, A., & Yang, X. (2018). Diel rewiring and positive selection of ancient plant proteins enabled evolution of CAM photosynthesis in Agave. *BMC Genomics*, 19(1), 588. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4964-7>
- Zhang, L., Chen, F., Zeng, Z., Xu, M., Sun, F., Yang, L., Bi, X., Lin, Y., Gao, Y., Hao, H., Yi, W., Li, M., & Xie, Y. (2021). Advances in Metagenomics and Its Application in Environmental Microorganisms. *Front Microbiol*, 12, 766364. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.766364>
- Zhou, Y., Liu, M., & Yang, J. (2022). Recovering metagenome-assembled genomes from shotgun metagenomic sequencing data: Methods, applications, challenges, and opportunities. *Microbiol Res*, 260, 127023. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127023>

3. ANÁLISIS METAGENÓMICO DEL MOSTO DEL MEZCAL

3.1. Resumen

El análisis metagenómico shotgun de las muestras de mosto fermentado de *Agave angustifolia* permitió caracterizar la estructura, la diversidad y la sucesión microbiana a lo largo del proceso fermentativo. Los resultados evidenciaron cambios en las abundancias relativas de los taxones a lo largo de la fermentación, es decir, una sucesión microbiana. El análisis NMDS con la distancia de Bray-Curtis reveló la disimilitud entre las comunidades bacterianas a lo largo de los días. Las especies más abundantes fueron *Lentilactobacillus hilgardii*, *Lactiplantibacillus plantarum* y *Levilactobacillus brevis*, lo que sugiere un papel clave en la dinámica fermentativa y en la generación de compuestos asociados al perfil sensorial del mezcal. En cuanto a las levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* presentó la mayor abundancia relativa, con escasa contribución de *Torulaspora delbrueckii* y *Zygosaccharomyces rouxii*. La comprensión de esta ecología microbiana sienta las bases para el desarrollo de herramientas biotecnológicas orientadas a la optimización y control del proceso fermentativo.

Palabras clave: Dinámica microbiana, bacterias ácido lácticas, levaduras.

Tesis de Maestría en Ciencia, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Jazmín Hernández Hernández

Director de tesis: Dr. Teodoro Espinosa Solares

METAGENOMIC ANALYSIS OF MEZCAL MUST

Abstract

Shotgun metagenomic analysis of fermented *Agave angustifolia* must samples enabled characterization of the structure, diversity, and changes in microbial composition during fermentation. The results revealed changes in the relative abundances of taxa throughout fermentation, that is, microbial succession. NMDS analysis using the Bray-Curtis distance revealed dissimilarity among bacterial communities over the course of the days. The most abundant species were *Lentilactobacillus hilgardii*, *Lactiplantibacillus plantarum*, and *Levilactobacillus brevis*, suggesting a key role in fermentation dynamics and in the generation of compounds associated with mezcal's sensory profile. *Saccharomyces cerevisiae* presented the highest relative abundance among the samples; *Torulaspora delbrueckii* and *Zygosaccharomyces rouxii* had a lower contribution. Understanding the microbial ecology of *Agave angustifolia* must, and how it drives the fermentation of the must marks the beginning of progress in technological development in the field of molecular biology.

Keywords: Microbial dynamics, lactic acid bacteria, yeasts.

Master's Thesis in Science. Program of Agro-Food Science and Technology,
Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Jazmín Hernández Hernández

Advisor: Dr. Teodoro Espinosa Solares

3.2. Introducción

La fermentación del mosto de agave es la etapa clave en la producción de mezcal artesanal, ya que durante este proceso se generan metabolitos que influyen en el desarrollo del perfil sensorial de la bebida (López-Sánchez et al., 2026). Esta etapa ocurre principalmente mediante fermentación espontánea, la cual es conducida por un consorcio microbiano nativo, cuya composición y dinámica están influidas por el sustrato, los factores ambientales y las prácticas tradicionales de producción empleadas en cada región mezcalera (Jara-Servin et al., 2025). Durante la fermentación, los diferentes grupos microbianos que transforman los azúcares fermentables en etanol pertenecen a bacterias ácido lácticas, ácido acéticas y levaduras del género *Saccharomyces* y no *Saccharomyces* (Narvaez-Zapata et al., 2010; Nuñez-Guerrero et al., 2016).

La diversidad microbiana asociada a la fermentación del mosto de agave presenta variaciones entre las distintas regiones productoras de mezcal. Los estudios realizados en estados como Durango (Páez-Lerma et al., 2013), Guerrero (Kirchmayr et al., 2024), Michoacán (Pérez et al., 2013), Oaxaca (Kirchmayr et al., 2017), San Luis Potosí (Escalante-Minakata et al., 2008) y Tamaulipas (Narvaez-Zapata et al., 2010) han reportado diferencias en la composición de bacterias y levaduras presentes durante la actividad fermentativa. No obstante, Oaxaca es el estado con el mayor número de microorganismos reportados en la microbiota del mezcal; además, tiene gran relevancia en la producción nacional de mezcal.

A pesar de toda la información disponible, aún persiste una brecha en el conocimiento sobre la dinámica microbiana y su relación con los compuestos aromáticos del mezcal. En este contexto, el uso de la metagenómica shotgun es una herramienta que permite caracterizar las comunidades microbianas sin recurrir a cultivos dependientes, a fin de conocer la diversidad taxonómica y el potencial funcional de los microorganismos presentes. A causa de esto, este capítulo presenta la metodología y los análisis empleados para la identificación y

caracterización de la comunidad microbiana presente durante la fermentación del mosto de *Agave angustifolia* en Oaxaca, mediante el enfoque de metagenómica shotgun, con base en los días de actividad fermentativa y en la evaluación de los parámetros fisicoquímicos asociados al consumo de azúcares reductores, sólidos solubles (°Brix), producción de etanol y temperatura (°C). Adicionalmente, la identificación de metabolitos presentes en el jugo de agave, con el fin de analizar su relación con la composición microbiana durante la fermentación y con los compuestos del mosto de agave. Debido a que la comprensión de la comunidad microbiana responsable de la fermentación espontánea aporta información valiosa sobre las interacciones entre los microorganismos que contribuyen a la formación del perfil sensorial de esta bebida, lo cual fortalece el conocimiento biotecnológico de los productos fermentados tradicionales.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Proceso de producción de mezcal a partir de *Agave angustifolia*

El *Agave angustifolia* utilizado en este estudio provino de la comunidad de Unión Juárez, Oaxaca, México (16°43'12" N, 95°59'38" O). La ~~¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.~~ presenta el proceso de producción de mezcal seguido en este estudio. El proceso inició con la cosecha de la materia prima, seguido del jimado del agave para obtener únicamente la piña. Posteriormente, las piñas se sometieron a cocción en un horno de tipo bóveda. Luego, la extracción de las fibras y del jugo mediante la molienda en una hebradora y una tahona. La fermentación en tinas de madera y, por último, la destilación. La descripción detallada de cada una de estas etapas se presenta en el siguiente capítulo.



1 Cosecha

Normalmente a los 6 años.



2 Cocción

En horno de bóveda para hidrólisis.



3 Molienda

Dos etapas: hebradora y tahona.



4 Fermentación

En cubas de madera con fermentación espontánea.



5 Destilación

En alambique de cobre.

Figura 5. Proceso de producción de mezcal a partir de *Agave angustifolia* en el palenque artesanal Mezcal Único, en Tlaculola de Matamoros, Oaxaca.

3.3.2. Recolección de muestras de jugo de agave

Las muestras para el estudio fueron recolectadas en el Palenque Mezcal Único, ubicado en Tlacolula de Matamoros, Oaxaca, México (16°57'15"N, 96°28'45"O), a partir de un lote de 12 990 kg de agave espadín (*Agave angustifolia*). Las muestras de las cinco tinajas (V1, V2, V3, V4 y V5) de madera con mosto fermentado espontáneamente durante los días 1 (D1), 2 (D2), 3 (D3) y 4 (D4) se colectaron en tubos estériles de 15 mL previamente etiquetados y fueron almacenadas y transportadas a 2 °C al Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Autónoma Chapingo, donde permanecieron hasta su procesamiento.

3.3.3. Cuantificación de sólidos solubles

Los sólidos solubles totales (°Brix) del jugo de agave se determinaron con un refractómetro digital (HANNA® Instruments, HI96801, EUA). Los resultados obtenidos se expresaron en °Brix.

3.3.4. Determinación de azúcares reductores totales en agave crudo y cocido

Se realizó un muestreo aleatorio de 25 trozos de agave crudo conformados por penca y corazón. Después de someter las piñas crudas a cocción, se tomaron aleatoriamente 40 pedazos de corazón y 50 de penca. Los azúcares reductores totales (% ART) se determinaron mediante el método de Lane-Eynon, utilizando los reactivos comerciales Fehling A y B, según el protocolo descrito en el Manual del Laboratorio de Calidad del Palenque Artesanal Mezcal Único. Para ello, se tomaron 30 g de penca y 20 g de corazón, en una proporción 60:40 (penca: corazón), obteniendo un total de 50 g de muestra, que se licuó con 1 500 mL de agua purificada. Después, se filtraron y se colectaron 50 mL para someterlos a hidrólisis con 5 mL de ácido clorhídrico (HCl) al 50 % en baño María a 68-70 °C durante 5 minutos. La muestra fue neutralizada con 5 mL de hidróxido de sodio (NaOH); se añadieron 2 gotas de fenolftaleína como indicador y se aforó a 200 mL con agua destilada.

La titulación se realizó mezclando 5 mL del reactivo Fehling A y 5 mL de Fehling B con 35 mL de agua destilada, se llevó a ebullición en un termo agitador (Thermo Fisher Scientific, 50800, USA) y se tituló la muestra previamente hidrolizada hasta el viraje con 3 gotas de azul de metileno como indicador. Se registró el volumen gastado. El procedimiento se realizó por triplicado. La **Ecuación 1** se empleó para determinar el porcentaje de azúcares reductores.

$$ART = \frac{0.0512 \text{ g azúcar}}{\text{mL gastados}} * \frac{\text{Mezcla agave con agua g}}{100 \text{ g agave}} * \frac{200 \text{ mL solución}}{50 \text{ g muestra agave curdo}} * 100 [=] \% \quad (1)$$

Se aplicó el mismo procedimiento para determinar los azúcares reductores totales (% ART) en el agave cocido.

3.3.5. Determinación de azúcares reductores totales en jugo de agave

Para la determinación del jugo de agave en tahona y en las tinas de fermentación, se estableció una relación entre el contenido de sólidos solubles (°Brix) del jugo y la cantidad en mL de muestra a utilizar para determinar el porcentaje de azúcares reductores totales (ver Anexo 1), siguiendo la misma metodología empleada para la determinación de azúcares reductores en agave crudo.

3.3.6. Azúcares reductores directos en agave cocido

El análisis de azúcares reductores directos (% ARD) se realizó utilizando la mezcla filtrada obtenida de la molienda de penca y corazón de agave cocido, en proporción 60:40, con 1500 mL de agua purificada. Del filtrado se tomaron 50 mL y se aforaron a 200 mL con agua destilada en un matraz volumétrico y se procedió a realizar la titulación siguiendo el protocolo analítico establecido para esta etapa. La **Ecuación 2** se empleó para determinar el porcentaje de azúcares reductores directos.

$$ARD = \frac{0.0512 \text{ g azúcar}}{\text{mL gastados}} * \frac{\text{Mezcla agave con agua g}}{100 \text{ g agave}} * \frac{200 \text{ mL solución}}{50 \text{ g muestra agave curdo}} * 100 [=] \% \quad (2)$$

El porcentaje de hidrólisis de las piñas de agave cocidas se determinó mediante la **Ecuación 3**.

$$\text{Hidrólisis} = \frac{\text{Azúcares directos}}{\text{Azúcares reductores totales}} * 100 [=] \% \quad (3)$$

3.3.7. Riqueza alcohólica

Jugo de agave

A partir de 100 ml de jugo de agave proveniente de la tahona y, posteriormente, de las tinas de fermentación, previamente filtrado, se sometió a destilación en un microdestilador de alcohol (TECNAL, T2-012-250, Brasil) con recirculación de agua fría para la condensación del alcohol presente. La determinación de la riqueza alcohólica se realizó con un densímetro digital (Anton Paar, DMATM 1001, Austria). Se determinó el pH de cada muestra con un potenciómetro (HANNA, HI5522-01, USA).

Bagazo

La determinación de la riqueza alcohólica del bagazo de agave se realizó a partir de 500 g de muestra. A partir de esa cantidad se usaron 62.5 g, mezclados con 500 mL de agua filtrada, y se colectaron 100 mL para someterlos a destilación siguiendo el mismo procedimiento para determinar la riqueza alcohólica.

Se aplicó el mismo procedimiento al bagazo agotado de cada alambique.

Vinaza y flemaza

De cada alambique se colectaron 500 mL del residuo sobrante de la destilación y se siguieron los mismos pasos previos para medir la riqueza alcohólica.

3.3.8. Extracción de ADN

Para obtener el ADN del pellet del mosto correspondiente a los días de fermentación, se utilizó el kit PowerSoil® DNA Isolation, con algunos ajustes al protocolo del fabricante. Se recolectaron 0.5 g de sólido de cada muestra en un tubo PowerBead y se sometieron a agitación en vórtex durante 10 minutos.

Se añadieron 60 μL de la solución C1 y se agitó nuevamente en el vortex durante 1 minuto. Seguidamente, las muestras se centrifugaron durante 2 minutos a $15\,000 \times g$. El sobrenadante se transfirió a un tubo Collection de 2 mL, se añadieron 250 μL de la solución C2 para favorecer la lisis celular y se agitó en vortex durante 10 segundos. Posteriormente, se centrifugó durante 1 minuto a $15\,000 \times g$ a 16°C .

Del sobrenadante resultante, se tomaron solo 600 μL , que se mezclaron con 400 μL de la solución C3 para precipitar compuestos orgánicos e inorgánicos no pertenecientes al ADN. La mezcla se agitó en vortex durante 10 segundos y se centrifugó durante 1 minuto. De este sobrenadante se tomaron 750 μL , se añadieron 1 000 μL de la solución C4, que retiene el ADN en la membrana, y se agitó en vortex durante 10 segundos.

Luego, se transfirieron 600 μL del sobrenadante al Spin Filter y se centrifugó durante 1 minuto a $15\,000 \times g$. El eluyente se descartó y se repitió el proceso añadiendo nuevamente 600 μL hasta procesar la totalidad del volumen previamente mezclado con la solución C4. Después, se cambió el tubo colector del Spin Filter y se añadieron 500 μL de la solución C5 (solución de lavado que limpia el ADN eliminando contaminantes y sales) y se centrifugó durante 1 minuto. El sobrenadante fue descartado y se realizó una segunda centrifugación por 1 minuto a $15\,000 \times g$.

Finalmente, el Spin Filter se colocó cuidadosamente en un nuevo Collection Tube y se añadieron 50 μL de Solución C6 que libera el ADN retenido en el Spin. Se centrifugó durante 3 minutos a $15\,000 \times g$. El Spin Filter fue descartado y el ADN del sobrenadante fue resguardado a 2°C . Este procedimiento se realizó en triplicado para cada muestra, a fin de obtener una mayor concentración de ADN.

La calidad y la concentración del ADN fueron medidas con un espectrofotómetro UV Q300 (Quawell, San José, CA, USA).

3.3.9. Secuenciación de ADN

Las 20 muestras de ADN fueron enviadas al laboratorio Oklahoma Medical Research Foundation NGS Core (Oklahoma City, USA) para su secuenciación mediante tecnología de nueva generación (Next-Generation Sequencing, NGS). La preparación de las librerías se llevó a cabo utilizando el kit Watchmaker Genomics DNA Library prep Kit with Fragmentation, a partir de 100 ng de ADN, con una concentración mínima de 2 ng/μL. La calidad de las librerías se verificó mediante qPCR (NEB) y con Agilent TapeStation. La secuenciación se ejecutó en la plataforma Illumina NovaSeq X Plus (25 B), generando lecturas paired-end de 2 * 150 bp. Los datos crudos se obtuvieron en formato FastQ.

3.3.10. Bioinformática

El análisis metagenómico se basó en el trabajo de Chivian et al. (2023). Así, las secuencias de datos brutos fueron sometidas a un control de calidad mediante FastQC (v0.12.1). Posteriormente, se utilizó RQCFilter (v38.22) para la limpieza general de las secuencias. Para la clasificación taxonómica se empleó Kaiju (v1.9.0). El ensamblaje se realizó con MEGAHIT (v1.2.9). Para comparar y verificar la calidad del ensamble, se utilizó QUAST (v4.4) y para la predicción de funciones metabólicas, se empleó DRAM (Distilled and Refined Annotation of Metabolism, v0.1.2) y KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) se utilizó para precisar las funciones metabólicas.

El gráfico de abundancias relativas y el análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) se construyeron a partir de una matriz de abundancias relativas de todos los taxones identificados en las muestras analizadas. Se realizó lo mismo con el análisis de redundancia, añadiendo los valores de los parámetros fisicoquímicos analizados.

3.4. Resultados y discusión

3.4.1. Sólidos solubles totales

Los sólidos solubles se midieron durante la molienda en la tahona y a lo largo de la fermentación, para evaluar el consumo de azúcares por parte de los microorganismos. En la **Figura 6** se muestran los cambios en los sólidos solubles y en la temperatura. Durante las primeras 48 horas, se observó un descenso significativo de 25 °Brix a aproximadamente 4 °Brix; posteriormente, la disminución fue mínima. Este comportamiento es el esperado durante el proceso, debido a la actividad metabólica de las levaduras que convierten los azúcares en alcohol y dióxido de carbono (Mu et al., 2023). Una mayor concentración inicial de sólidos solubles se asocia con un mejor rendimiento alcohólico, debido a la disponibilidad de azúcares fermentables, especialmente en sistemas cerrados (Rivera et al., 2022).

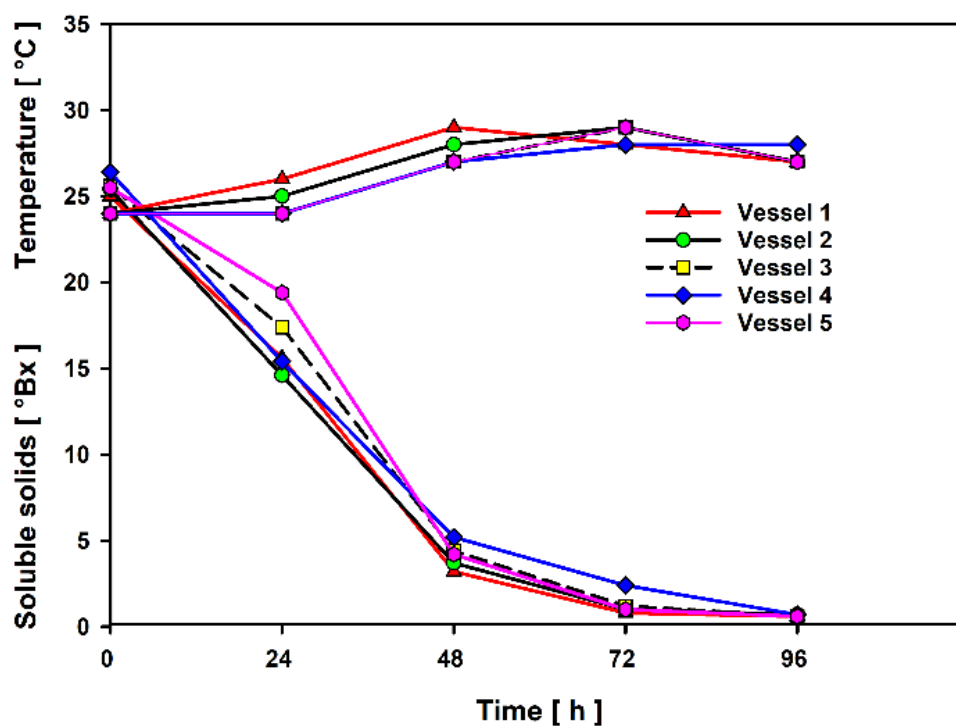


Figura 6. Consumo de sólidos solubles (°Brix) en función de la temperatura interna de las tinajas durante la fermentación del mosto.

Respecto a la temperatura, se registraron valores iniciales de 25-26 °C, que aumentaron a 28-29 °C a las 72 horas. Estas variaciones influyen en las características químicas y sensoriales del mosto y afectan la producción de compuestos aromáticos (Peng et al., 2015). Al respecto, Yilmaztekin et al. (2013) encontraron que una temperatura de 25 °C favorece una mayor producción de acetato de isoatilo, uno de los ésteres predominantes en el mezcal y responsable de las notas aromáticas a plátano (Nuñez-Guerrero et al., 2016).

3.4.2. Azúcares reductores totales en agave crudo y cocido

Los valores obtenidos para el porcentaje de azúcares reductores totales en agave crudo (22.71 % ART) y en agave cocido (23.34 % ART) mostraron un aumento del 2.8 %, lo que sugiere la hidrólisis parcial de los fructanos presentes en el agave y la liberación de azúcares fermentables como fructosa y glucosa. Este comportamiento concuerda con lo reportado en la literatura, donde un estudio realizado por Cuello et al. (2015) observaron un incremento gradual de la fructosa durante la primera hora de hidrólisis de los fructanos.

La cocción del agave es una de las etapas más importantes dentro del proceso de producción del mezcal, ya que durante el tratamiento térmico los fructanos se hidrolizan para generar azúcares reductores; estos se degradan parcialmente y dan origen a compuestos como los furanos (Garcia-Soto et al., 2011). A medida que se alcanza la máxima concentración de azúcares reductores, la producción de furanos también aumenta (Larsson et al., 1999), por lo que es necesario mantener un tiempo y una temperatura de cocción en el horno para evitar una exposición térmica excesiva de los agaves.

3.4.3. Azúcares reductores directos

Los azúcares reductores directos (% ARD) en la piña de agave cocida fueron de 22.92 %. En cuanto al porcentaje de hidrólisis alcanzado durante la cocción de las piñas, fue del 98.19 %. De acuerdo con Garcia-Soto et al. (2011), para obtener un buen rendimiento en la producción de etanol se debe alcanzar más del 80 % de hidrólisis de los fructanos. Considerando esto, el porcentaje de

hidrólisis obtenido en este estudio indica que el método de cocción empleado en el palenque es altamente eficiente.

3.4.4. Riqueza alcohólica

Jugo de agave

La riqueza alcohólica del jugo de agave espadín fue nula al inicio de la fermentación (0 h). Conforme avanzó el proceso de fermentación, se observó un incremento gradual, alcanzando valores entre 0.017 y 0.027 mL mL⁻¹ a las 24 h. Entre las 72 h y 96 h, la riqueza de 0.042 a 0.050 mL mL⁻¹ se estabilizó, lo que indica el inicio de la fase estacionaria, causada por el agotamiento del sustrato disponible. Un estudio realizado por Avila-Reyes et al. (2025) en jugo de *Agave angustifolia* reportaron una concentración de etanol de 4.2-5.0 % v/v, valores que coinciden con los obtenidos en la presente investigación.

Durante la fermentación, el pH del mosto de agave disminuyó gradualmente, lo que generó un ambiente más ácido, con valores entre 3.92 y 3.98, como se observa en la **Figura 7**. Aunque se observaron ligeras variaciones entre las tinas analizadas, todas mostraron un comportamiento cinético similar. La disminución del pH en el jugo de las tinas con mosto de agave se debe a la producción de ácidos orgánicos y otros compuestos derivados del metabolismo de las levaduras, lo que ocasiona una disminución gradual del pH del mosto (Mu et al., 2023). El pH es un factor que determina el crecimiento de las levaduras; por lo tanto, el contenido alcohólico se ve afectado por este parámetro (Calderón et al., 2025). El rango óptimo para que las levaduras tengan un buen rendimiento en la producción de etanol se encuentra en un pH de 3 - 4.5, un ambiente ácido (Liu et al., 2015).

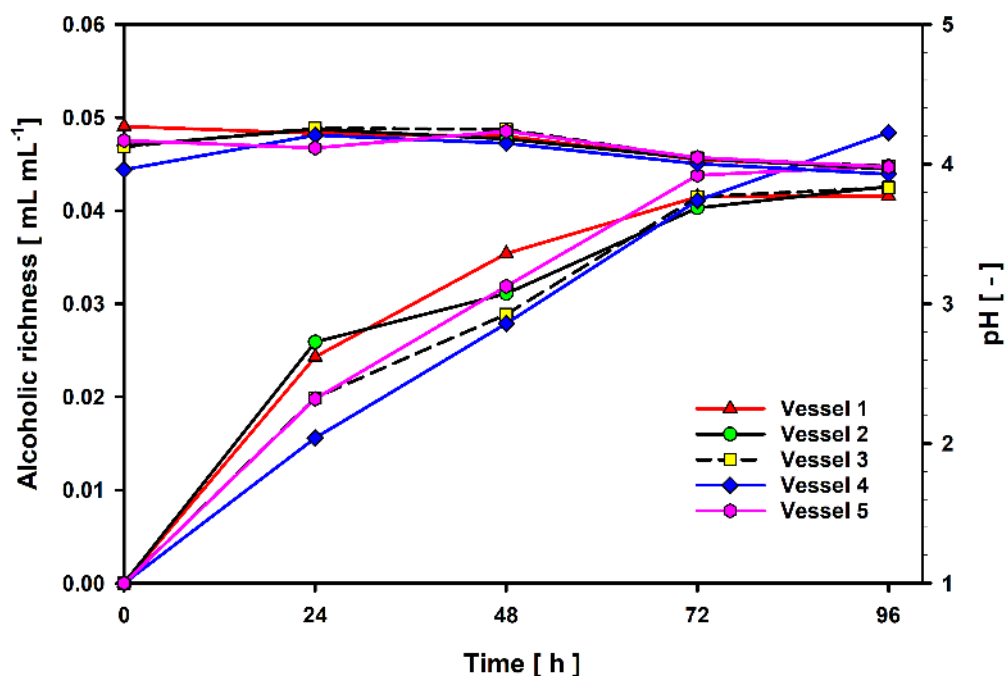


Figura 7. Cinética del aumento de la riqueza alcohólica y del pH durante la fermentación del mosto de agave.

Bagazo de agave

La riqueza alcohólica presente en la fracción sólida (bagazo) de las cinco tinas con mosto de *Agave angustifolia* se registró durante las primeras 24 horas de fermentación, como se ilustra en la **Figura 8**, con valores comprendidos entre 0.0035 y 0.0044 mL mL⁻¹.

A partir de ese punto, se observaron variaciones en las tinas, con ligeras disminuciones. A partir de las 72 horas, se observó un aumento de la riqueza alcohólica en el bagazo (≈ 0.0043 – 0.0055 mL mL⁻¹).

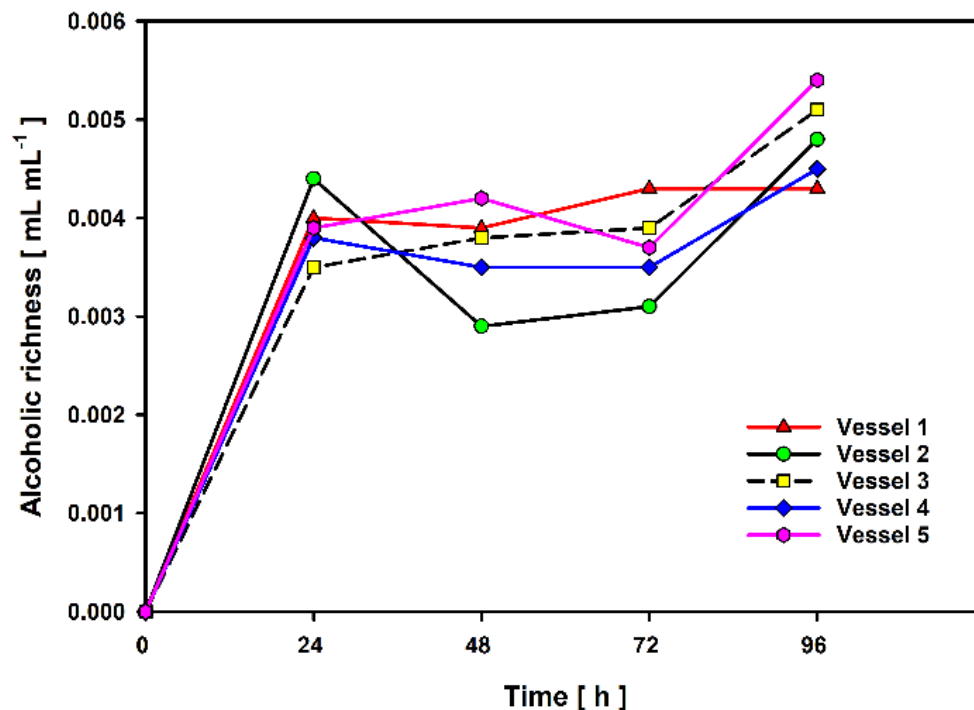


Figura 8. Riqueza alcohólica de la fracción sólida (bagazo) del mosto de agave proveniente de las tinas de fermentación.

En cuanto a la riqueza alcohólica del bagazo agotado, residuo fibroso que queda después de haber sido sometido al destilado, se obtuvieron las concentraciones reportadas en el **Cuadro 6**.

Cuadro 6. Riqueza alcohólica del bagazo agotado al final de la destilación.

Tina	pH	Riqueza alcohólica (mL mL ⁻¹)
1	4.338	0.0009
2	4.315	0.0008
3	4.376	0.0008
4	4.295	0.0012
5	4.323	0.0008

Los valores corresponden a una determinación realizada en el bagazo agotado al finalizar la destilación de cada tina.

Aunque el bagazo presenta un contenido alcohólico residual mínimo, su volumen generado en el palenque es considerable, lo que lo convierte en un residuo que afecta al medio ambiente, pero que puede aprovecharse. En el último año, se

generaron alrededor de 250 millones de toneladas de residuos, como hojas y bagazo, en la industria del mezcal (Franco Mota et al., 2024). Este subproducto generalmente no se aprovecha, ya que habitualmente se quema o abandona para su descomposición en los campos o ríos, lo que representa un problema de contaminación ambiental (Alvarez-Chavez et al., 2025).

El estudio y el desarrollo de alternativas para su aprovechamiento han sido poco explorados. No obstante, algunos trabajos han demostrado su potencial de valorización. Pérez-Pimienta et al. (2018) evaluaron el uso del bagazo como fuente de materia prima para la producción de biocombustibles dentro de refinerías. Asimismo, Pasaye-Anaya et al. (2019) reportaron la viabilidad para extraer 2, 3-butanediol, un compuesto usado como biocombustible o precursor químico. Así como la producción de metabolitos secundarios y actividad antioxidante al someter el bagazo a fermentación en estado sólido con *Pleurotus ostreatus* (Ibarra-Cantun et al., 2020). En el caso del bagazo de la industria tequilera, se ha propuesto como fuente de biomasa lignocelulósica para la producción de biocombustibles y productos con valor añadido derivados de la lignina y las fibras residuales (Palomo-Briones et al., 2017). Todas estas posibles aplicaciones evidencian el potencial del bagazo como un recurso de aprovechamiento y a su vez, contribuyen a la mitigación del impacto ambiental asociado a su acumulación.

Vinaza y flemaza

Por un lado, el **Cuadro 7** presenta la riqueza alcohólica de la vinaza obtenida de los diferentes alambiques, que mostró concentraciones variables, con valores entre 0.0012 y 0.0031 mL mL⁻¹. Estas bajas concentraciones indican que el alcohol presente en el mosto fue extraído casi por completo durante la destilación, dejando una fracción residual mínima en la vinaza. Este comportamiento es consistente con un proceso de destilación eficiente, ya que el alcohol constituye uno de los principales compuestos volátiles presentes en el mosto de *Agave angustifolia*.

Cuadro 7. Valores de pH y de riqueza alcohólica de la vinaza de cada alambique, correspondientes a cada una de las cinco tinas de fermentación.

Tina	1	2	3	4	5
pH	3.944	3.943	3.958	3.891	3.948
Riqueza alcohólica (mL mL ⁻¹)	0.0024	0.0027	0.0031	0.0021	0.0012

Los valores forman parte de una determinación realizada en la vinaza de cada tina al finalizar la destilación.

Se ha propuesto el uso de las vinazas como fuente de producción de proteínas debido a su composición rica en nutrientes y su alto contenido de materia orgánica (Ramos et al., 2025). De igual forma, el aprovechamiento de las vinazas mediante tratamientos fúngicos y sistemas anaerobios permite la remoción de materia orgánica y la producción de biogás como biocombustible (Díaz-Barajas et al., 2024). Un estudio realizado por Cuesta et al. (2025) evaluaron el crecimiento de larvas de mosca soldado negra en un biorreactor, alimentadas con diferentes sustratos: estiércol de ganado lechero, estiércol bovino y una mezcla de bagazo y vinaza para determinar la producción de proteínas y grasas en las larvas con el objetivo de producir fertilizantes.

La flemaza presentó una riqueza alcohólica de 0.005 mL mL⁻¹. Este valor confirma que, durante la segunda destilación, el refinado, el etanol presente en el ordinario, fue recuperado en el producto final, el mezcal, con residuos mínimos de alcohol en la flemaza.

3.4.5. Fermentación y consumo de azúcares reductores totales

El período de fermentación del jugo de *Agave angustifolia* duró de tres a cuatro días, ya que las tinas fueron sometidas a destilación el cuarto día.

La **Figura 9** presenta los resultados de la determinación de azúcares reductores totales en el jugo obtenido mediante molienda en tahona y en el mosto durante los días de fermentación. Se observó una disminución pronunciada de la concentración inicial de azúcares ($\approx 0.22 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$) en las primeras 24 h, lo que

evidencia un rápido consumo de carbohidratos fermentables por parte de la microbiota en el mosto. En el tercer día de fermentación (72 h), los niveles de azúcares eran casi nulos en las cinco tinajas, lo cual coincide con los resultados reportados por Kirchmayr et al. (2017), quienes monitorearon la cinética fermentativa en dos destilerías: San Pedro Totolápan y otra en Matatlán, ambas ubicadas en el estado de Oaxaca. Mientras que la concentración del contenido alcohólico fue en aumento.

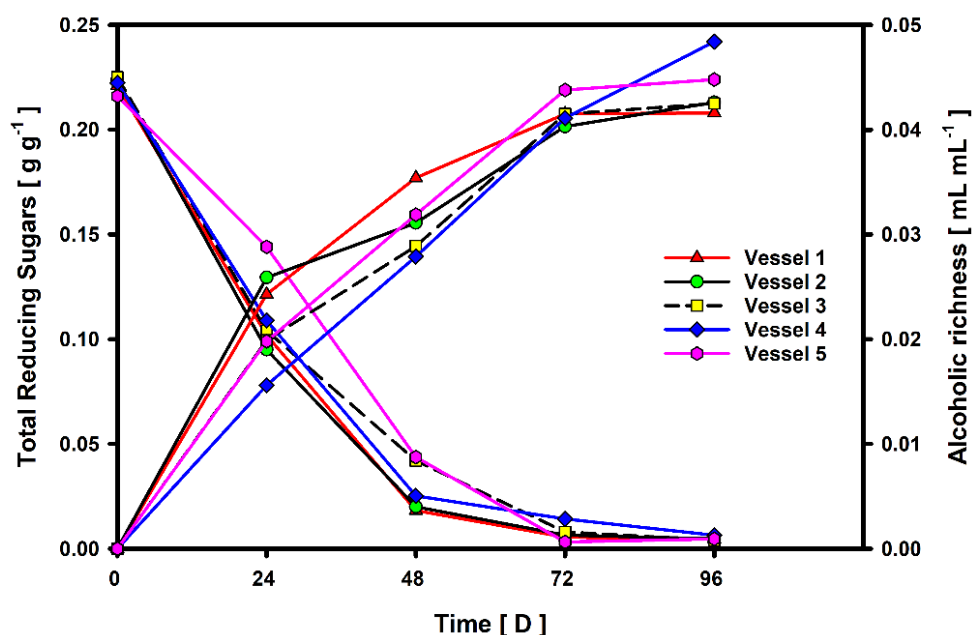


Figura 9. Comportamiento del consumo de azúcares y la producción de alcohol durante la etapa de fermentación en el Palenque Mezcal Único, Tlacolula de Matamoros, Oaxaca, México.

3.4.6. Perfil taxonómico durante la fermentación del mosto de *Agave angustifolia*

El estudio del perfil taxonómico identificó 7858 especies de bacterias, pertenecientes a 2092 géneros. Mientras que, las principales familias bacterianas que se presentaron en los mostos de agave fueron *Lactobacillaceae*, *Acetobacteraceae*, *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Bacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Weeksellaceae* y *Moraxellaceae*. Estos resultados muestran una comunidad microbiana dominada por bacterias ácido lácticas, sugiriendo que el sistema fermentativo favorece microorganismos ácido

tolerantes y con alta capacidad fermentativa en mosto de agave (Colon-Gonzalez et al., 2025), siendo consistente con condiciones típicas del proceso; disponibilidad de azúcares y pH bajo (Verdugo Valdez et al., 2011).

Durante el proceso de fermentación, se identificaron los principales órdenes bacterianos predominantes, entre los que destacan: Lactobacillales, Rhodospirillales, Bacillales, Eubacteriales, Enterobacteriales, Flavobacteriales, Moraxellales, Bifidobacteriales, Sphingomonadales, Hyphomicrobiales, Micrococcales, Pseudomonadales, Lachnospirales, Lysobacterales, Burkholderiales y Cytophagales. Por un lado, los géneros bacterianos más abundantes durante la etapa fermentativa, como se ilustra en la **Figura 10**, fueron *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Lactiplantibacillus* y *Oenococcus*.

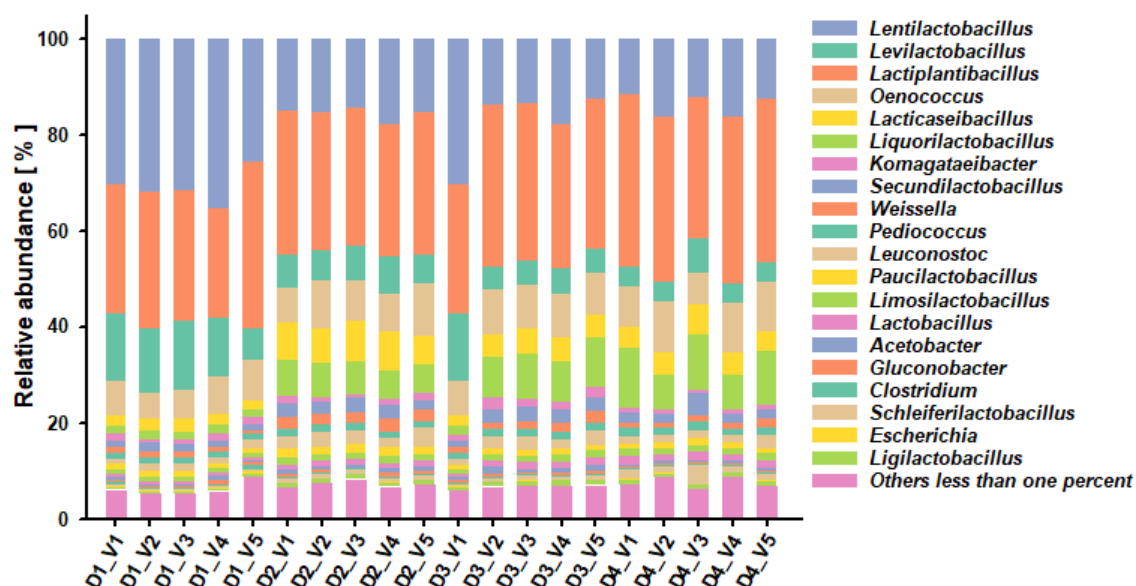


Figura 10. Dinámica de la abundancia relativa (>1%) de los géneros bacterianos identificados durante la etapa de fermentación del mosto de *Agave angustifolia*.

De acuerdo con la **Figura 11**, los microorganismos predominantes a nivel de especie al inicio y al final de la fermentación fueron *Lentilactobacillus hilgardii*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis*, *Oenococcus oeni*, *Liquorilactobacillus nagelii*, *Lentilactobacillus buchneri*, *Oenococcus sicerae*, *Lacticaseibacillus paracasei* y *Secundilactobacillus paracollinoides*.

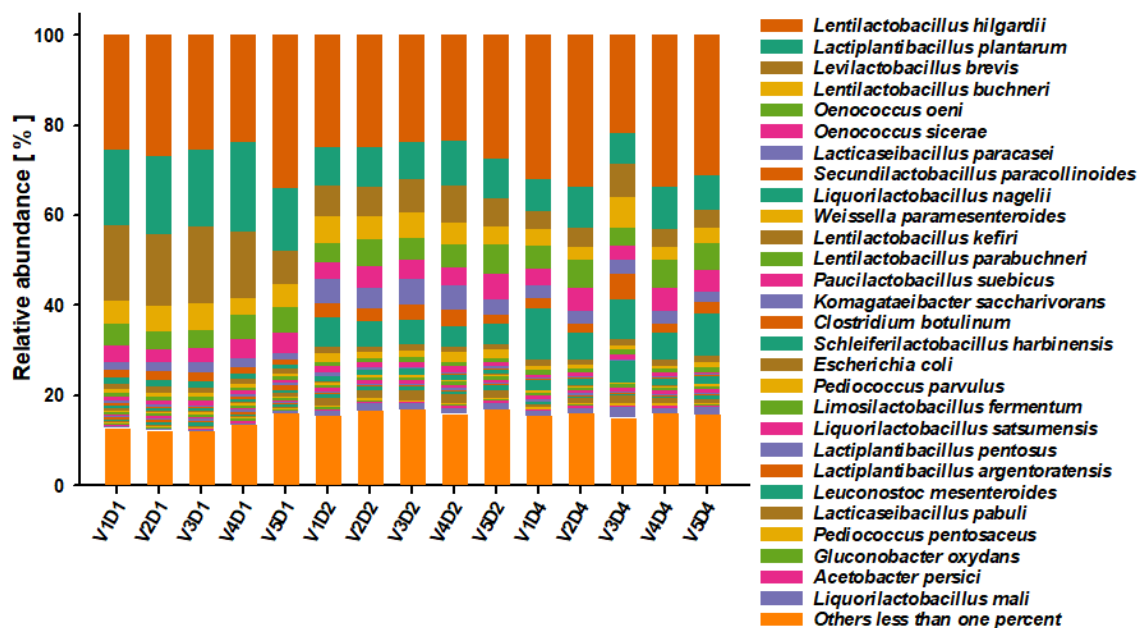


Figura 11. Diversidad taxonómica de especies bacterianas con abundancia > 1% en muestras de mosto de *Agave angustifolia*.

El primer día de la fermentación, *Lentilactobacillus hilgardii* tuvo la proporción más alta (27.16 % en promedio de las cinco tinas), seguido de *Lactiplantibacillus plantarum* (16.96 %), *Levilactobacillus brevis* (14.38 %). *L. hilgardii* ha demostrado capacidad para tolerar altas concentraciones de etanol, así como para consumir fructosa y descomponer putrescina y arginina; además, es precursor del carbamato de etilo (Mantegazza et al., 2025), un compuesto carcinógeno presente en bebidas fermentadas como el mezcal, el tequila, el sotol y la bacanora (Lachenmeier et al., 2009). Se ha reportado que posee genes implicados en el metabolismo de los carbohidratos y de los aminoácidos, lo que le permite adaptarse a diversos cambios ambientales (Gustav et al., 2021). En condiciones anaerobias produce lactato, acetato, etanol y dióxido de carbono (CO₂) debido a su capacidad heterofermentativa (Pasteris & Strasser de Saad, 2009). La coexistencia de *L. hilgardii* y *L. paracasei* sugiere posibles interacciones competitivas por el sustrato disponible o la inhibición del crecimiento de los demás mediante la producción de toxinas (Yang et al., 2026).

Las especies *Levilactobacillus brevis* y *Lactiplantibacillus plantarum* son dominantes en fermentaciones espontáneas (Madilo et al., 2024). *L. plantarum* es un microorganismo que produce ácido láctico (Harlé et al., 2025), responsable de la acidez de los mostos de vino, y se considera una especie iniciadora en fermentaciones alcohólicas (Lucio et al., 2016). Posee una vía homofermentativa capaz de degradar azúcares hexosas como la fructosa, la galactosa y la manosa, llegando a ser responsable de la calidad en bebidas fermentadas como el vino (Krieger-Weber et al., 2020). Se ha demostrado que reduce el pH en sistemas fermentativos y aporta un aroma afrutado y a fruta seca (Dysvik et al., 2020).

La actividad metabólica de *L. brevis* se asocia con la producción de 2-metil-1-butanol (Dysvik et al., 2020), un alcohol superior presente en el mezcal (Sanchez-Fernandez et al., 2025). Un estudio más específico determinó que *L. brevis*, mediante la suplementación con aminoácidos, produce 49 compuestos orgánicos volátiles (VOCs), como alcoholes, ácidos, ésteres, cetonas y aldehídos (Rajendran et al., 2024). En cuanto a alcoholes, llega a producir 1-butanol y benzaldehído en fermentaciones de café (Amaral et al., 2026), estos mismos compuestos se encuentran en el mezcal. Estos compuestos se obtienen mediante la vía de la fosfocetolasa, empleando diversas fuentes de carbono como arabinosa, glucosa, xilosa (Kim et al., 2009), fructosa, galactosa, maltosa y gluconato (Wang et al., 2021). Vía metabólica también usada por *L. plantarum* (Siragusa et al., 2014).

En cuanto a las especies *L. buchneri*, *O. oeni* y *O. sicerae* comparten el metabolismo al degradar azúcares a través de la ruta fosfocetolasa por medio de la enzima xpk y adhE (aldehído deshidrogenasa) para obtener acetato, CO₂, lactato y etanol (Cibrario et al., 2016). Particularmente, *O. oeni* degrada la glucosa mediante la vía de la fosfocetolasa (Mills et al., 2005) para producir diacetilo, un compuesto de sabor (Eicher et al., 2024). A partir de fructosa, produce manitol mediante los genes fructocinasa *nagC1* y manitol deshidrogenasa *mtd* (Contreras et al., 2018).

Los estudios anteriores sobre jugo de agave fermentado de *A. angustifolia* identificaron algunos de los mismos microorganismos presentes en este estudio, aunque con un método de identificación taxonómica distinto, además, atribuyen la diversidad de bacterias durante a la fermentación a factores como la destilería a campo abierto, la interacción del agave con el suelo, a los carbohidratos disponibles del agave y las prácticas de producción (Kirchmayr et al., 2017).

En otras bebidas fermentadas, como el pulque, se produce una fermentación compleja que transforma la savia del maguey en metabolitos como el etanol y el ácido láctico; se han identificado microorganismos heterofermentativos similares, entre ellos los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* (Chacon-Vargas et al., 2020).

Entre los productos derivados de los jugos de agave cocido, el tequila, los principales microorganismos presentes han sido *L. rhamnosus*, *L. fermentum* y *L. plantarum* (Aldrete-Tapia et al., 2020); estos dos últimos coinciden con los encontrados en este estudio.

En otro contexto, la **Figura 12** revela cambios en la abundancia de las levaduras a lo largo de las distintas etapas de fermentación. En el primer día de fermentación se observó la presencia de las especies *Saccharomyces cerevisiae* (99.81 %) y *Torulaspora delbrueckii* (0.18 %). En el segundo día, únicamente predominó *S. cerevisiae* (100 %); para el tercer día se presentó *Zygosaccharomyces rouxii* (0.080 %) y, en el último día, *S. cerevisiae* fue la especie predominante (100 %). La escasa presencia de levaduras no-*Saccharomyces* podría deberse a su baja tolerancia al alcohol y al pH bajo (Qiu et al., 2022). La predominancia de las levaduras de *Saccharomyces* sugiere una alta presión de selección a lo largo del proceso de producción en las condiciones del palenque, lo cual podría estar asociado a las características sensoriales peculiares del mezcal.

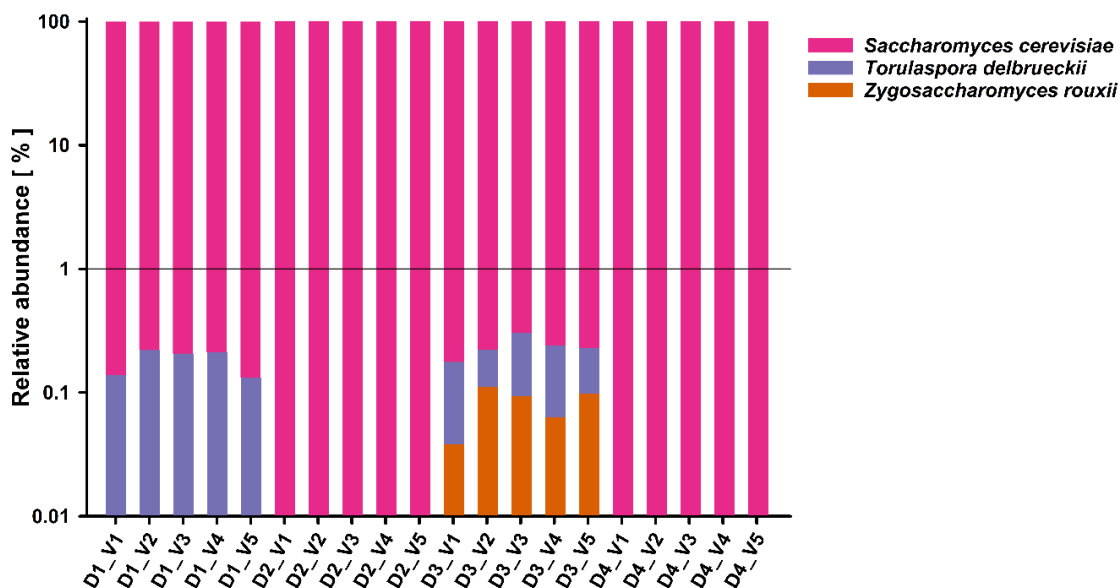


Figura 12. Composición taxonómica a nivel de especies de levaduras en las cinco tinas de fermentación del mosto de *Agave angustifolia*.

La abundancia de *S. cerevisiae* se debe a su capacidad de producir una amplia gama de metabolitos, ya que metaboliza azúcares en etanol, ácidos grasos, alcoholes superiores y ésteres (Comitini et al., 2021). La relación entre las levaduras de *S. cerevisiae* y la cantidad de etanol producido está ligada a su crecimiento significativo, ya que un aumento de su biomasa favorece la producción de ATP y, en consecuencia, la de etanol (Walker & Stewart, 2016).

Las especies *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspora delbrueckii*, encontradas en este estudio, concuerdan con los resultados obtenidos por Kirchmayr et al. (2024). Las levaduras producen una amplia variedad de metabolitos secundarios durante la fermentación, tales como alcoholes superiores, ésteres, cetonas, fenoles, ácidos grasos y compuestos sulfurados (Q. Liu et al., 2025). Por esta razón, la presencia de levaduras en el proceso de fermentación del mosto de mezcal es de gran importancia.

3.4.7. Dinámica microbiana durante la etapa de fermentación

El análisis de escalamiento multidimensional no métrico basado en las distancias de Bray-Curtis, representado en la **Figura 13** evidencia diferencias en la

estructura y composición de la comunidad microbiana entre los días de fermentación (D1, D2, D3 y D4). El valor del Stress (0.0386) indica que la representación bidimensional es adecuada para evidenciar las relaciones de similitud y puede considerarse confiable (Ramette, 2007). Las muestras del día 1 se agruparon por separado de las de los días siguientes, atribuyéndolas a una composición microbiana inicial distinta. El segundo día de fermentación muestra una menor dispersión entre las cinco tinas, lo que indica una mayor similitud en la composición bacteriana. En contraste, los días de fermentación 3 y 4 mostraron una mayor dispersión, lo que sugiere variabilidad entre las tinas de mosto. El tamaño de las elipses de dispersión sugiere homogeneidad en D2 y mayor variabilidad en D3 y D4, así como un cambio gradual en las abundancias relativas. El análisis NMDS mostró el cambio en la composición bacteriana a lo largo de la etapa de fermentación.

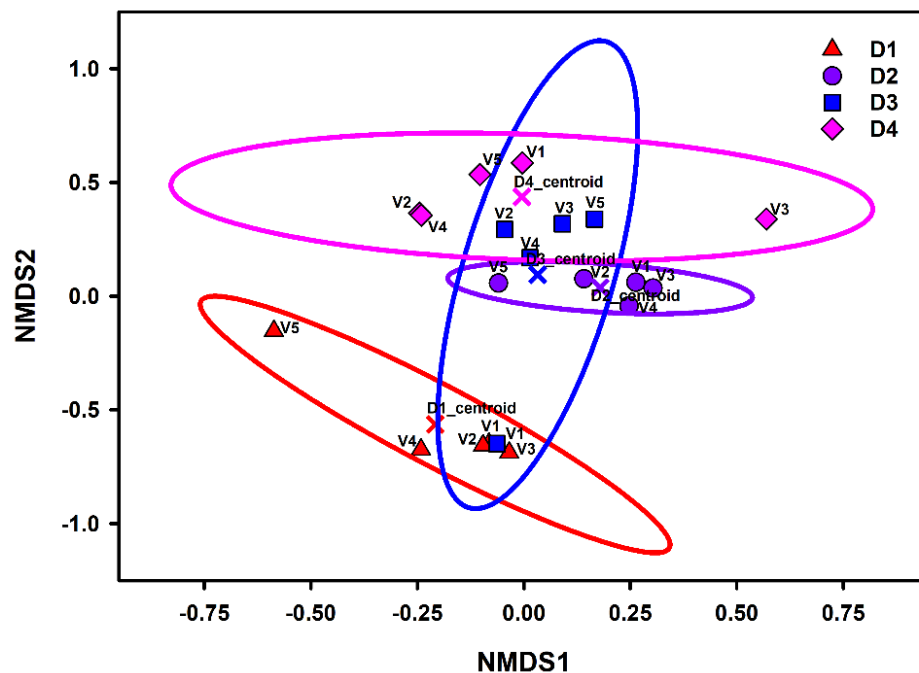


Figura 13. Análisis NMDS basado en las distancias de Bray-Curtis que muestra la variación en la estructura de la comunidad microbiana durante la fermentación del mosto de agave. Los puntos representan muestras individuales y las elipses, la dispersión por día de fermentación.

3.4.8. Las variables ambientales y las poblaciones microbianas

El análisis de redundancia, presentado en la **Figura 14**, reveló cambios en la estructura de la comunidad bacteriana durante la fermentación. El eje RDA1 (46.3 %) plasma la mayor variabilidad, indicando que los cambios en la composición bacteriana estuvieron determinados principalmente por el factor ambiental. Las variables fisicoquímicas, como los azúcares reductores totales, los sólidos solubles y la riqueza alcohólica, presentan una relación positiva entre sí. Las dos primeras tienen una orientación similar, un comportamiento esperado, ya que reflejan la disponibilidad de carbohidratos fermentables presentes en el mosto. A diferencia del pH y la temperatura, muestran una orientación desigual, lo que sugiere una contribución distinta a la variación observada en la comunidad bacteriana.

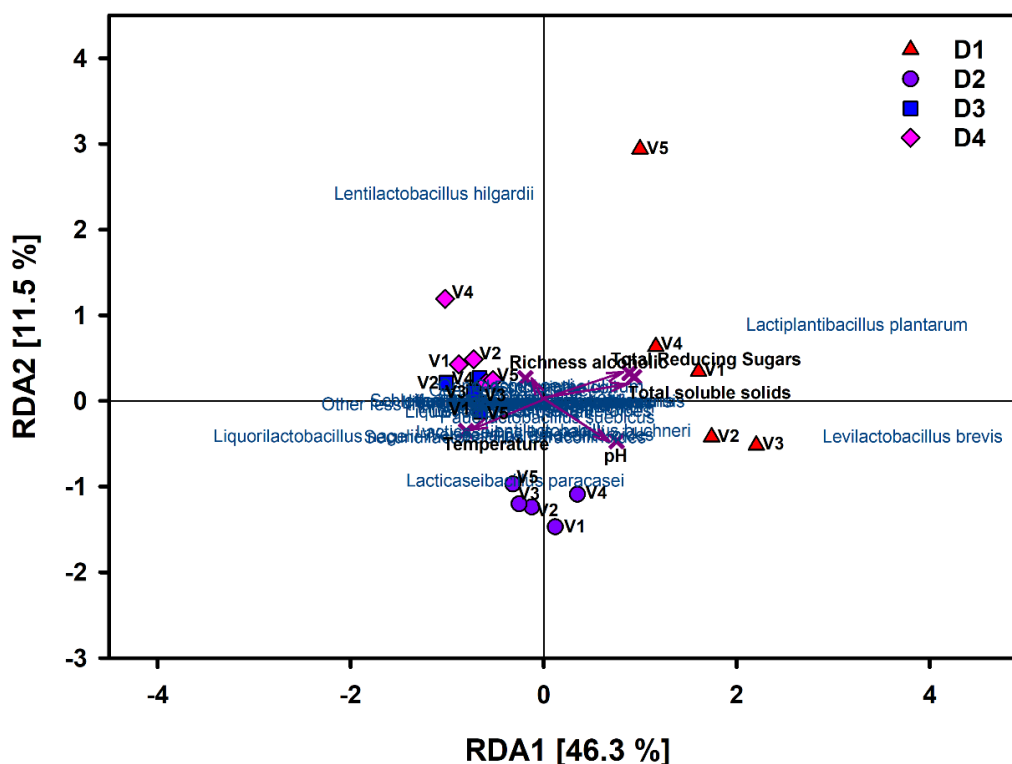


Figura 14. Análisis de redundancia (RDA) de la comunidad bacteriana en función de las variables fisicoquímicas durante la fermentación del mosto de *Agave angustifolia*.

Las muestras del día 1 (D1) se localizaron en los valores positivos del eje RDA1, mientras que las de los días siguientes se agruparon alrededor del origen, lo que refleja la sucesión microbiana durante la fermentación. La distribución de las muestras evidenció una separación temporal entre los días de fermentación, lo que indica una sucesión en la composición de la comunidad bacteriana a lo largo de estos días.

La asociación de especies como *Lactiplantibacillus plantarum* con la dirección de los vectores sugiere que este microorganismo estuvo relacionado con las etapas iniciales de la fermentación, cuando la disponibilidad de azúcares era mayor. Por otro lado, las especies situadas en direcciones opuestas podrían estar adaptadas a las etapas más avanzadas del proceso, caracterizadas por una menor disponibilidad de azúcares y cambios en el sistema fermentativo.

Estos resultados coinciden con estudios sobre fermentaciones de mezcal, en la que la comunidad microbiana está determinada por los carbohidratos disponibles y otras condiciones fisicoquímicas del mosto.

3.5. Conclusiones

El análisis metagenómico aplicado durante la fermentación del mosto de *Agave angustifolia* evidenció una elevada diversidad microbiana integrada principalmente por bacterias ácido lácticas de los géneros *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Lactiplantibacillus* y *Oenococcus*. En cuanto a la especie dominante, la presencia de *L. hilgardii* resalta la importancia de monitorear los microorganismos asociados a la formación de metabolitos que podrían favorecer o afectar al mezcal. En cuanto a las levaduras, *S. cerevisiae* fue la especie dominante durante el proceso fermentativo, posiblemente debido a una alta presión de selección, lo que confirma su papel como microorganismo responsable de la fermentación alcohólica.

El análisis de diversidad beta mediante NMDS indicó variabilidad en las tinas con mosto a lo largo del tiempo de fermentación. En conjunto, los resultados

demuestran que la fermentación del mosto de agave es un proceso dinámico en el que las bacterias y levaduras desempeñan un papel importante en la transformación del sustrato y, potencialmente, en la formación de compuestos responsables de las características sensoriales del mezcal.

3.6. Literatura citada

- Aldrete-Tapia, J. A., Escalante-Minakata, P., Martinez-Peniche, R. A., Tamplin, M. L., & Hernandez-Iturriaga, M. (2020). Yeast and bacterial diversity, dynamics and fermentative kinetics during small-scale tequila spontaneous fermentation. *Food Microbiol*, 86, 103339. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103339>
- Alvarez-Chavez, J., Dufoo-Hurtado, E., Santos-Zea, L., & Ramirez-Jimenez, A. K. (2025). Looking into New Sources of Bioactives: Seasonal Variation in Bioactive Compounds and Dietary Fiber of Agave Bagasse from Mezcal Production. *Foods*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/foods14091632>
- Amaral, E. d. P., Entringer, T. L., Veloso, T. G. R., da Luz, J. M. R., Pimenta, L. H. B., Moreli, A. P., Pereira, L. L., & da Silva, M. d. C. S. (2026). Microbial dynamics and impact of controlled fermentation in *Coffea arabica* over 288 h. *Food Bioscience*, 75. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.108081>
- Avila-Reyes, S. V., Jimenez-Aparicio, A. R., Melgar-Lalanne, G., Fajardo-Espinoza, F. S., & Hernandez-Sanchez, H. (2025). Mezcal: A Review of Chemistry, Processing, and Potential Health Benefits. *Foods*, 14(8). <https://doi.org/10.3390/foods14081408>
- Calderón, R. R., Boza, F. A., Benmites-Alfaro, E., Gómez, O. T., & Flores, J. C. (2025). Consortium of *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* Yeasts for Vinasse Fermentation of Agave americana L. Liquor for Biomass Production and Reduction in Chemical Oxygen Demand. *Fermentation*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/fermentation11050281>
- Chacon-Vargas, K., Torres, J., Giles-Gomez, M., Escalante, A., & Gibbons, J. G. (2020). Genomic profiling of bacterial and fungal communities and their predictive functionality during pulque fermentation by whole-genome shotgun sequencing. *Sci Rep*, 10(1), 15115. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71864-4>
- Chivian, D., Jungbluth, S. P., Dehal, P. S., Wood-Charlson, E. M., Canon, R. S., Allen, B. H., Clark, M. M., Gu, T., Land, M. L., Price, G. A., Riehl, W. J., Sneddon, M. W., Sutormin, R., Zhang, Q., Cottingham, R. W., Henry, C. S., & Arkin, A. P. (2023). Publisher Correction: Metagenome-assembled genome extraction and analysis from microbiomes using KBase. *Nat Protoc*, 18(2), 658. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00794-4>
- Cibrario, A., Peanne, C., Lailheugue, M., Campbell-Sills, H., & Dols-Lafargue, M. (2016). Carbohydrate metabolism in *Oenococcus oeni*: a genomic insight. *BMC Genomics*, 17(1), 984. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3338-2>

- Colon-Gonzalez, M., Aguirre-Dugua, X., Guerrero-Osornio, M. G., Avelar-Rivas, J. A., DeLuna, A., Mancera, E., & Morales, L. (2025). Thriving in Adversity: Yeasts in the Agave Fermentation Environment. *Yeast*, 42(1-3), 16–30. <https://doi.org/10.1002/yea.3989>
- Comitini, F., Agarbati, A., Canonico, L., & Ciani, M. (2021). Yeast Interactions and Molecular Mechanisms in Wine Fermentation: A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci*, 22(14). <https://doi.org/10.3390/ijms22147754>
- Contreras, A., Ribbeck, M., Gutiérrez, G. D., Cañon, P. M., Mendoza, S. N., & Agosin, E. (2018). Mapping the Physiological Response of *Oenococcus oeni* to Ethanol Stress Using an Extended Genome-Scale Metabolic Model [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, Volume 9 - 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00291>
- Cuello, C. M., Fonseca, G. G., Cervantes, E. M., & Rivera, N. A. (2015). Effect of temperature and pH environment on the hydrolisis of maguey fructans to obtain fructose syrup. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14, 615–622.
- Cuesta, D. M. P., Montenegro, C. E. M., Ortega, G. R., & Sanchez, F. J. R. (2025). Validation of a bioreactor for the growth of black soldier fly larvae: Test with animal feces, agave residues and vinasse. *Environmental Challenges*, 18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envc.2025.101090>
- Díaz-Barajas, S., Moreno-Andrade, I., & Garzón-Zúñiga, M. A. (2024). Mezcal vinasses treatment: A review of assessed processes. *Tecnología y ciencias del agua*, 15(2), 164–206. <https://doi.org/10.24850/j-tyca-15-02-04>
- Dysvik, A., La Rosa, S. L., Liland, K. H., Myhrer, K. S., Ostlie, H. M., De Rouck, G., Rukke, E. O., Westereng, B., & Wicklund, T. (2020). Co-fermentation Involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* Species Tolerant to Brewing-Related Stress Factors for Controlled and Rapid Production of Sour Beer. *Front Microbiol*, 11, 279. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00279>
- Eicher, C., Coulon, J., Favier, M., Alexandre, H., Reguant, C., & Grandvalet, C. (2024). Citrate metabolism in lactic acid bacteria: is there a beneficial effect for *Oenococcus oeni* in wine? [Review]. *Frontiers in Microbiology*, Volume 14 - 2023. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1283220>
- Escalante-Minakata, P., Blaschek, H. P., Barba de la Rosa, A. P., Santos, L., & De Leon-Rodriguez, A. (2008). Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of *Agave salmiana*. *Lett Appl Microbiol*, 46(6), 626–630. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02359.x>
- Franco Mota, R. I., Rodríguez-Rosales, M. D. J., Martínez-Roldán, A. d. J., Martínez Gómez, V. J., De la Peña Arellano, A., & Contreras Hernández, M. G. (2024). El Agave en México: su aplicación como adsorbente para la remoción de contaminantes en el agua. *Agraria*, 21(3), 5–14. <https://doi.org/10.59741/agraria.v21i3.623>
- García-Soto, M. J., Jiménez-Islas, H., Navarrete-Bolaños, J. L., Rico-Martínez, R., Miranda-López, R., & Botello-Álvarez, J. E. (2011). Kinetic Study of the Thermal Hydrolysis of *Agave salmiana* for Mezcal Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 7333–7340. <https://doi.org/10.1021/jf200026y>

- Harlé, O., Parayre, S., Maillard, M. B., Henry, G., Guédon, É., Thierry, A., Niay, J., Deutsch, S. M., & Falentin, H. (2025). Fermentation of Soy Juice by *Lactiplantibacillus plantarum* CIRM-BIA777 Produces Flavor-Related and Health-Promoting Metabolites. *Food Frontiers*, 6(6), 3137–3153. <https://doi.org/10.1002/fft2.70118>
- Ibarra-Cantun, D., Ramos-Cassellis, M. E., Marin-Castro, M. A., & Castelan-Vega, R. D. C. (2020). Secondary Metabolites and Antioxidant Activity of the Solid-State Fermentation in Apple (*Pirus malus* L.) and Agave Mezcalero (*Agave angustifolia* H.) Bagasse. *J Fungi (Basel)*, 6(3). <https://doi.org/10.3390/jof6030137>
- Jara-Servin, A., Alcaraz, L. D., Juarez-Serrano, S. I., Espinosa-Jaime, A., Barajas, I., Morales, L., DeLuna, A., Hernandez-Lopez, A., & Mancera, E. (2025). Microbial Communities in Agave Fermentations Vary by Local Biogeographic Regions. *Environ Microbiol Rep*, 17(1), e70057. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.70057>
- Kim, J. H., Shoemaker, S. P., & Mills, D. A. (2009). Relaxed control of sugar utilization in *Lactobacillus brevis*. *Microbiology (Reading)*, 155(Pt 4), 1351–1359. <https://doi.org/10.1099/mic.0.024653-0>
- Kirchmayr, M. R., Segura-García, L. E., Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., de la Rosa, M., & Gschaedler Mathis, A. (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. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.052>
- Kirchmayr, M. R., Vital-López, L., Arellano-Plaza, M., Gschaedler, A. C., Larralde-Corona, C. P., & Narváez-Zapata, J. A. (2024). Bacterial community inferred by metagenomic analysis in an artisanal mezcal distillery in Guerrero, Mexico. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 58. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103159>
- Krieger-Weber, S., Heras, J. M., & Suarez, C. (2020). *Lactobacillus plantarum*, a New Biological Tool to Control Malolactic Fermentation: A Review and an Outlook. *Beverages*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/beverages6020023>
- Lachenmeier, D. W., Kanteres, F., & Rehm, J. (2009). Carcinogenicity of acetaldehyde in alcoholic beverages: risk assessment outside ethanol metabolism. *Addiction*, 104(4), 533–550. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2009.02516.x>
- Larsson, S., Palmqvist, E., Hagerdal, B. H., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., & Nilvebrant, N. O. (1999). The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology*, 24, 151–159.
- Liu, Q., Hao, N., Mi, L., Peng, S., Marie-Colette, A. K., Zhao, X., & Wang, J. (2025). From microbial communities to aroma profiles: A comparative study of spontaneous fermentation in merlot and cabernet sauvignon wines. *Food Chem X*, 26, 102317. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2025.102317>
- Liu, X., Jia, B., Sun, X., Ai, J., Wang, L., Wang, C., Zhao, F., Zhan, J., & Huang, W. (2015). Effect of initial ph on growth characteristics and fermentation

- properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Food Sci*, 80(4), M800–808. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12813>
- López-Sánchez, C., Espinoza-Martínez, V. A., Palma-Cruz, F. d. J., Enríquez-Valencia, R., Ramírez-López, M. P., Ortiz-Cortés, L. Y., & Álvarez-Gutiérrez, P. E. (2026). Ethnobiotechnological Analysis of the Lactic Bacterial Diversity in the Mezcal Fermentation of Four Palenques in Oaxaca, Mexico. *Fermentation*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/fermentation12020089>
- Lucio, O., Pardo, I., Krieger-Weber, S., Heras, J. M., & Ferrer, S. (2016). Selection of *Lactobacillus* strains to induce biological acidification in low acidity wines. *Lwt*, 73, 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.031>
- Madilo, F. K., Parry-Hanson Kunadu, A., Tano-Debrah, K., Saalia, F. K., Kolanisi, U., & Speranza, B. (2024). Diversity of Production Techniques and Microbiology of African Cereal-Based Traditional Fermented Beverages. *Journal of Food Quality*, 2024, 1–32. <https://doi.org/10.1155/2024/1241614>
- Mantegazza, G., Mangieri, N., Yazdi, E. V., Russo, P., Mora, D., & Gargari, G. (2025). Unveiling the Potential of *Lentilactobacillus hilgardii* in Malolactic Fermentation: Comparative Genomics and Fermentation Dynamics. *Microb Biotechnol*, 18(12), e70259. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.70259>
- Mills, D. A., Rawsthorne, H., Parker, C., Tamir, D., & Makarova, K. (2005). Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking. *FEMS Microbiol Rev*, 29(3), 465–475. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.011>
- Mu, Y., Zeng, C., Qiu, R., Yang, J., Zhang, H., Song, J., Yuan, J., Sun, J., & Kang, S. (2023). Optimization of the Fermentation Conditions of Huanian Apple Cider and Quantification of Volatile Compounds Using HS-SPME-GC/MS. *Metabolites*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/metabo13090998>
- Narvaez-Zapata, J. A., Rojas-Herrera, R. A., Rodríguez-Luna, I. C., & Larralde-Corona, C. P. (2010). Culture-independent analysis of lactic acid bacteria diversity associated with mezcal fermentation. *Curr Microbiol*, 61(5), 444–450. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9636-z>
- Núñez-Guerrero, M. E., Páez-Lerma, J. B., Rutiaga-Quñones, O. M., González-Herrera, S. M., & Soto-Cruz, N. O. (2016). Performance of mixtures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* native yeasts during alcoholic fermentation of *Agave duranguensis* juice. *Food Microbiology*, 54, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.011>
- Páez-Lerma, J. B., Arias-García, A., Rutiaga-Quñones, O. M., Barrio, E., & Soto-Cruz, N. O. (2013). Yeasts Isolated from the Alcoholic Fermentation of *Agave duranguensis* During Mezcal Production. *Food Biotechnology*, 27(4), 342–356. <https://doi.org/10.1080/08905436.2013.840788>
- Palomo-Briones, R., López-Gutiérrez, I., Islas-Lugo, F., Galindo-Hernández, K. L., Munguía-Aguilar, D., Rincón-Pérez, J. A., Cortés-Carmona, M. Á., Alatríste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2017). Agave bagasse biorefinery: processing and perspectives. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 20(7), 1423–1441. <https://doi.org/10.1007/s10098-017-1421-2>

- Pasaye-Anaya, L., Vargas-Tah, A., Martínez-Cámara, C., Castro-Montoya, A. J., & Campos-García, J. (2019). Production of 2,3-butanediol by fermentation of enzymatic hydrolysed bagasse from agave mezcal-waste using the native *Klebsiella oxytoca* UM2-17 strain. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 94(12), 3915–3923. <https://doi.org/10.1002/jctb.6190>
- Pasteris, S. E., & Strasser de Saad, A. M. (2009). Sugar-glycerol cofermentations by *Lactobacillus hilgardii* isolated from wine. *J Agric Food Chem*, 57(9), 3853–3858. <https://doi.org/10.1021/jf803781k>
- Pérez-Pimienta, J. A., Mojica-Álvarez, R. M., Sánchez-Herrera, L. M., Mittal, A., & Sykes, R. W. (2018). Recalcitrance Assessment of the Agro-industrial Residues from Five Agave Species: Ionic Liquid Pretreatment, Saccharification and Structural Characterization. *BioEnergy Research*, 11(3), 551–561. <https://doi.org/10.1007/s12155-018-9920-5>
- Pérez, E., Hernández, J. C. G., Parga, M. C. C., & Penagos, C. C. (2013). Caracterización fermentativa de levaduras productoras de etanol a partir de jugo de Agave cupreata en la elaboración de mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12, 451–461.
- Qiu, S., Chen, K., Liu, C., Wang, Y., Chen, T., Yan, G., & Li, J. (2022). Non-Saccharomyces yeasts highly contribute to characterisation of flavour profiles in greengage fermentation. *Food Res Int*, 157, 111391. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111391>
- Rajendran, S., Silcock, P., & Bremer, P. (2024). Volatile Organic Compounds (VOCs) Produced by *Levilactobacillus brevis* WLP672 Fermentation in Defined Media Supplemented with Different Amino Acids. *Molecules*, 29(4), 753.
- Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*, 62(2), 142–160. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00375.x>
- Ramos, M. F. R., González, M. E. L., Barajas, P. Á., Garcia, C. E. G., Tuesta, D. A. P., I., S. M., & Gradillas, M. S. H. (2025). Exploring the potential of distillery vinasses through upcycling: Pathways to a circular economy. *Environmental Technology & Innovation*, 38. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eti.2025.104072>
- Rivera, T. J., Huerta, R. Z., Herrera, M. G. H., Herrera, E. V., & Flores, A. G. (2022). Condiciones de maceración y fermentación que incrementan el contenido de etanol en mo.pdf>. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 24, 133–141.
- Sanchez-Fernandez, R. E., Perez-Lopez, A., Morales-Solis, A., Manilla-Tellez, Y., Reyes-Carmona, E. D., & Avila-Urbe, G. (2025). Chemistry of Mezcal: Volatile Profile of Artisanal Mezcal Made from Wild Agaves of Oaxaca. *Foods*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/foods14071222>
- Siragusa, S., De Angelis, M., Calasso, M., Campanella, D., Minervini, F., Di Cagno, R., & Gobbetti, M. (2014). Fermentation and proteome profiles of *Lactobacillus plantarum* strains during growth under food-like conditions. *J Proteomics*, 96, 366–380. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.11.003>
- Verdugo Valdez, A., Segura Garcia, L., Kirchmayr, M., Ramirez Rodriguez, P., Gonzalez Esquinca, A., Coria, R., & Gschaedler Mathis, A. (2011). Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from Agave

- salmiana. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100(4), 497–506.
<https://doi.org/10.1007/s10482-011-9605-y>
- Walker, G., & Stewart, G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*, 2(4).
<https://doi.org/10.3390/beverages2040030>
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry [Review]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Volume 9 - 2021.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>
- Yang, S., Fu, X., Yang, Z., Zhang, T., Lu, C., Yi, L., Zhao, Q., Gu, Y., & Wang, S. (2026). Metagenomic sequencing reveals the similarities and differences in microbial community structure and diversity between fermented whey and Rubing cheese, a fresh goat milk cheese. *Food Research International*, 237. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2026.119400>
- Yilmaztekin, M., Cabaroglu, T., & Erten, H. (2013). Effects of fermentation temperature and aeration on production of natural isoamyl acetate by *Williopsis saturnus* var. *saturnus*. *Biomed Res Int*, 2013, 870802.
<https://doi.org/10.1155/2013/870802>

4. PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL MEZCAL ARTESANAL EN EL PALENQUE MEZCAL ÚNICO, TLACOLULA DE MATAMOROS, OAXACA, MÉXICO

4.1. Resumen

La producción de mezcal artesanal es una actividad de gran importancia cultural y económica en México, caracterizada por ser un proceso sustentado en conocimientos empíricos y prácticas tradicionales transmitidas de generación en generación. Cada región mezcalera presenta características únicas en la elaboración de esta bebida mexicana, determinadas por las condiciones ambientales, los recursos disponibles y la experiencia del Maestro Mezcalero. En el Palenque Mezcal Único de Tlacolula de Matamoros, Oaxaca, México, se siguen conservando prácticas tradicionales que fueron documentadas mediante la observación directa de cada una de las etapas, entrevistas no estructuradas al Maestro Mezcalero y al personal del palenque, así como el registro audiovisual y fotográfico de las actividades. El proceso abarcó la cosecha de las plantas maduras de *Agave angustifolia*, la cocción de las piñas, la molienda y la destilación. De forma paralela, se dio seguimiento a los principales parámetros fisicoquímicos con el propósito de comprender la dinámica del proceso fermentativo. La caracterización permitió identificar las etapas que influyen en gran medida en la elaboración de un mezcal artesanal y adquirir un conocimiento profundo que permita interpretar los cambios fisicoquímicos y microbiológicos que ocurren durante la fermentación. Asimismo, este estudio constituye un marco de referencia para investigaciones futuras sobre el mezcal artesanal y aporta evidencia científica que respalda el conocimiento tradicional a todos aquellos que producen mezcal artesanal.

Palabras clave: Mezcal artesanal, *Agave angustifolia*, Maestro Mezcalero.

Tesis de Maestría en Ciencia, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Jazmín Hernández Hernández

Director de tesis: Dr. Teodoro Espinosa Solares

PRODUCTION PROCESS FOR ARTISANAL MEZCAL AT PALENQUE MEZCAL ÚNICO, TLACOLULA DE MATAMOROS, OAXACA, MÉXICO

Abstract

The production of artisanal mezcal is an activity of great cultural and economic importance in Mexico, characterized by a process rooted in empirical knowledge and traditional practices passed down from generation to generation. Each mezcal-producing region has unique characteristics in the production of this Mexican beverage, determined by environmental conditions, available resources, and the expertise of the Master Mezcalero. At the Palenque Mezcal Único in Tlacolula de Matamoros, Oaxaca, Mexico, traditional practices continue to be preserved. These were documented through direct observation of each stage of the process, unstructured interviews with the Master Mezcal Maker and the palenque staff, as well as audiovisual and photographic records of the activities. The process involved harvesting mature *Agave angustifolia* plants, cooking the hearts, milling, and distillation. At the same time, the main physicochemical parameters were monitored to understand the dynamics of the fermentation process. This characterization made it possible to identify the stages that significantly influence the production of artisanal mezcal and to gain in-depth knowledge that allows for the interpretation of the physicochemical and microbiological changes that occur during fermentation. Furthermore, this study serves as a framework for future research on artisanal mezcal and provides scientific evidence that supports traditional knowledge for all those who produce artisanal mezcal.

Keywords: Artisanal mezcal, *Agave angustifolia*, Master Mezcalero.

Master's Thesis in Science. Program of Agro-Food Science and Technology,
Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Jazmín Hernández Hernández

Advisor: Dr. Teodoro Espinosa Solares

4.2. Introducción

En México, la producción de bebidas tradicionales fermentadas y destiladas está relacionada con la cultura y las tradiciones de la región donde se elaboran (Cerero-Calvo et al., 2022). Estos procesos integran conocimientos ancestrales, prácticas artesanales y el aprovechamiento de los recursos propios de cada localidad. La elaboración del mezcal artesanal comprende un conjunto de etapas interdependientes en las que se producen transformaciones fisicoquímicas y microbiológicas que determinan las características del destilado. Cada una de estas etapas es dirigida por el “Maestro Mezcalero”, quien posee experiencia y conocimiento empírico, que le dan la capacidad de tomar decisiones que influirían en la calidad del producto final (Holguin-Loya et al., 2025).

A diferencia de los sistemas industrializados, la producción artesanal se distingue por el uso de métodos tradicionales y por la fermentación espontánea mediada por la microbiota del ambiente, como la del agave y la de los equipos usados, en la que participan comunidades microbianas nativas (Avila-Reyes et al., 2025).

En Tlacolula de Matamoros, Oaxaca, la producción del mezcal artesanal se caracteriza por el uso y la conservación de métodos tradicionales transmitidos a lo largo de las generaciones, mediante la combinación de conocimientos empíricos con las condiciones ambientales propias de cada estación del año.

Este capítulo tuvo como objetivo describir el proceso de producción del mezcal de perfil Amarás (Lote 212) en el Palenque Mezcal Único, ubicado en Tlacolula de Matamoros, Oaxaca, mediante la caracterización de las etapas operativas de la elaboración del mezcal y la medición de parámetros fisicoquímicos para comprender el comportamiento fermentativo.

4.3. Materiales y métodos

El estudio del proceso de producción de mezcal artesanal se realizó en el Palenque Mezcal Único, ubicado en Tlacolula de Matamoros, Oaxaca, México.

La información se obtuvo a través de la observación directa de las operaciones unitarias involucradas en la elaboración del mezcal, complementada con entrevistas no estructuradas a los Maestros Mezcaleros y al personal responsable de las diferentes etapas del proceso. Asimismo, se documentaron registros audiovisuales y fotográficos de las actividades desarrolladas durante la producción del lote evaluado (Rieger, 2025).

4.4. Resultados y discusión

4.4.1. Proceso de producción de mezcal artesanal

Fase de campo: Selección y cosecha del agave “el jimado”

El proceso de producción del mezcal inicia con la cosecha del agave espadín (*Agave angustifolia*) cuando se encuentra en su estado de maduración, proceso que normalmente dura entre seis y nueve años (Marquez-Lopez et al., 2022; Vera et al., 2009). Cuando las piñas de agave se encuentran en condiciones óptimas para la cosecha, un grupo de jimadores, señores que han adquirido la habilidad de llevar a cabo el proceso de jima, término que se refiere al proceso artesanal de retirar las largas pencas u hojas del agave utilizando una herramienta llamada coa, ilustrada en la **Figura 15**, en el que solo se deja el tallo con la base de las pencas. Este procedimiento permite retirar con mayor facilidad la piña del suelo y realizar el corte de la raíz de la planta. Estas piñas fueron adquiridas de la comunidad de Unión Juárez, Oaxaca, México (16°43'12"N, 95°59'38"O). Como se observa en la **Figura 16**, esta zona se ubica en el Valle Central de Oaxaca, que se caracteriza por sus tradiciones de raíces zapotecas, en las que el cultivo del agave representa una actividad clave para el sustento económico y el fortalecimiento productivo de la comunidad. Después, las piñas fueron transportadas en un camión volteo o volquete al palenque Mezcal Único, zona destinada a su procesamiento para obtener mezcal.



Figura 15. Jimado de la piña de agave mediante el uso de coa durante la etapa de cosecha.

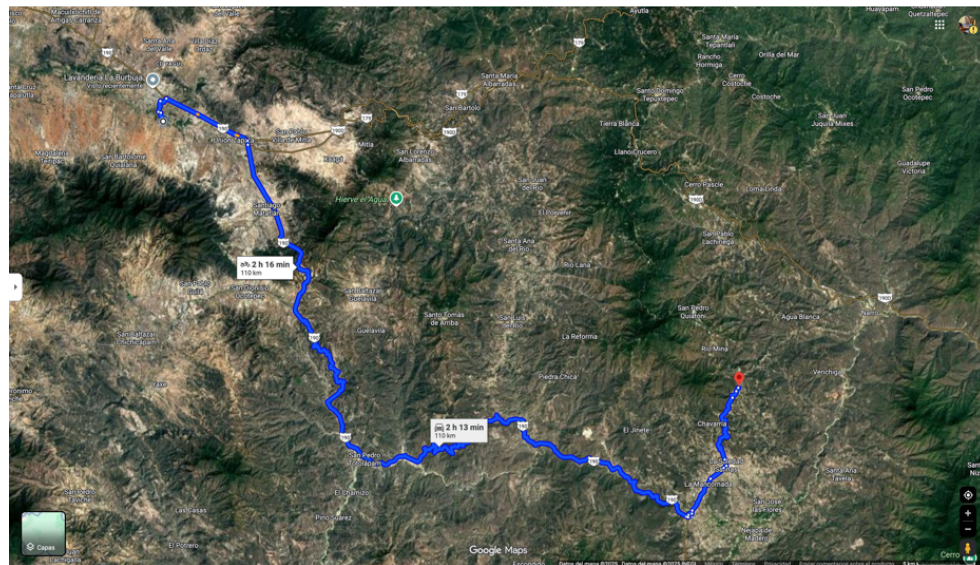


Figura 16. Ruta de traslado de las piñas de agave de La Unión a la destilería Mezcal Único.

Cocción de las piñas de agave

Debido al gran tamaño de las piñas de agave, estas se cortaron a la mitad o en cuatro trozos para facilitar su manejo y retirar el cogollo, que aporta un sabor amargo no deseado al mosto de agave. Las partes de la piña se ilustran en la **Figura 17**. El cogollo está compuesto principalmente por hemicelulosas (xilano)

y glucano, que, al degradarse por acción de la hidrólisis enzimática, producen furfural y grupos acetilo (Méndez-Ortíz et al., 2017). De manera similar, otros estudios han reportado que en el cogollo del agave la xilosa se encuentra en mayor concentración, seguida de la glucosa y arabinosa (Rios-Gonzalez et al., 2021). Durante esta etapa, un operador de rango capitán comenzó a colectar de manera aleatoria 25 pedazos de agave, integrados por penca y corazón, para su análisis en laboratorio correspondiente a la determinación de azúcares reductores totales (% ART) y sólidos solubles (°Brix).

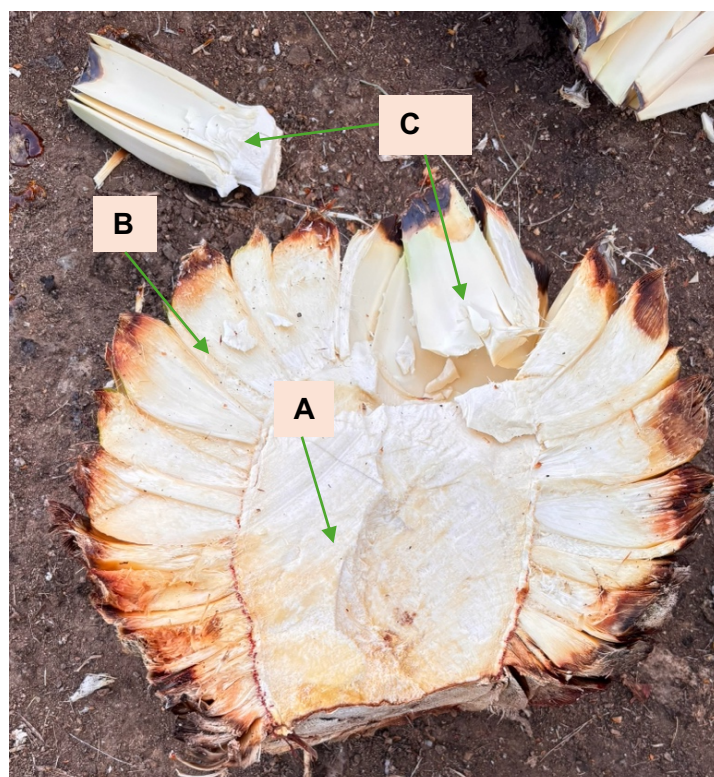


Figura 17. Partes de la piña de agave cruda: A) corazón, B) penca y C) cogollo.

Horno de cocción

El horno utilizado para la cocción de las piñas es de tipo bóveda, cuya estructura se ilustra en la **Figura 18**. En la parte superior o externa del horno presenta una forma cónica, sobre la cual se colocan piedras volcánicas de gran tamaño, seguidas de las medianas y, por último, de las pequeñas. Esta disposición escalonada de las rocas genera aberturas que permiten la circulación del calor y del vapor, lo que favorece una cocción más uniforme.



Figura 18. Horno de bóveda utilizado para cocer piñas de agave.

Este tipo de horno cuenta con una sección subterránea que funciona como cámara de combustión. Generalmente, se enciende con dos tipos de madera: pino y encino. El fuego se mantuvo durante cuatro horas, tiempo suficiente para que las piedras volcánicas alcanzaran la temperatura adecuada antes de introducir las piñas en el horno cónico. Posteriormente, el horno subterráneo se cerró con una puerta metálica, seguida de una puerta de madera, que se asegura con troncos para garantizar la estabilidad. El espacio entre la entrada del horno y la puerta se selló con tierra húmeda para conservar el calor y evitar la entrada de aire, ya que esta podría provocar la oxigenación de la madera, reavivar las llamas y ocasionar la carbonización del agave, lo que compromete su calidad.

Una vez que las piedras volcánicas adquirieron una coloración rojiza, señal de temperatura adecuada, se cubrieron con seis carretillas de bagazo gastado húmedo (previamente destilado). Sobre esta capa de bagazo se apilaron cuidadosamente las piñas para iniciar el proceso de cocción, ilustrado en la **Figura 19**. Las piñas ubicadas en los bordes del horno se acomodaron en forma de luna, técnica que permite evitar una altura excesiva de la carga y, al mismo

tiempo, facilita a los capitanes la toma de muestras de piñas cocidas. La peculiar disposición de las piñas se conoce localmente como “sacarle patita”.



Figura 19. Acomodo de las piñas en el horno de bóveda en forma de luna.

La **Figura 20** muestra el acomodo de las piñas en el horno. Posteriormente, este se cubrió con petates, lonas de plástico y una mezcla de tierra compuesta por arena y llojuela, que actúa como aislante térmico.



Figura 20. Tapado del horno con materiales (petates, lonas de plástico, tierra y llojuela) que favorecen la cocción de las piñas de agave.

Durante la cocción, el calor propicia dos reacciones químicas: la hidrólisis de los fructanos en monosacáridos y la degradación de estos en furfural y 5-hidroximetilfurfural (HMF) (Avila-Reyes et al., 2025). Estos compuestos influyen en el metabolismo de los microorganismos por la inhibición de enzimas que tienen actividad durante la fermentación ácido láctica o alcohólica (Paszkot et al., 2023).

Hidratación del horno

La hidratación del horno es una práctica para optimizar la cocción de las piñas de agave. Este procedimiento se realiza mediante la incorporación de agua al interior del horno, a través de una manguera introducida a pocos centímetros por debajo de la superficie del suelo, con el objetivo de incrementar la generación de vapor. La presencia de vapor previene la quema directa de las piñas de agave y favorece una transferencia de calor más homogénea durante el proceso de cocción. Asimismo, el ambiente húmedo y cálido favorece la hidrólisis térmica de los polisacáridos presentes en las piñas, en particular de los fructanos, lo que facilita su conversión en azúcares fermentables. Para conservar el calor y evitar la pérdida de vapor, las aberturas por donde este se escapa se sellan con tierra, tal como se muestra en la **Figura 21**, lo que permite mantener estables las condiciones térmicas dentro del horno durante el proceso de cocción.



Figura 21. Hidratación del horno de bóveda durante el segundo día de cocción.

Muestreo de piña cocida dentro del horno

El muestreo de las piñas de agave cocidas es un procedimiento cuyo objetivo es evaluar el grado de cocción en el horno, técnica ilustrada en la **Figura 22**. Se realiza mediante aberturas estratégicamente ubicadas en distintos puntos del horno, a través de las cuales se extraen fragmentos de pencas para observar sus características físicas. La evaluación se basa en la coloración, la textura y el aroma de las pencas, parámetros empíricos que permiten determinar el avance del proceso térmico.

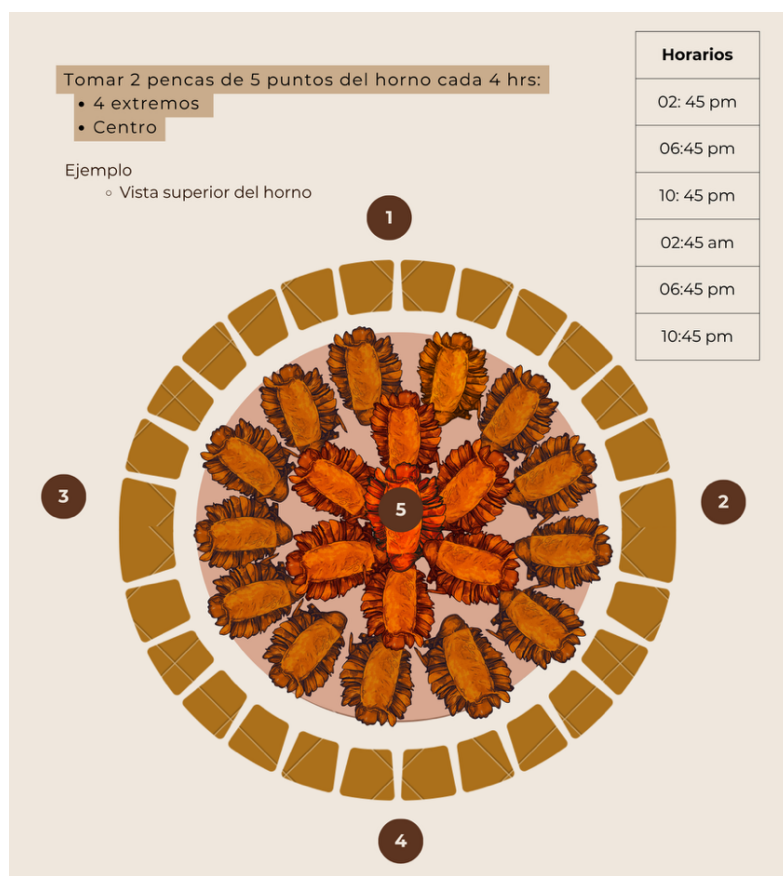


Figura 22. Procedimiento de muestreo de las piñas de agave cocidas en horno de bóveda.

La coloración de las pencas es uno de los indicadores del estado de cocción. El color amarillo claro indica que es necesario prolongar el tiempo de cocción y realizar una nueva hidratación del horno para favorecer la generación de vapor. Las pencas con un color café en los bordes y tonalidades amarillas en el centro, se mantienen en cocción por un periodo adicional corto. En cambio, un color café

uniforme en toda la penca indica que las piñas han alcanzado un grado óptimo de cocción y pueden retirarse del horno, como se observa en la **Figura 23B**.

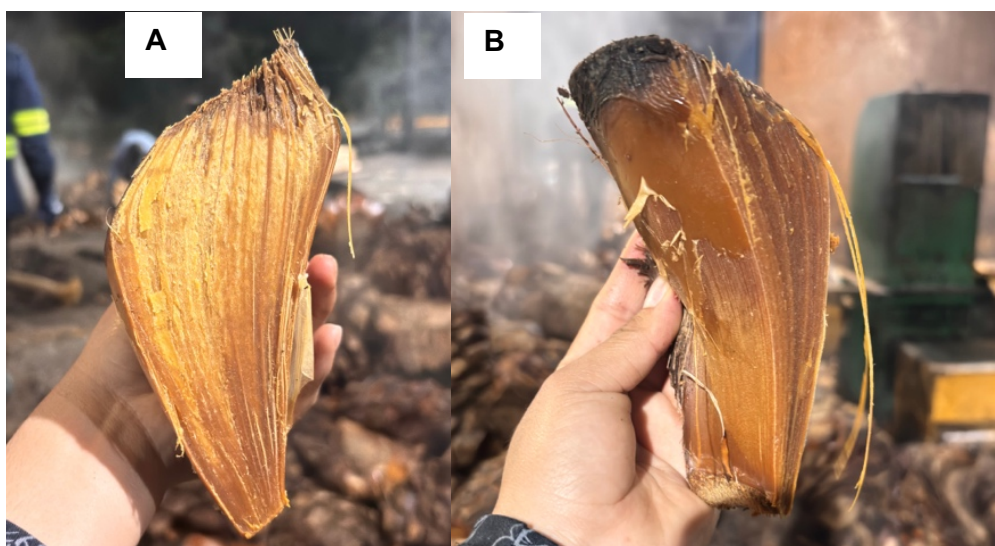


Figura 23. Grado de cocción de las piñas de agave: A) coloración amarilla, B) coloración café.

El proceso de cocción concluye con el destapado del horno tras un periodo de aproximadamente 24 horas, lo que permite que se produzcan las reacciones térmicas necesarias para la transformación de los carbohidratos estructurales. En la producción de mezcal artesanal, los tiempos de cocción se extienden de 48 a 120 horas (Espinoza-Martinez et al., 2023). La técnica empleada en el palenque Mezcal Único favorece una cocción uniforme, lo que contribuye a obtener un mosto con características adecuadas para la fermentación.

Destapado

El destapado del horno comenzó retirando la tierra de la parte superior hacia la inferior, con el propósito de evitar el desmoronamiento del material. Posteriormente, se retiran las lonas de polietileno (PE) y los petates de palma que cubren las piñas, tal como se aprecia en la **Figura 24**. Una vez descubiertas, las piñas se sacan del horno cónico con una carretilla para proceder a su pesado en una báscula de piso, donde se registra el peso neto. Una vez concluido, se retiró la cama de bagazo. En cuanto al horno subterráneo, se retiraron las compuertas para liberar el calor residual.

Para el análisis de azúcares reductores totales (% ART), azúcares reductores directos (% ARD) y % de hidrólisis de cocción de la piña, se muestrearon al azar las piñas cocidas, tomando 50 pedazos de pencas y 40 trozos del corazón.

Enseguida, las piñas cocidas se trasladaron al área de molienda, donde se emplearon dos equipos para fragmentar el tejido vegetal y facilitar la extracción de la pulpa.



Figura 24. Destapado del horno tras el tiempo de cocción establecido.

Extracción de azúcares: Molienda

Hebradora

La primera etapa del proceso de molienda consistió en introducir las piñas cocidas en una hebradora, ilustrada en la **Figura 25**. En este equipo, las fibras del agave se desmenuzaron en fragmentos más pequeños.



Figura 25. Primera molienda de piñas cocidas en hebradora de agave.

Tahona

En la **Figura 26** se observa que las fibras de agave previamente trituradas en la hebradora se colocaron en la tahona, donde fueron prensadas por una rueda de cantera impulsada por un motor mecánico. Durante cada molienda, alrededor de la tahona se vertieron bagazo y 60 L de agua para facilitar la extracción del jugo contenido en las fibras del agave. La trituración del agave permite la exposición de una mayor superficie de fibras, lo que favorece la lixiviación de los fructanos durante la adición de agua en las tinas de fermentación (Aldrete-Tapia et al., 2020).



Figura 26. Molienda de las fibras de agave mediante tahona de piedra de cantera, accionada por un motor.

El material molido, junto con los jugos, fue transferido a tinas de madera, donde se adicionaron sales nutritivas y 100 L de agua previamente filtrada del pozo. Finalmente, las tinas con mosto fueron trasladadas a la sala de fermentación para iniciar la fermentación espontánea.

Etapas de la fermentación

Día 1. Reposo

Las tinas con mosto de agave se mantuvieron en reposo en la sala de fermentación durante 24 horas para inducir la fermentación, presentada en la **Figura 27**. En esta etapa inicial se observó actividad fermentativa, evidenciada por el burbujeo en la superficie del mosto de agave. Este fenómeno corresponde a la liberación de dióxido de carbono (CO_2), producto del metabolismo de los microorganismos fermentativos, principalmente levaduras, que utilizan los azúcares presentes en el mosto como fuente de carbono, lo que genera efervescencia en el jugo. A partir de este día se tomaron muestras para los análisis del contenido alcohólico, de los sólidos solubles ($^{\circ}\text{Brix}$), de la temperatura, el jugo y el bagazo presentes en el mosto para análisis de azúcares reductores totales. Durante esta fase, se adicionó agua previamente filtrada a una temperatura cercana a 30°C , con el objetivo de incrementar el volumen del mosto, favorecer la obtención de una mayor cantidad de producto para su posterior destilación y ajustar la concentración de azúcares. Asimismo, la adición de agua contribuye a diluir posibles compuestos inhibidores y a reducir la presión osmótica del sistema, lo que favorece el desarrollo de la fermentación (Colon-Gonzalez et al., 2025).



Figura 27. Mosto de *Agave angustifolia* en reposo durante las primeras 25 horas de fermentación.

Día 2. Formulación

En esta etapa se formuló el mosto mediante la redistribución y compactación del bagazo en la tina, con el fin de conformar una capa superficial de masilla de agave que cubra las fibras sobresalientes del mosto, como se observa en la **Figura 28**. Adicionalmente, se dejó un hueco central para facilitar la toma de muestras durante el proceso fermentativo.

Una vez concluida la formulación, la masilla y el bagazo se separan ligeramente de las paredes de la tina de madera, dejando un espacio reducido entre el material fibroso y la superficie interna de la tina. En esta etapa, la masilla presenta una coloración café claro y el burbujeo del líquido superficial es constante, lo que indica una fermentación activa. La reacción de pardeamiento no enzimático se debe a los azúcares reductores y aminoácidos (Paszkot et al., 2023).



Figura 28. Formulación de las tinas de fermentación mediante la compactación del bagazo de *Agave angustifolia*.

Día 3. cinética

Durante esta fase, el mosto permaneció en fermentación activa y se observaron cambios físicos y sensoriales evidentes. La masilla superficial experimentó un

cambio progresivo de color, adquiriendo tonalidades más oscuras, generalmente marrones. El jugo del mosto presentó sensaciones características asociadas a la presencia de alcohol, como una sensación de frescor al contacto con la piel y un sabor predominantemente amargo.

La masilla utilizada como cobertura del bagazo se modificaba a medida que avanzaba la fermentación y actuaba como una superficie de interacción con el entorno. Sobre esta se posaron diversos vectores, como moscas del género *Drosophila melanogaster*, comúnmente conocidas como moscas de la fruta, así como otros insectos, lo que favoreció la interacción del mosto con los microorganismos del ambiente.

Destilación

Destrozo

La destilación del mosto de agave se realizó en alambiques de cobre, tradicionalmente empleados en la producción artesanal de mezcal. Este tipo de destiladores presenta alta resistencia a la corrosión y una elevada conductividad térmica, lo que permite una transferencia eficiente del calor, evita el sobrecalentamiento del fermento y favorece la separación del etanol y otros compuestos volátiles generados durante la fermentación. Como resultado, se obtiene una mayor concentración de compuestos aromáticos deseables en la bebida (Cruz et al., 2022).

En la producción artesanal, la primera destilación del mosto de agave se denomina *destrozo*. Esta etapa se realizó en alambiques de cobre y consistió en destilar directamente el mosto fermentado, sin separación de fracciones. En ciertos perfiles de mezcal, el proceso se caracteriza por no realizar el despunte, es decir, las fracciones iniciales (puntas) y el destilado principal (ordinario) se recolectan conjuntamente en una misma ánfora.

El mosto de agave se distribuyó entre dos alambiques, cuidando de que la cantidad de bagazo no excediera la capacidad del equipo, ilustrada en la **Figura**

29, ya que una sobrecarga puede provocar un aumento de la presión y el desprendimiento de la montera del alambique durante el calentamiento. Una vez que el mosto alcanzó aproximadamente la mitad de la capacidad del alambique, el horno se encendió utilizando brazuelo como combustible. El alambique se selló mediante la colocación de la montera de cobre, asegurando la unión con masilla en los bordes y utilizando prensas para evitar fugas de vapor.



Figura 29. Destilación del mosto fermentado de *Agave angustifolia* en alambiques de cobre.

Durante la destilación, el grado alcohólico del destilado se monitoreó mediante un densímetro de alcohol tipo Gay-Lussac (alcoholímetro). Las primeras fracciones del ordinario presentaron concentraciones elevadas de alcohol, que disminuyeron progresivamente a medida que avanzaba el proceso. Las lecturas de contenido alcohólico se corrigen en función de la temperatura del destilado mediante tablas alcoholimétricas, lo que permite establecer criterios de corte. El proceso de destilación se detiene cuando el grado alcohólico del ordinario

desciende a valores cercanos a 7–8.5 % de alcohol por volumen, rango que depende de la concentración inicial de etanol en el mosto fermentado y define el contenido alcohólico final del ordinario (Nolasco et al., 2022).

Una vez concluida la destilación, se retiró la montera del alambique para proceder a la eliminación de la vinaza, correspondiente a la fracción líquida no destilada, así como del bagazo agotado resultante del proceso.

En el proceso de destilación del mosto de agave, ocurren la degradación de algunos compuestos presentes y la formación de otros, debido a la concentración y transformación de compuestos aromáticos volátiles (Stanzer et al., 2023).

Refinado

El ordinario obtenido en la primera destilación se sometió a una segunda destilación, conocida como refinación, con el objetivo de concentrar el etanol y mejorar el perfil sensorial del mezcal. Para esta etapa, el ordinario se vertió en alambiques de cobre de distintas capacidades, adaptados a la infraestructura disponible en el palenque.

Durante la refinación, se descartaron las fracciones iniciales, conocidas como puntas, que presentaban altos grados alcohólicos y contenían compuestos volátiles no deseados. Posteriormente, se colectó el destilado principal, correspondiente al mezcal refinado. A lo largo del proceso se obtuvieron varias ánforas de destilado, cuyo número y volumen dependieron de la capacidad del alambique y de la duración de la destilación.

En las etapas iniciales de la refinación, el fuego del horno se mantuvo intenso para favorecer la liberación de los compuestos más volátiles. Conforme avanzaba la destilación, la intensidad del calor disminuyó al añadir agua sobre las brasas, lo que permitió que el destilado se condensara de forma más lenta y controlada. Esta regulación térmica favorece una mejor separación de compuestos y contribuye a la calidad final del mezcal.

4.5. Conclusiones

El proceso de producción de mezcal en el palenque Mezcal Único preserva prácticas artesanales y tradicionales desde la cosecha del agave hasta la destilación. La integración de estas operaciones influye en la obtención de un destilado con características particulares, que conserva el conocimiento tradicional y la identidad cultural de esta bebida mexicana.

El seguimiento del proceso permitió documentar cada una de las operaciones unitarias durante la elaboración del mezcal perfil Amarás, en la que se identificaron la cocción, la molienda, la fermentación y la destilación como etapas muy determinantes. De igual manera, la determinación de parámetros fisicoquímicos al comienzo del proceso permitió establecer una línea de compresión para la etapa fermentativa, evidenciando el consumo de azúcares fermentables en etanol.

La descripción integral de la producción artesanal permitió identificar los puntos clave en los que ocurren las reacciones químicas y microbiológicas, proporcionando el contexto necesario para realizar un análisis de la sucesión microbiana durante la fermentación.

El Palenque Mezcal Único mantiene la esencia artesanal, pero también muestra disposición para implementar nuevas tecnologías que optimicen la eficiencia de cada etapa productiva sin modificar el uso de prácticas tradicionales y permitidas por la NOM-070-SCFI-2016 que le permiten la distinción a este sistema de producción.

Finalmente, la documentación del proceso productivo constituye una base para el desarrollo de estrategias que favorezcan la eficiencia de la elaboración del mezcal, se minimicen pérdidas durante el proceso productivo para aprovechar de forma sustentable el agave; recurso de alto valor cultural, biológico y económico para la región mezcalera.

4.6. Literatura citada

- Aldrete-Tapia, J. A., Escalante-Minakata, P., Martinez-Peniche, R. A., Tamplin, M. L., & Hernandez-Iturriaga, M. (2020). Yeast and bacterial diversity, dynamics and fermentative kinetics during small-scale tequila spontaneous fermentation. *Food Microbiol*, 86, 103339. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103339>
- Avila-Reyes, S. V., Jimenez-Aparicio, A. R., Melgar-Lalanne, G., Fajardo-Espinoza, F. S., & Hernandez-Sanchez, H. (2025). Mezcal: A Review of Chemistry, Processing, and Potential Health Benefits. *Foods*, 14(8). <https://doi.org/10.3390/foods14081408>
- Cerero-Calvo, C., Sánchez-Medina, M. A., Pérez-Santiago, A. D., Matías-Pérez, D., & García-Montalvo, I. A. (2022). Probióticos presentes en bebidas fermentadas mexicanas. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 25. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.436>
- Colon-Gonzalez, M., Aguirre-Dugua, X., Guerrero-Osornio, M. G., Avelar-Rivas, J. A., DeLuna, A., Mancera, E., & Morales, L. (2025). Thriving in Adversity: Yeasts in the Agave Fermentation Environment. *Yeast*, 42(1-3), 16–30. <https://doi.org/10.1002/yea.3989>
- Cruz, C. L. V., López, M. D. M., Valencia, R. E., & Palma, J. C. (2022). Cambios en las propiedades fisicoquímicas del mezcal de Oaxaca, producidos por la destilación en cobre y acero inoxidable. *Revista del Centro de Graduados e Investigación en cobre y acero inoxidable*, 37, 14–20.
- Espinoza-Martinez, V. A., Alvarez-Gutierrez, P. E., Palma-Cruz, F. d. J., Enriquez-Valencia, R., Ramirez-Lopez, M. P., Lopez-Sanchez, C., & Vazquez-Lopez, H. G. (2023). Influence of the Biotechnological Process of Mezcal Fermentation on Yeast Diversity in Four palenques of Oaxaca, Mexico. *Beverages*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/beverages9040099>
- Holguin-Loya, A. H., Salazar-Herrera, A. E., Soto-Cruz, N. O., Kirchmayr, M. R., Lopes, C. A., Rojas-Contreras, J. A., & Paez-Lerma, J. B. (2025). Enhancing Mezcal Production Efficiency by Adding an Inoculant of Native *Saccharomyces cerevisiae* to a Standardized Fermentation Must. *Foods*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/foods14030341>
- Marquez-Lopez, R. E., Santiago-Garcia, P. A., & Lopez, M. G. (2022). Agave Fructans in Oaxaca's Emblematic Specimens: *Agave angustifolia* Haw. and *Agave potatorum* Zucc. *Plants (Basel)*, 11(14). <https://doi.org/10.3390/plants11141834>
- Méndez-Ortiz, O. H., Martínez-Morales, T. K., & González-Rios, L. L. (2017). Bioethanol production from Agave lechuguilla biomass pretreated by autohydrolysis. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16(2), 467–476.
- Nolasco, H. C., Martínez, D. J., Terán, F. R., & Urbina, J. A. S. (2022). Behavior of the volatile compounds regulated by the Mexican Official Standard

- NOM-070-2016 during the distillation of artisanal Mezcal. *Biotechnia*, 24, 20–27.
- Paszkoć, J., Gasinski, A., & Kawa-Rygielska, J. (2023). Evaluation of volatile compound profiles and sensory properties of dark and pale beers fermented by different strains of brewing yeast. *Sci Rep*, 13(1), 6725. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33246-4>
- Rieger, I. A. (2025). “Rewilding” the Mezcal Market: Cultural Practices and the Conservation of Agaves in Oaxaca, Mexico. *Wild*, 2(2). <https://doi.org/10.3390/wild2020020>
- Rios-Gonzalez, L. J., Medina-Morales, M. A., Rodriguez-De la Garza, J. A., Romero-Galarza, A., Medina, D. D., & Morales-Martinez, T. K. (2021). Comparison of dilute acid pretreatment of agave assisted by microwave versus ultrasound to enhance enzymatic hydrolysis. *Bioresour Technol*, 319, 124099. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124099>
- Stanzer, D., Hanousek Cica, K., Blesic, M., Smajic Murtic, M., Mrvcic, J., & Spaho, N. (2023). Alcoholic Fermentation as a Source of Congeners in Fruit Spirits. *Foods*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/foods12101951>
- Vera, A. M. G., Santiago, P. A. G., & López, M. G. (2009). Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de mezcal de Agave angustifolia y Agave potatorum. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 32, 273–279.

5. CONCLUSIONES GENERALES

La fermentación del mosto de *Agave angustifolia* para la producción de mezcal artesanal es un proceso microbiológico complejo, en el que la sucesión dinámica de bacterias y levaduras cambia continuamente a lo largo del proceso de fermentación. El uso de herramientas metagenómicas, como la técnica de shotgun, permitió identificar una diversidad taxonómica elevada y profunda, lo que permitió describir la estructura de las comunidades microbianas en cada tina de mosto analizada.

Las bacterias ácido lácticas constituyeron el grupo dominante durante la fermentación, destacándose especies con metabolismo asociado a la transformación de carbohidratos a alcoholes y otros metabolitos que pueden influir en el perfil químico del mezcal. La predominancia de las levaduras de *Saccharomyces* sugiere una alta presión de selección a lo largo del proceso de producción en las condiciones del palenque, lo cual podría estar asociado a las características sensoriales peculiares del mezcal.

Finalmente, esta investigación contribuye a ampliar el conocimiento sobre la microbiota asociada a la fermentación del mezcal elaborado con *Agave angustifolia*, aportando información que podría servir como base para futuras estrategias dirigidas al control microbiológico del proceso, la conservación de los consorcios microbianos nativos en cada zona productora de mezcal, así como la optimización de la calidad e inocuidad en la cadena de producción del mezcal artesanal, sin alterar las prácticas tradicionales que distinguen al mezcal artesanal de Oaxaca.

6. ANEXOS

Anexo 1. Relación de la cantidad de jugo de mosto de *Agave angustifolia* para el análisis de azúcares reductores totales.

Cuadro 8. Cantidad de sólidos solubles (°Brix) presentes en el jugo del mosto y volumen requerido en mL para el análisis de azúcares reductores.

Sólidos solubles (°Brix)	mL muestra
25-26	4
14-19	10
3-5	20
0-2	100

Relación obtenida del Manual del Laboratorio de Calidad, Palenque Mezcal Único, Tlacolula de Matamoros, Oaxaca, México.

Anexo 2. Las 10 bacterias más abundantes durante la fermentación del mosto de *Agave angustifolia* y sus funciones en procesos de fermentación

Cuadro 9. Especies bacterianas encontradas durante la fermentación del mosto de *Agave angustifolia*.

Especie	Tipo de bacteria	Funciones	¿Qué hace en el mezcal?	Fermentación	Sustrato	Enzima	Ruta metabólica	Productos	Presencia en bebidas	Atributo	Fuente
<i>Lentilactobacillus hilgardi</i>	BAL-mesofílica	Degrada putrescina, arginina, alanina, serina y ornitina, histidina, precursores del carbamato de etilo. Produce ácido láctico, acético	Fermenta glucosa para producir ácido láctico y acético, provocando la disminución del pH	Fermentación heteroláctica, maloláctica	Fructosa, glucosa, aminas biogénicas	Lactato deshidrogenasa (LDH), ácido fenólico descarboxilasa, manitol deshidrogenasa, glucosidasa, histidinol deshidrogenasa, citrato hidroximutasa e isocitrato: NAD+ oxidorreductasa, Tiol peroxidasa, citrato hidroximutasa e isocitrato	Metabolismo de carbohidratos, citrato, vía del piruvato vía de la agmatina desaminasa	Ácido acético, 1-2 propanodiol Etanolamina, histamina, putrescina	Vino	Aroma a humo	(Ferrero et al., 2021)
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Heterofermentativa facultativa mesofílica (10-40°C)	Produce alcohol isoamílico y acetato Reduce contenido de ácido acético Reduce el pH y aumenta el contenido de ácido láctico	Produce ácido láctico	Fermentación heteroláctica iniciador en fermentaciones	Lactosa, sucrosa	Decarboxilasa acetolactato, sintasa acetolactato	Vía Embden-Meyerhof-Parnas, glicolisis, vía fosfato pentosa, vía fosfocetolasa (síntesis de alcohol), Vía malato deshidrogenasa	Feniletanol, Ácido málico a piruvato, CO ₂	Soya, yogurt	(aroma floral)	(Harlé et al., 2025),

Cuadro 10. Especies bacterianas encontradas durante la fermentación del mosto de *Agave angustifolia* (continuación).

Especie	Tipo de bacteria	Funciones	¿Qué hace en el mezcal?	Fermentación	Sustrato	Enzima	Ruta metabólica	Productos	Presencia en bebidas	Atributo	Fuente
<i>Levillactobacillus brevis</i>	Bacteria Grampositiva	Eleva el contenido de terpenos, esteres	Participa en la acidificación, producción de ácido láctico, acético y compuestos volátiles Produce diacetilo	Fermentación heteroláctica	Arabinosa, glucosa, fructosa y trehalosa	Fosfocetolasas, aldolasas	Fosfato pentosa	Acetato, etanol, lactato	Vino	Notas florales, sésamo,	(du Toit et al., 2010; Vargas-Luna et al., 2025)
<i>Oenococcus oeni</i>	Bacteria Grampositiva, anaerobia facultativa	Reduce la acidez Contribuye al aroma y sabor Produce ácido láctico	Acidifica el medio Produce compuestos antimicrobianos	Heterofermentativa, maloláctica (produce diacetilo)	Fructosa, glucosa, trehalosa, ribosa, celobiosa, manosa y melibiosa	Malato descarboxilasa	Vía fosfocetolasa, vía pentosa fosfato, Fermentación maloláctica	Etanol, sulfitos, compuestos fenólicos, CO ₂	Vino	Nota mantecosa	(Borneman et al., 2012; Sternes & Borneman, 2016)
<i>Liquorilactobacillus nagelii</i> (<i>Lactobacillus</i>)	Bacteria Grampositiva, anaerobia facultativa	Acidifica el medio Produce compuestos antimicrobianos	Produce ácido láctico, acético y compuestos	Heterofermentativa	Glucosa, fructosa, manosa, manitol	Lactato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa	Vía fosfocetolasa	Ácido acético, CO ₂ , etanol, ácido láctico	Bebidas fermentadas: vino, shalgam, kéfir de agua		(Bechtner et al., 2022)
<i>Lentilactobacillus buchneri</i>		Puede convertir el ácido láctico en ácido acético Reduce el crecimiento de las levaduras	Transforma ácido láctico a 1,2 propanodiol	Heterofermentativa	Fructosa, glucosa, sacarosa, arabinosa	Fosfocetolasa, lactato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa	Vía fosfocetolasa	Ácido láctico a ácido acético, etanol y CO ₂	Ensilados, fermentación de vegetales	Nota a mantequilla (diacetilo)	(Zhao et al., 2026)

Cuadro 11. Especies bacterianas encontradas durante la fermentación del mosto de *Agave angustifolia* (continuación).

Especie	Tipo de bacteria	Funciones	¿Qué hace en el mezcal?	Fermentación	Sustrato	Enzima	Ruta metabólica	Productos	Presencia en bebidas	Atributo	Fuente
<i>Oenococcus oeni</i>	Grampositiva, anaerobia facultativa, BAL	Transforma ácidos orgánicos	Tolera etanol y pH ácido	Heterofermentativa, fermentación maloláctica	Glucosa, fructosa, ácido málico	Enzima maloláctica, enzimas glucolíticas	Vía fosfocetolasa	Ácido láctico, CO ₂ , etanol	Sidra, bebidas ácidas fermentadas	Alta tolerancia a pH bajo y etanol	(Cantarel et al., 2009)
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Grampositiva, anaerobia facultativa, BAL	Producción de ácido láctico	Productora de ácido láctico	Homofermentativa	Glucosa, lactosa	Lactato deshidrogenasa	Glucólisis (vía Embden Meyerhof)	Ácido láctico	Productos lácteos, vino y vegetales fermentados	Tolerante a pH bajo	(Bengoa et al., 2021)
<i>Secundilactobacillus paracollinoides</i>	Grampositiva, BAL	Ácido láctico	Acidificación del medio	Heterofermentativa	Glucosa, fructosa	Fosfocetolasa	Vía fosfocetolasa	Ácido láctico, CO ₂ , etanol	Fermentaciones vegetales		(Shimokawa & Suzuki, 2021)
<i>Schleiferilactobacillus harbinensis</i>	Grampositiva, BAL	Ácido láctico,	Producción de ácido láctico	Heterofermentativa	Azúcares simples	Fosfocetolasa	Vía heterofermentativa	Ácido láctico, CO ₂ , etanol		Tolerancia al estrés	(Liu et al., 2025)

6.1. Literatura citada

- Bechtner, J., Hassler, V., Wefers, D., Ehrmann, M., & Jakob, F. (2022). The C-Terminal Domain of *Liquorilactobacillus nagelii* Dextranase Mediates the Production of Larger Dextrans Compared to *Liquorilactobacillus hordei*. *Gels*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/gels8030171>
- Bengoa, A. A., Dardis, C., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2021). Health-Promoting Properties of *Lactobacillus paracasei*: A Focus on Kefir Isolates and Exopolysaccharide-Producing Strains. *Foods*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/foods10102239>
- Borneman, A. R., McCarthy, J. M., & Bartowsky, P. J. C. E. J. (2012). Comparative analysis of the *Oenococcus oeni* pan genome reveals genetic diversity in industrially-relevant pathways. *BMC Genomics*, 13.
- du Toit, M., Engelbrecht, L., Lerm, E., & Krieger-Weber, S. (2010). *Lactobacillus*: the Next Generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures—an Overview. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 876–906. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0448-8>
- Ferrero, F., Tabacco, E., & Borreani, G. (2021). *Lactobacillus hilgardii* Inoculum, Dry Matter Contents at Harvest and Length of Conservation Affect Fermentation Characteristics and Aerobic Stability of Corn Silage. *Front Microbiol*, 12, 675563. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.675563>
- Harlé, O., Parayre, S., Maillard, M. B., Henry, G., Guédon, É., Thierry, A., Niay, J., Deutsch, S. M., & Falentin, H. (2025). Fermentation of Soy Juice by *Lactiplantibacillus plantarum* CIRM-BIA777 Produces Flavor-Related and Health-Promoting Metabolites. *Food Frontiers*, 6(6), 3137–3153. <https://doi.org/10.1002/fft2.70118>
- Liu, G., Man, Y., Tian, H., Wu, L., Li, Q., Jiang, M., Dou, J., & Su, H. (2025). Isolation and characterization of *Schleiferilactobacillus harbinensis* GX0002947 from naturally fermented sour porridge and its application in cereal fermentation. *Front Microbiol*, 16, 1563733. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1563733>
- Oviedo-Hernandez, F., Bou-Deleris, M., Krieger-Weber, S., Claisse, F., Dereme, J., Le Marrec, C., & Claisse, O. (2025). A reassessment of the infra-species diversity patterns in the wine-associated *Oenococcus oeni*. *Front Microbiol*, 16, 1657712. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1657712>
- Shimokawa, M., & Suzuki, K. (2021). Preceding Subculture Conditions Affect Growth Characteristics of Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria in Quality Control Culture Media: Comparative Study on Hard-to-Culture and Culturable *Secundilactobacillus* (*Lactobacillus*) *paracollinoides* Strains. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 79(4), 340–346. <https://doi.org/10.1080/03610470.2021.1903785>

- Sternes, P. R., & Borneman, A. R. (2016). Consensus pan-genome assembly of the specialised wine bacterium *Oenococcus oeni*. *BMC Genomics*, 17, 308. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2604-7>
- Vargas-Luna, C., Ceppi de Lecco, C., Godoy, L., & Franco, W. (2025). Influences of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Levilactobacillus brevis* strain in simultaneous inoculation with *Saccharomyces cerevisiae* on the sensory and chemical profiles in chardonnay wine. *Food Res Int*, 214, 116639. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.116639>
- Zhao, M., Bao, J., Jiang, X., Liu, Y., Pan, D., Zhu, L., Yan, Y., Zhao, J., Wang, Z., & Ge, G. (2026). Integrated Microbiomics and Metabolomics Reveal That Moisture Content and *Lactiplantibacillus plantarum* Synergistically Regulate Fermentation Quality, Microbial Community, and Metabolite Profiles of Amaranth Silage. *Microorganisms*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms14061317>