



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

**DIVERSIDAD MICROBIANA EN LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL: UN ESTUDIO METAGENÓMICO**

TESIS DE MAESTRÍA

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA



Presenta:

ERIKA DANIELA REYES CARMONA

Bajo la supervisión de:

ARTEMIO PÉREZ LÓPEZ, DR.

ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA, DRA.



**Maestría en
Ciencia y Tecnología
Agroalimentaria**

Chapingo, Estado de México, noviembre de 2023

**DIVERSIDAD MICROBIANA EN LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL: UN ESTUDIO METAGENÓMICO**

Tesis realizada por la **ING. ERIKA DANIELA REYES CARMONA** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

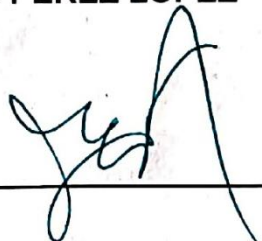
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

DIRECTOR:



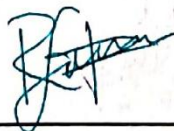
DR. ARTEMIO PÉREZ LÓPEZ

CODIRECTORA:



DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ASESORA:



DRA. ROSA ELVIRA SÁNCHEZ FERNÁNDEZ

Chapingo. Estado de México, noviembre de 2023

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	vi
AGRADECIMIENTOS.....	ix
DATOS BIOGRÁFICOS.....	xi
RESUMEN GENERAL	xii
GENERAL ABSTRACT	xiii
1 INTRODUCCIÓN GENERAL	14
2 REVISIÓN DE LITERATURA	17
2.1 El maguey mezcalero y el proceso de producción de mezcal	17
2.1.1 Los magueyes	17
2.2 Mezcal	19
2.2.1 Proceso de elaboración.....	20
2.2.2 Fermentación	27
2.2.3 Fermentación alcohólica	28
2.2.4 Fermentación espontánea.....	30
2.3 Metagenómica	31
2.4 Literatura citada	36

3	DETERMINACIÓN DEL PERFIL TAXONÓMICO MICROBIANO EN MOSTO DE ENSAMBLE PARA MEZCAL MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA TIPO <i>SHOTGUN</i>	40
3.1	Introducción	40
3.2	Materiales y métodos.....	42
3.2.1	Material experimental	42
3.2.2	Cuantificación de sólidos solubles.....	43
3.2.3	Obtención de la fracción microbiana para análisis metagenómico	43
3.2.4	Extracción del ADN	43
3.2.5	Evaluación de la concentración y la calidad del ADN.....	44
3.2.6	Técnica <i>Shotgun</i>	44
3.2.7	Análisis bioinformático.....	44
3.3	Resultados y Discusión.....	45
3.3.1	Sólidos solubles totales.....	45
3.3.2	Extracción de ADN metagenómico durante la fermentación del mosto y su secuenciación	46
3.3.3	Perfil taxonómico de la comunidad microbiana durante la fermentación del mosto para mezcal artesanal	47
3.4	Conclusiones	55

3.5	Agradecimientos	55
3.6	Literatura citada	56
4	Anexos	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfología del <i>Agave lyobaa</i> : A Roseta con base del pedúnculo de la inflorescencia; B Hoja; C Bráctea del pedúnculo; D Panícula; E Flor; F Flor disecada; G Fruto (García-Mendoza. et al., 2019).....	18
Figura 2. Proceso de elaboración de mezcal artesanal en Oaxaca	20
Figura 3. Selección de maguey para corte.....	21
Figura 4. Horneado de las piñas de maguey: Preparación del horno (Izquierda), Distribución de la materia prima para la cocción (Derecha).....	21
Figura 5. Seccionado de piñas cocidas de <i>A. karwinskii</i>	22
Figura 6. Molienda de maguey con desfibradora: Hebradora de agave (Izquierda), Llenado de la máquina (Centro), agave desfibrado (Derecha).	23
Figura 7. Fermentación de agave cocido y desfibrado: Tina de fermentación (Izquierda) y Fermentado de maguey jabalí (<i>A. convallis</i> Trelease) (Derecha). 24	
Figura 8. Equipo de destilación fabricado en cobre para elaborar mezcal artesanal.	25
Figura 9. Preparación del material para la destilación: Alambique de cobre con mosto y guarape (Izquierda), Colocación de montera en la olla de destilación empleando masa de maíz como agente de sellado (Derecha).	26
Figura 10. Verificación del “tamaño de la perla” con carrizo.	27

Figura 11. Diagrama esquemático de la conversión de glucosa en etanol durante la fermentación alcohólica por la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Nielsen, 2011; Carrascosa-Santiago et al., 2011).	28
Figura 12. Diversidad de microorganismos identificados durante los momentos T1 (agaves recién horneados y triturados), T2 (mosto fermentado entre 2-3 días) y T3 (mosto fermentado entre 5-6 días), empleando el programa MetaPhlAn. 48	
Figura 13. Diagrama de Venn de los microorganismos compartidos y únicos identificados durante los 3 tiempos del proceso de producción de mezcal artesanal evaluado.....	49
Figura 14. Abundancias relativas de las familias taxonómicas identificadas en mosto de maguey para elaborar mezcal artesanal: mosto fresco (T1), etapa inicial de la fermentación (T2) y etapa posterior de la fermentación (T3).	51
Figura 15. Abundancias relativas de los microorganismos identificados en el mosto fresco.	62
Figura 16. Abundancias relativas de los microorganismos identificados en mosto con 3 días de fermentación.....	63
Figura 17. Abundancias relativas de los microorganismos identificados en mosto con 6 días de fermentación.....	64

DEDICATORIA

A Dios, por cada día de mi existencia y permitirme seguir aquí.

A mi madre, María Jovita Carmona Cordero, por todo su amor y apoyo incondicional, por ser la mujer más valiente y fuerte que conozco, por enseñarme a levantarme en cada adversidad, a seguir mis sueños y no desistir.

A Juan Camilo Castro Parra, por mostrarme que con amor y confianza podemos lograr todo lo que nos propongamos; por traer a mi vida paz y seguridad; por acompañarme y apoyarme en cada momento y permitirme continuar a su lado.

A mis hermanos, Pablo, Hannia e Iván, por su cariño y apoyo, por mantenerse firmes ante las adversidades y velar por mi mamá para tenerla más tiempo con nosotros.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por su infinito amor, paciencia y misericordia; por motivarme, confortarme y permitirme llegar hasta aquí.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT), porque a través de la beca No. 1144055 pude llevar a cabo mis estudios de Maestría en Ciencia Agroalimentaria.

A la Universidad Autónoma Chapingo por ofrecerme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Al Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria y a la línea de Bioprocesos Agroalimentarios por otorgarme las herramientas necesarias para llevar a cabo el proyecto de investigación propuesto.

Al Dr. Artemio Pérez López, por su paciencia, sabiduría, confianza y la oportunidad de trabajar bajo su dirección durante la realización de este trabajo de investigación.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma, por la confianza para trabajar de manera conjunta, por sus valiosos aportes a mi formación como estudiante y su calidez para conmigo.

A la Dra. Rosa Elvira Sánchez Fernández, por sus valiosos aportes al trabajo de investigación, así como a mi enseñanza, por su buen ánimo y disposición siempre.

A la familia del Dr. Artemio por abrirnos las puertas de su hogar en Miahuatlán durante nuestro trabajo de campo. Don Filo, doña Zena, doña Rosa, Dra. Macri,

Mtro. Varela, doña Leo, muchas gracias por su calidez y atenciones, que Dios se los multiplique.

A nuestros amigos maestros mezcaleros, Don Ché, Don Jaime y Don Osvaldo, por compartirnos su sabiduría en la elaboración de este trabajo pues sin ellos no habría sido posible.

A las familias de nuestros maestros mezcaleros, Doña Chica, Monse, Wilby, Fati, Nando, Manuel, Doña Chayo, mi amiguita Yare, Abi, Osvaldo, y todas las personas bonitas de Oaxaca que conocí gracias a este proyecto, por su calidez, su apoyo, cariño y buen ánimo para con nosotros, muchas gracias.

Al Dr. Samir Samah y al laboratorio de Bio Genetix Lab S. de R.L. de C.V., por permitirme realizar parte de mi investigación con su orientación y recursos materiales.

A las Dras. Teresita de Jesús Ariza Ortega, Nallely Rosalba Román Cortés y Rocío Cruz Muñoz, por ser mi inspiración para iniciar mis estudios de posgrado, por su cariño y amistad que prevalecen a pesar de los años.

A mis queridos amigos Susy, Tona, Román, Yesenia, John, Andrea y Yessica por brindarme su apoyo y cariño incondicional siempre.

A todas las personas que conocí y fueron parte de esta travesía, ¡GRACIAS INFINITAS!

DATOS BIOGRÁFICOS

DATOS PERSONALES

Nombre: Erika Daniela Reyes Carmona

Fecha de Nacimiento: 21 de Julio de 1995

Lugar de Nacimiento: Chignahuapan, Puebla, México

CURP: RECE950721MPLYRR04

Profesión: Ingeniero en Industrias Alimentarias

Cédula Profesional: 11518627



DESARROLLO ACADÉMICO

Licenciatura: Instituto Tecnológico Superior de la Sierra Norte de Puebla (ITSSNP)

Bachillerato: Colegio de Estudios Científicos y Tecnológicos del Estado de Puebla (Plantel Chignahuapan)

RESUMEN GENERAL

DIVERSIDAD MICROBIANA EN LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL: UN ESTUDIO METAGENÓMICO¹

El mezcal es una bebida alcohólica destilada mexicana que se elabora a partir de cabezas de agave, plantas de la familia Agavaceae, en particular del género *Agave*. Durante la elaboración de mezcal artesanal, concurren una serie de factores ambientales que favorecen el crecimiento de microorganismos autóctonos, los cuales aportan al producto final características sensoriales únicas. En esta investigación se utilizó un enfoque de metagenoma completo para analizar la composición microbiana presente durante la fermentación de mosto obtenido de una mezcla compuesta por magueyes Bicuishe (*A. karwinskii* Zucc.), Madrecuishe (*A. karwinskii* Zucc.), Coyote (*A. americana* L.) y Pulquero (*A. salmiana* Otto ex Salm.). Se extrajeron 3 muestras correspondientes al mosto recién obtenido y con 3 y 6 días de fermentación, a las cuales se les realizó una extracción de ADN para su posterior secuenciación mediante la técnica *shotgun* e identificación taxonómica mediante análisis bioinformático. Se identificaron 66 especies diferentes pertenecientes a los géneros bacterianos *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Komagataeibacter*, *Oenococcus* y *Kocuria*, y al eucarionte *Saccharomyces*. Las especies más abundantes en el proceso fueron *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*

Palabras clave: Perfil taxonómico; mosto de maguey; mezcal; *shotgun*; bacterias ácido lácticas.

¹ Tesis de Maestría en Ciencia, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Erika Daniela Reyes Carmona

Directores de Tesis: Dr. Artemio Pérez López y Dra. Ernestina Valadez Moctezuma

GENERAL ABSTRACT

MICROBIAL DIVERSITY IN THE FERMENTATION OF ARTISANAL MEZCAL: A METAGENOMIC STUDY²

Mezcal is a Mexican distilled alcoholic beverage made from plants of the Agavaceae family, particularly, from the *Agave* genus. During the production of artisanal mezcal, a series of environmental factors favor the growth of indigenous microorganisms, which contribute unique sensory characteristics to the final product. This research used a whole metagenome approach to analyze the microbial composition present during the fermentation of agave juice obtained from a mix composed of Bicushe magueyes (*A. karwinskii* Zucc.), Madrecuishe (*A. karwinskii* Zucc.), Coyote (*A. americana* L.), and Pulquero maguey (*A. salmiana* Otto ex Salm.). Three samples were taken from fresh agave juice and agave juice fermented 3 and 6 days, DNA extraction was performed for sequencing using the *shotgun* technique and taxonomic identification with bioinformatic analysis. 66 different species were identified belonging to the bacterial genera *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Komagataeibacter*, *Oenococcus*, *Kocuria*, and the eukaryote *Saccharomyces*. The most abundant species in the process were *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Acetobacter malorum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, and *Lactobacillus casei*. The diversity of lactic acid bacteria (LAB) found in this study suggests that the fermentation developed similarly to that achieved by viticultural co-inoculation, which opens an important prospect for mezcal production with organoleptic qualities defined by a greater richness in aromatic compounds compared to those obtained from a single maguey species.

Keywords: Taxonomic profile; agave juice; mezcal; *shotgun*; lactic acid bacteria.

² Thesis of Master Science. Program of Agro-Food Science and Technology, Autonomous University of Chapingo.

Author: Erika Daniela Reyes Carmona

Thesis Directors: Dr. Artemio Pérez López and Dra. Ernestina Valadez Moctezuma

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

La palabra “mezcal” proviene del náhuatl “mexcalli” o “agave cocido”, y se denomina así a las bebidas alcohólicas destiladas obtenidas de los azúcares fermentados de los tallos cocidos de diversas especies del género *Agave*, comúnmente llamado “maguey”, que se consideran tradicionales y se producen en diversas áreas rurales de México (Aguierre-Dugua, 2013).

La norma oficial mexicana NOM-070-SCFI-2016 define al mezcal como una “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 maguey o agaves cocidos, cosechadas en el territorio cubierto por la Denominación de Origen Mezcal (DOM)”. Además, lo describe como “un líquido de aroma y sabor derivado de la especie de maguey o agave empleado, así como del proceso de elaboración; diversificando sus cualidades por el tipo de suelo, topografía, clima, agua, productor autorizado, maestro mezcalero, graduación alcohólica, microorganismos, entre otros factores que definen el carácter y las sensaciones organolépticas producidas por cada mezcal.”

En Oaxaca a las unidades de fermentación y destilación se les denomina “palenques”, y en general para la elaboración de mezcal se utilizan varias especies de *Agave*, tanto cultivadas como silvestres, dependiendo de la región del estado, dentro de las cuales destacan el *Agave angustifolia* (espadín), *A. karwinskii* (cirial o cuishe), *A. potatorum* (tobalá), *A. marmorata* (tepeztate), *A. rhodacantha* (mexicano), *A. convallis* (jabalí o javalín), *A. americana* (coyote), *A. salmiana* (pulquero), *A. cantala* (cincoañero) y *A. macrocantha* (mexicano o barril). Existen además otras especies que son empleadas para la obtención de ixtle (fibra de maguey), construcción y otros usos, incluso únicamente decorativos

(Sánchez-López, 2005). En ocasiones, se suele realizar una mezcla de algunas de estas especies para obtener un mosto homogéneo, cuyo resultado es un mezcal conocido como “ensamble”, el cual adquiere características de cada maguey empleado para su elaboración.

El proceso de producción consta de cinco pasos principales: retirada de las hojas, dejando el tallo y las bases de las hojas, conocidas como cabeza o piña; cocción de las piñas; extracción del mosto; fermentación (espontánea); destilación; y a veces la maduración (Lappe-Oliveras et al., 2008). El proceso bioquímico que determina las principales características sensoriales del mezcal se lleva a cabo durante la fermentación del jugo de agave, la cual dura varios días y se lleva a cabo de manera espontánea por diversos microorganismos en procesos de producción que difieren de una región a otra. La biodiversidad involucrada varía dependiendo de la especie de agave, las prácticas de producción y las condiciones climáticas regionales (Torres-Velázquez et al., 2022).

Dicha biodiversidad y su potencial metabólico se puede descifrar mediante un enfoque de metagenoma completo donde se obtiene ADN total para preparar bibliotecas completas de escopeta (*shotgun*) (Escobar-Zepeda, 2015). En este caso, el ADN se extrae de todas las células de una comunidad. Pero, en lugar de centrarse en un locus genómico específico para su ampliación, todo el ADN se corta posteriormente en pequeños fragmentos que se secuencian de forma independiente. De este modo se obtienen secuencias de ADN (es decir, lecturas) que se alinean con diversas localizaciones genómicas de los múltiples genomas presentes en la muestra, incluidos los no microbianos. Algunas de estas lecturas procederán de loci genómicos taxonómicamente informativos (por ejemplo, 16S), y otras de secuencias codificantes que proporcionan información sobre las funciones biológicas codificadas en el genoma. Como resultado, los datos metagenómicos ofrecen la oportunidad de explorar simultáneamente dos aspectos de una comunidad microbiana: ¿quién está ahí y qué es capaz de hacer? (Escobar-Zepeda, 2015; Hernández et al., 2019).

Considerando este contexto, el objetivo de esta investigación fue analizar la composición microbiana presente durante la fermentación de jugo de maguey en el proceso de producción de mezcal artesanal tipo ensamble, elaborado a partir de cuatro especies regionales, utilizando un enfoque de metagenoma completo (técnica *shotgun*).

En el presente documento se aborda con mayor detalle la problemática descrita, para lo cual, en el segundo capítulo se muestra la revisión de literatura para definir los conceptos necesarios para comprender el capítulo tres, en el cual se describe la metodología, resultados, discusiones y conclusiones derivados de este estudio.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El maguey mezcalero y el proceso de producción de mezcal

2.1.1 Los magueyes

Los magueyes constituyen parte de la familia Agavaceae, cuyo género más grande y diverso es *Agave* con 210 especies; México tiene 159, es decir, 75% del total, con 119 de ellas endémicas (García-Mendoza, 2012). La riqueza del género *Agave* en nuestro país se debe a que este linaje surgió hace unos 8 millones de años en los territorios del Altiplano Mexicano. Esta región natural se encuentra desde el centro del país hacia el norte, sus límites oriente y poniente son señalados por la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre Occidental (CONABIO, 2021).

En general, las plantas del género *Agave* son monocotiledóneas, morfológicamente se describen de la siguiente manera (Figura 1): plantas perennes, con hojas dispuestas en espiral, arregladas en roseta en el ápice de un tallo, suculentas, fibrosas, con la base dilatada y carnosa. La hoja por lo general termina en una espina que puede medir desde algunos milímetros hasta varios centímetros. La inflorescencia es paniculada; el pedúnculo floral tiene brácteas que se reducen en tamaño desde la base hasta el ápice (García-Mendoza, 2007). Las flores son bisexuales, tubulares, con ovario ínfero, poseen 6 tépalos de coloración verdoso-amarillento en muchas especies, aunque varían del blanquecino al rojo o al anaranjado; los estambres son 6, sobrepasan a los tépalos y se insertan en diferentes longitudes del tubo.

El fruto es una cápsula seca, trilobular, con semillas dispuestas en dos hileras por lóculo, negras, aplanadas y rodeadas por un ala corta en su parte distal. La reproducción es sexual o asexual mediante la generación de hijuelos estoloníferos en la base del tallo, intrafoliar o bien surgir en las inflorescencias; éstos son llamados bulbillos (García-Mendoza et al., 2017). La edad de los agaves es legendaria, aunque muy pocos trabajos abordan el tema; las especies grandes alcanzan su madurez entre los 10 y 25 años, mientras que las especies pequeñas lo hacen después de crecer entre cuatro y cinco años.

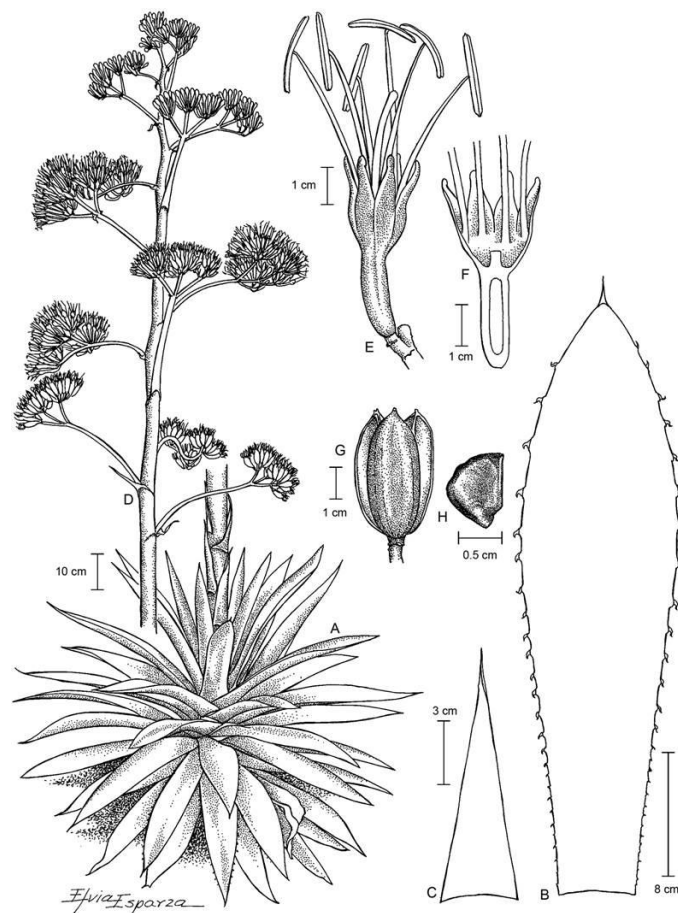


Figura 1. Morfología del *Agave lyobaa*: A Roseta con base del pedúnculo de la inflorescencia; B Hoja; C Bráctea del pedúnculo; D Panícula; E Flor; F Flor disecada; G Fruto (García-Mendoza. et al., 2019).

2.2 Mezcal

La palabra “mezcal” proviene del náhuatl “mexcalli” o “agave cocido”, y se denomina así a las bebidas alcohólicas destiladas obtenidas de los azúcares fermentados de los tallos cocidos de diversas especies del género *Agave*, comúnmente llamado “maguey”, que se consideran tradicionales y se producen en diversas áreas rurales de México (Aguierre-Dugua, 2013).

La norma oficial mexicana NOM-070-SCFI-2016 define al mezcal como una “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 maguey o agaves cocidos, cosechadas en el territorio cubierto por la Denominación de Origen Mezcal (DOM)”. Además, lo describe como “un líquido de aroma y sabor derivado de la especie de maguey o agave empleado, así como del proceso de elaboración; diversificando sus cualidades por el tipo de suelo, topografía, clima, agua, productor autorizado, maestro mezcalero, graduación alcohólica, microorganismos, entre otros factores que definen el carácter y las sensaciones organolépticas producidas por cada Mezcal.”.

El mezcal se produce en aproximadamente el 25% del territorio nacional, siendo 9 los estados protegidos bajo la DOM, dentro de los que se incluyen alrededor de 1000 municipios, en los que la materia prima, las plantas de agave, crecen principalmente en estado silvestre. La Denominación de Origen Mezcal es la más grande del mundo en lo que a bebidas espirituosas se refiere (Martínez et al., 2019). Los estados que comprende la DOM son Oaxaca, Guerrero, Zacatecas, Durango, San Luis Potosí, Guanajuato, Tamaulipas, Michoacán y Puebla. Oaxaca tiene la mayor producción de mezcal, con el 91.31% de la producción de mezcal nacional referido al 45% Alc. Vol. (COMERCAM, 2023).

2.2.1 Proceso de elaboración

En Oaxaca a las unidades de fermentación y destilación se les denomina “palenques”, y en general para la elaboración de mezcal se utilizan varias especies de *Agave*, tanto cultivadas como silvestres, dependiendo de la región del estado, dentro de las cuales destacan el *Agave angustifolia* (espadín), *A. karwinskii* (cirial o cuishe), *A. potatorum* (tobalá), *A. marmorata* (tepeztate), *A. rhodacantha* (mexicano), *A. convallis* (jabalí o javalín), *A. americana* (coyote), *A. salmiana* (pulquero), *A. cantala* (cincoañero) y *A. macrocantha* (mexicano o barril). Existen además otras especies que son empleadas para la obtención de ixtle (fibra de maguey), construcción y otros usos, incluso únicamente decorativos (Sánchez-López, 2005). El proceso de elaboración específico depende de la localidad de Oaxaca donde se realice, pero en general en los palenques se lleva a cabo la producción de mezcal bajo el siguiente esquema (Figura 2):



Figura 2. Proceso de elaboración de mezcal artesanal en Oaxaca

A continuación, se describen las operaciones mencionadas en el esquema:

1. Selección y corte del maguey. El proceso comienza con la selección de la materia prima (Figura 3), donde se identifican plantas cuyas características indican un estado de madurez óptimo (Martínez et al., 2019).



Figura 3. Selección de maguey para corte.

Una vez seleccionado el agave, se realiza el afeitado (corte de las hojas y extracción de la piña), este paso tiene el propósito de eliminar aquellos órganos vegetales que no son útiles para su procesamiento, como son las hojas o pencas (Blomberg, 2001). La extracción del maguey se realiza desde la base y no desde la raíz, con la finalidad de no recolectar partes que puedan proveerle sabores desagradables a esta bebida (Martínez et al., 2019).

2. Cocción de piñas. En Oaxaca, los hornos más comunes son los cónicos de tierra o piedra, dentro de ellos se depositan las piñas del maguey cubiertas con pencas o bagazo, piedras y, posteriormente, con petates, mantas o lonas rematadas con tierra que permitirán mantener el calor para lograr la cocción del agave (Figura 4).



Figura 4. Horneado de las piñas de maguey: Preparación del horno (Izquierda), Distribución de la materia prima para la cocción (Derecha).

Este proceso tiene una duración aproximada de una semana y depende de diversos factores como la capacidad del horno de cocción, el tipo de maguey que

se ha colocado, el clima, el tipo de piedra empleado, entre otros. En esta etapa los polisacáridos, principalmente los polisacáridos de reserva (fructanos) se hidrolizan hasta obtener un jarabe rico en fructosa (Blomberg, 2001; Molina-Guerrero et al., 2007). La madera que se emplea para iniciar el fuego en el horno generalmente proviene de árboles como el encino, el guamúchil o el mezquite.

3. Seccionado de piñas cocidas. Para facilitar la operación siguiente en ocasiones resulta importante realizar un seccionado previo del material cocido, separando el cogollo y los trozos de pencas de la parte central de la piña, de manera manual para el caso de los magueyes más suaves, como *A. angustifolia*, y para los más duros, como *A. karwinskii*, se emplean machetes para cortar la base leñosa del maguey (Figura 5).



Figura 5. Seccionado de piñas cocidas de *A. karwinskii*.

4. Molienda. Para que los azúcares hidrolizados dentro de los tallos de agave cocidos estén disponibles para microorganismos durante la fermentación, deben molerse o triturarse. Las formas más tradicionales de lograrlo son cortando y triturando las piezas de agave con mazos de madera o pasando una gran piedra de molino con fuerza animal (molino chileno) sobre las pencas cocidas (Durán-García et al., 2007). Cada estilo de molienda genera un rendimiento diferente, mientras que los mazos de madera generan entre 100 y 150 kg•h⁻¹, el molino de cuchillas y el molino chileno pueden moler hasta 1,000 kg•h⁻¹ (Kirchmayr et al., 2014). Otra diferencia entre los equipos es su capacidad para desmenuzar, o



Figura 6. Molienda de maguey con desfibradora: Hebradora de agave (Izquierda), Llenado de la máquina (Centro), agave desfibrado (Derecha).

moler, el maguey cocido. Mientras que con el uso de mazos suelen obtenerse trozos menos homogéneos de material, con el uso de molino chileno o molino de cuchillas se asegura una mayor uniformidad y tamaño más pequeño de las fibras (Figura 6). La generación de fragmentos grandes disminuye el rendimiento de fermentación, por lo que garantizar una molienda homogénea con un alto grado de desfibración conduce a un mejor aprovechamiento de los azúcares disponibles durante la fermentación y, por ende, a un mejor rendimiento del producto final (Duran-Garcia et al., 2007).

5. Fermentación. La fermentación es un paso crucial durante la producción de mezcal donde interviene una microbiota compleja y variable (Kirchmayr et al., 2017). Aunque, idealmente, el procedimiento debiera conducirse en oquedades en piedra, suelo o tronco, piletas de mampostería, recipientes de madera o barro e incluso en pieles de animal, en la actualidad es común encontrar tinacos “Rotoplas” u otros polímeros plásticos (Figura 7).

En los recipientes de fermentación se colocan las fibras y jugo obtenidos durante la molienda, las cuales se dejan por varias horas o un par de días, antes de agregar suficiente agua para cubrir las fibras, esta acción depende totalmente de la experiencia del palenquero. El contenido de la tina en la que se lleva a cabo el proceso se monitorea cada día en diferentes momentos hasta llegar a la fase final de la fermentación, la cual se considera que ha terminado cuando disminuye la

cantidad de espuma visible en la superficie (DOF, 2016; Arellano-Plaza et al., 2022; Zamora, 2021).



Figura 7. Fermentación de agave cocido y desfibrado: Tina de fermentación (Izquierda) y Fermentado de maguey jabalí (*A. convallis* Trelease) (Derecha).

Por lo general, los productores calculan la cantidad de agave utilizada para producir un litro de mezcal. Dependiendo de la especie de agave y su madurez, se considera que hasta el 25% de su peso corresponde a azúcares (fructanos antes y fructosa/glucosa después de cocinar) (García-Mendoza et al., 2017) y teóricamente sería posible obtener 1 litro de mezcal (50% Alc. Vol.) con 4 kg de agave. La realidad, sin embargo, está muy lejos de eso. Las eficiencias son normalmente entre 10 y 20 kg de agave por 1 litro de mezcal, pero a veces pueden elevar hasta 25-35 kg de agave (Arellano-Plaza, 2022). La mayoría de las fermentaciones se llevan a cabo como procesos espontáneos, permitiendo el crecimiento de la microbiota nativa. Durante la etapa de fermentación del mezcal normalmente no se utilizan levaduras comerciales. El agave cocido contiene inhibidores de levadura como hidroximetilfurfural (HMF), furfural y saponinas, y las levaduras comerciales no pueden crecer (García-Soto et al., 2011; Alcázar et al., 2017). La levadura silvestre se adapta produciendo mejores comportamientos de fermentación. Sin embargo, la biodiversidad debe conservarse para garantizar las propiedades nativas en cada proceso de la región mezcalera y evitar las levaduras comerciales (Arellano-Plaza, 2022).

6. Destilación. Es el método empleado para separar y concentrar los componentes químicos y sensoriales producidos durante las etapas del proceso previas, desde el cocimiento hasta la fermentación, aprovechando para ello las distintas propiedades fisicoquímicas y termodinámicas de estos, como son la volatilidad, el punto de ebullición, la presión vapor, la solubilidad, la polaridad, entre otras (Kirchmayr et al., 2014). El equipo donde se lleva a cabo este procedimiento se compone de una olla de cobre; una montera, que consiste en un cilindro dentro del cual se encuentra una tapa que se ajusta a la boca de la olla, así, cuando la temperatura interna comienza a subir, se coloca agua en la cavidad que posee para condensar los vapores que se elevan del mosto en la olla; dichos gases se colectan en un tubo alargado de cobre llamado turbante que desemboca en la última parte del equipo de destilación denominado serpentín, el cual va sumergido en un tanque de agua para fungir como condensador (Figura 8).



Figura 8. Equipo de destilación fabricado en cobre para elaborar mezcal artesanal.

En la producción de mezcal, se llevan a cabo dos pasos para conducir la destilación (Figura 9), el primero se lleva a cabo comúnmente vertiendo tanto el mosto de agave como las fibras en el alambique (guarape y bagazo, respectivamente), obteniendo un aumento de ~5 veces en el contenido de alcohol en el destilado con respecto al contenido de alcohol en el mosto (entre 20 y 30% Alc. Vol.) (Martínez et al., 2019).



Figura 9. Preparación del material para la destilación: Alambique de cobre con mosto y guarape (Izquierda), Colocación de montera en la olla de destilación empleando masa de maíz como agente de sellado (Derecha).

El segundo paso se logra destilando nuevamente el líquido obtenido logrando un aumento de 2-3 veces en la concentración de alcohol (entre 50 y 60 % Alc. Vol.). Las ollasijas se calientan frecuentemente con madera, donde la cantidad y el tipo de madera definen la velocidad del aumento de temperatura. Para obtener un producto que cumpla con las especificaciones de la NOM-070-SCFI-2016, las puntas (primer producto del destilado cuya concentración va desde 74 hasta 78 % Alc. Vol.) y las colas (destilado remanente cuyo porcentaje de alcohol es inferior al 15 %) se retiran durante la segunda destilación. Antes de obtener el producto final con la composición deseable se realiza una rectificación del destilado calculando el grado alcohólico mediante la verificación del “tamaño de la perla”, es decir, vertiéndolo a cierta altura con una pipeta de carrizo a un recipiente y observando el tamaño y tiempo de permanencia de las burbujas que se forman (Figura 10) (Nolasco-Cancino et al., 2022).

La importancia de la destilación sobre las propiedades organolépticas del mezcal viene dada por la formación de componentes, por lo que son los principales agentes responsables del aroma en el producto final (Gómez-Zamora et al., 2016).



Figura 10. Verificación del “tamaño de la perla” con carrizo.

2.2.2 Fermentación

La fermentación es uno de los métodos más antiguos y económicos utilizados en la conservación de alimentos; se puede describir como un proceso deseable de modificación bioquímica de productos alimenticios primarios (Aloys et al., 2009). Durante este proceso bioquímico, las materias primas se fermentan bajo condiciones específicas para crear productos atractivos y deseables, enriquecidos con sabor, aroma y textura mejorados, vida útil prolongada y fortificados con compuestos bioactivos que promueven la salud, además de desintoxicar y destruir sustancias indeseables o microorganismos presentes en los alimentos crudos (Figura 10) (Narzary et al., 2016; Farhad et al., 2010; Escobar-Zepeda et al., 2020). Se utiliza como técnica para la conservación de alimentos, aplicándose a una amplia gama de alimentos como leche, carne, pescado, cereales, frutas, verduras, legumbres, raíces/tubérculos, bebidas alcohólicas y bebidas no alcohólicas (Pérez-Armendáriz et al., 2020). Se estima que hay aproximadamente 3500 alimentos fermentados y bebidas en todo el mundo (Tamang et al., 2017).

La fermentación es un proceso anaeróbico de glucólisis que produce ácido pirúvico sin oxígeno. Se sabe que tres tipos diferentes de procesos de fermentación tienen lugar en la producción de bebidas, a saber, fermentación alcohólica, ácido láctico y acética. La fermentación alcohólica resulta en la

producción de etanol por levadura (como en el vino y la cerveza). La fermentación del ácido láctico (homofermentativa o heterofermentativa) se lleva a cabo principalmente por bacterias productoras de ácido láctico (BAL). Bajo exceso de aireación, las bacterias del ácido acético (BAA, principalmente *Acetobacter* spp.) convierten el alcohol en ácido acético en presencia de oxígeno (Tortora et al., 2010; Liburdi et al., 2020).

2.2.3 Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es una vía metabólica que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono (Figura 11). La conversión se representa mediante la ecuación:

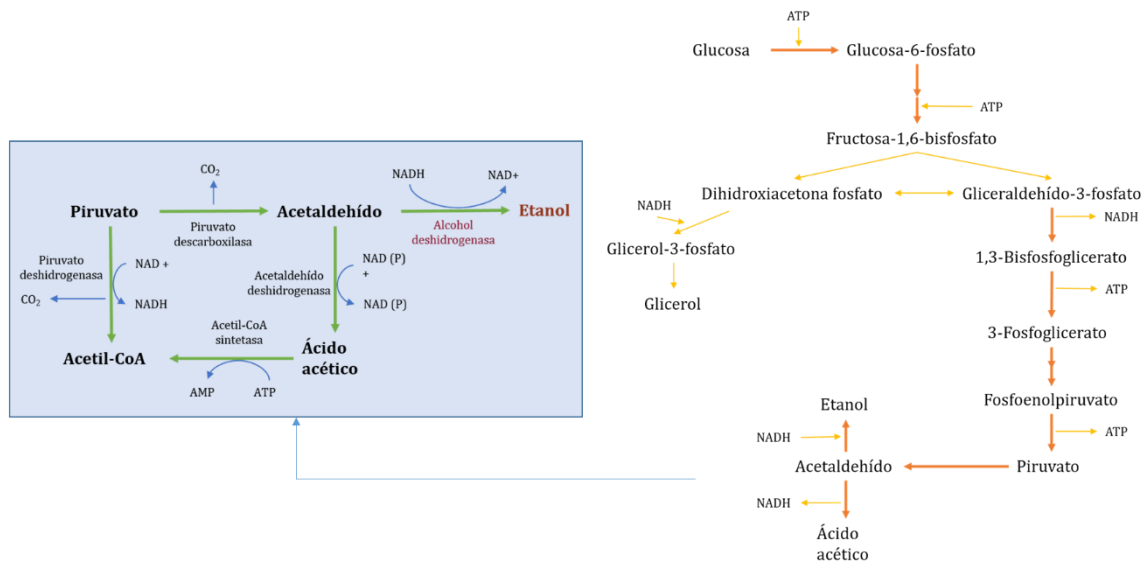
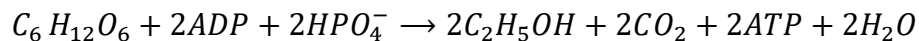


Figura 11. Diagrama esquemático de la conversión de glucosa en etanol durante la fermentación alcohólica por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Nielsen, 2011; Carrascosa-Santiago et al., 2011).

A pesar de parecer, a nivel estequiométrico, una transformación simple, la secuencia de transformaciones para degradar la glucosa hasta dos moléculas de alcohol y dos moléculas de dióxido de carbono es un proceso muy complejo, pues al mismo tiempo la levadura utiliza la glucosa y nutrientes adicionales para

reproducirse. Para evaluar esta transformación, se usa el rendimiento biomasa/producto y el rendimiento producto/ substrato (Carrascosa-Santiago et al., 2011; Walker y Walker, 2018):

1. Rendimiento biomasa/substrato ($Y_{x/s}$): es la cantidad de levadura producida por cantidad de substrato consumido.
2. Rendimiento substrato/producto ($Y_{s/p}$): es la cantidad de producto sintetizado por cantidad de substrato consumido.

El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO₂ por 1 g de glucosa. Este valor fue cuantificado por Gay Lussac. En la realidad es difícil obtener este rendimiento, porque como se señaló anteriormente, la levadura utiliza la glucosa para la producción de otros metabolitos. El rendimiento experimental varía entre 90% y 95% del teórico, es decir, de 0.469 a 0.485 g/g. Otro parámetro importante es la productividad (g/h/L), la cual se define como la cantidad de etanol producido por unidad de tiempo y de volumen (Carrascosa-Santiago et al., 2011; Walker y Walker, 2018).

Las levaduras tienen un papel importante en la fermentación de numerosos productos alimenticios. *Saccharomyces cerevisiae*, es la levadura más empleada a nivel agroindustrial pues se reconoce con frecuencia como levadura de cerveza o de panadería, ya que algunos de sus productos asociados son cerveza, vino y productos horneados (Farid et al., 2019). En los últimos años, las levaduras con aptitud fermentativa, pertenecientes a especies no-*Saccharomyces* están siendo estudiadas en investigación aplicada, evidenciando el importante papel en la fermentación de bebidas alcohólicas, como el vino, bajo ciertas condiciones controladas. De hecho, las interacciones microbianas entre cepas seleccionadas de levaduras *S. cerevisiae* y no *Saccharomyces* pueden dar efectos positivos a la fermentación alcohólica (Ciani et al., 2020).

2.2.4 Fermentación espontánea

La fermentación puede realizarse por comunidad microbiana natural o espontánea, por retroceso, en el que se utiliza una pequeña cantidad del fermentado anterior como inóculo para la siguiente etapa de fermentación, o mediante la adición de cultivos iniciadores. Mediante la fermentación espontánea, la materia prima y su tratamiento inicial favorecerán el crecimiento de una microbiota autóctona (Liburdi et al., 2020).

En la mayoría de las fermentaciones espontáneas tiene lugar una sucesión microbiana: muy a menudo BAL dominarán inicialmente seguido de varias especies de levaduras. Los hongos filamentosos solo crecen aeróbicamente, lo que limita su aparición en ciertos tipos de productos fermentados (Mahlomaholo, 2017; Romano et al., 2006). Las bacterias y levaduras del ácido láctico son predominantes en los productos lácteos fermentados, cereales y alimentos y bebidas fermentadas vegetales. Además, BAA juegan un papel fundamental en la producción de algunos de estos productos. En general, las BAL producen ácido láctico y otras sustancias antimicrobianas que inhiben el crecimiento de bacterias dañinas junto con la reducción del contenido de azúcar, prolongando así la vida útil del producto, las levaduras producen principalmente componentes aromáticos y alcoholes. Cuando los hongos filamentosos están involucrados en la fermentación, generalmente contribuyen al producir enzimas proteolíticas y lipolíticas intra y extracelulares que influyen en gran medida en el sabor y la textura del producto (Tamang et al., 2009). Las bebidas fermentadas (FB) son los centros de consorcios de microbiota y micobiota (contaminantes funcionales, no funcionales y patógenos), que pueden estar presentes como microbiota indígena natural en sustratos vegetales o animales crudos, utensilios, recipientes, ollas de barro o ambientes, o como resultado de la adición intencional de los microorganismos como cultivos iniciadores en un proceso industrial de fermentación de alimentos (Liburdi et al., 2020).

Para aumentar la complejidad del aroma y prevenir el deterioro de bebidas y licores, se han estudiado varias estrategias de inoculación, dos de las cuales son

la co-inoculación de levaduras y bacterias al comienzo de la fermentación (Azzolini et al. 2010) y la inoculación secuencial no-*Saccharomyces*/*S. cerevisiae* o levaduras/bacterias ácido-lácticas (BAL) (Bely et al. 2008; Izquierdo et al. 2014). Cualquiera que sea la estrategia de inoculación, las levaduras y las bacterias constituyen una comunidad microbiana en el proceso de fermentación. De hecho, estas comunidades son complejas, debido a los factores biológicos, químicos y físicos que afectan la dinámica y el metabolismo de la población (Little et al. 2008). Como se describió anteriormente, el proceso de fermentación no es el resultado de un solo microorganismo. Para tener productos de alta calidad, a menudo se requiere la presencia de varias especies y/o cepas. La fermentación controlada multistarter con *S. cerevisiae* es la modalidad más rentable para utilizar estas levaduras de vino no convencionales seleccionadas. Se pueden perseguir varios objetivos con el uso de cultivos mixtos controlados con levaduras no convencionales: (i) mejora de la complejidad del sabor y el aroma; ii) características distintivas; iii) reducción de etanol; y (iv) control de la microflora de deterioro (Ciani et al., 2020).

2.3 Metagenómica

A finales de la década de 1970, Carl Woese propuso el uso de genes de ARN ribosómico como marcadores moleculares para la clasificación de la vida. Esta idea junto con el método de secuenciación automatizada de Sanger (Sanger et al., 1977) revolucionó el estudio y la clasificación de microorganismos (Escobar-Zepeda, 2015). A comienzos del siglo XXI surgen nuevos métodos de secuenciación, basados en la pirosecuenciación y las denominadas plataformas de *Next Generation Sequencing* (NGS). Hoy en día, es más apropiado hablar de *High-Throughput Sequencing* (HTS) o secuenciación masiva, porque han surgido nuevas generaciones de secuenciadores que aplican otras tecnologías de secuenciación en paralelo (Hernández et al., 2019). De acuerdo con el objetivo de la investigación, se pueden encontrar dos enfoques metagenómicos para el estudio de la microbiota en la muestra objeto de análisis:

Métodos selectivos. Estos métodos se basan en la focalización y amplificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos, que luego se secuencian. Este paso de amplificación reduce la complejidad del análisis, pero introduce algunos sesgos y limitaciones que deben entenderse antes de interpretar los datos. Las fuentes de sesgo son principalmente la preparación y el procesamiento de la muestra, incluida la elección de la región de amplificación, la reacción de amplificación (concentración de la plantilla, el contenido de GC de la plantilla y la estructura secundaria, la falta de coincidencia del cebador y los errores de polimerasa), el número de copias del gen objetivo por célula, las lecturas quiméricas y los errores de secuenciación de metacódigos de barras. Entre otras características, este tipo de aproximación presenta las siguientes ventajas y desventajas (Billington et al., 2022):

Ventajas	Desventajas
El objetivo puede ser específico de un grupo microbiano concreto (por ejemplo, ARNr 16S común para bacterias e ITS para hongos) independientemente de la prevalencia en una comunidad; bueno para comunidades microbianas con gran diversidad.	Sólo los genomas dominantes están bien representados.
La variedad de herramientas y bases de datos existentes permite realizar clasificaciones taxonómicas con relativa facilidad.	Es menos sensible para la detección de patógenos que la secuenciación de metacódigos de barras.
Se pueden comparar los cambios en la abundancia relativa para evaluar el impacto de diferentes	No distingue de forma fiable entre organismos vivos y muertos.
	Se infieren vínculos entre regiones genómicas (contigs).
	Se descarta una elevada proporción de secuencias taxonómicamente poco informativas.

muestras o tratamientos en los microbiomas.

Cuando la profundidad de secuenciación es suficiente, se pueden identificar taxones poco abundantes o raros.

Menor coste que la secuenciación shotgun.

No es necesario reconstruir todo el genoma.

El ensamblaje automatizado de genomas puede ser problemático.

El coste puede ser prohibitivo en función de la profundidad de secuenciación requerida, el tipo de muestra y los microbios de interés.

Pueden generarse grandes volúmenes de datos que requieran herramientas informáticas de alto rendimiento para su análisis y almacenamiento.

Se requieren conocimientos bioinformáticos y científicos de moderados a altos.

Métodos no selectivos. Después de descifrar la diversidad microbiana de un metagenoma, sería muy conveniente comprender su potencial metabólico. Esto se puede lograr mediante el uso de un enfoque de metagenoma completo donde se obtiene ADN total para preparar bibliotecas completas de pequeños fragmentos obtenidos aleatoriamente con *shotgun* (tiro de escopeta) (Escobar-Zepeda, 2015).

En este caso, el ADN se extrae de nuevo de todas las células de una comunidad. Pero, en lugar de centrarse en un locus genómico específico para su ampliación, todo el ADN se corta posteriormente en pequeños fragmentos que se secuencian de forma independiente. De este modo se obtienen secuencias de ADN (es decir, lecturas) que se alinean con diversas localizaciones genómicas de los múltiples genomas presentes en la muestra, incluidos los no microbianos. Algunas de

estas lecturas procederán de loci genómicos taxonómicamente informativos (por ejemplo, 16S), y otras de secuencias codificantes que proporcionan información sobre las funciones biológicas codificadas en el genoma. Como resultado, los datos metagenómicos ofrecen la oportunidad de explorar simultáneamente dos aspectos de una comunidad microbiana: ¿quién está ahí y qué es capaz de hacer? (Escobar-Zepeda, 2015).

El ensamblaje no reconstruye genomas completos, por lo que es necesario agrupar fragmentos del genoma. Por lo tanto, el ensamblaje es el proceso de combinar lecturas de secuencia en fragmentos contiguos de ADN llamados contigs, basados en la similitud de secuencia entre lecturas. Luego, la presencia de lecturas pareadas en dos componentes diferentes se vinculará en una secuencia de ADN no contigua más grande llamada scaffold. El objetivo de WGS es representar cada secuencia genómica en un scaffold, aunque esto no siempre es posible (Moreno-Indias et al., 2020).

Un estudio típico de metagenómica de escopeta comprende cinco pasos, después del diseño inicial del estudio: (i) la recolección, procesamiento y secuenciación de las muestras; ii) preprocesamiento de las lecturas de secuenciación; iii) análisis de secuencias para perfilar las características taxonómicas, funcionales y genómicas del microbioma; (iv) análisis estadísticos y biológicos de posprocesamiento y (v) validación.

La secuenciación de este tipo posee ciertas características que le dan cierta ventaja y, en su caso, desventaja, respecto a otros métodos de secuenciación, las cuales se enuncian a continuación (Billington et al., 2022):

Ventajas

Se secuencia todo el ADN genómico de la muestra.

Bueno para comunidades con pocas especies dominantes y baja diversidad.

No hay sesgo de amplificación, a diferencia de la secuenciación de metabarcodificación.

Se pueden inferir marcadores genéticos filogenéticos a partir del conjunto de datos.

Posibilidad de ensamblar los genomas de los tipos dominantes.

Puede identificar nuevos tipos de microbios.

Desventajas

Sólo los genomas dominantes están bien representados.

No distingue de forma fiable entre organismos vivos y muertos.

Se descarta una elevada proporción de secuencias taxonómicamente poco informativas.

El ensamblaje automatizado de genomas puede ser problemático.

El coste puede ser prohibitivo en función de la profundidad de secuenciación requerida, el tipo de muestra y los microbios de interés.

Generan grandes volúmenes de datos que requieren mayor capacidad para su análisis.

2.4 Literatura citada

- Aguierre-Dugua, X., Eguiarte, L.E. (2013) Genetic diversity, conservation and sustainable use of wild *Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal production in Mexico. *J. Arid Environ.* 90, 36–44.
- Alcázar, M., Kind, T., Gschaedler, A., Silveria, M., Arrizon, J., Fiehn, O., et al. (2017). Effect of steroidal saponins from *Agave* on the polysaccharide cell wall composition of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *LWT Food Sci. Technol.* 77, 430. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.048>
- Aloys, N., Angeline, N. (2009). Traditional fermented foods and beverages in Burundi, *Food Res. Int.* 42 (5-6) 588-594.
- Arellano-Plaza M., Paez-Lerma, J.B., Soto-Cruz, N.O., Kirchmayr, M.R. y Gschaedler-Mathis, A. (2022). Mezcal Production in Mexico: Between Tradition and Commercial Exploitation. *Front. Sustain. Food Syst.* 6:832532. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.832532>
- Azzolini M, Tosi E, Vagnoli P, Krieger S, Zapparoli G (2010) Evaluation of technological effects of yeast-bacterial co-inoculation in red table wine production. *Ital J Food Sci* 22:257–263
- Bely M, Stoeckle P, Masneuf-Pomarède I, Dubourdieu D (2008) Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int J Food Microbiol* 122:312– 320. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.023>
- Craig Billington, Joanne M. Kingsbury y Lucia Rivas (2022). Metagenomics Approaches for Improving Food Safety: A Review, *Journal of Food Protection*, Vol. 85 (3), 448-464. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-301>
- Carrascosa-Santiago, A. V., Muñoz. R y González, R. (2011). *Molecular wine microbiology*. Londres: Elsevier.
- Ciani, M., Canonico, L., Oro, L., & Comitini, F. (2020). Footprint of Nonconventional Yeasts and Their Contribution in Alcoholic Fermentations. *Biotechnological Progress and Beverage Consumption*, 435–465. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816678-9.00014-x>
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (2021). Magueyes. Consultado el 23 de febrero de 2023 de <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/magueyes>
- Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM) (2023). Informe estadístico. Disponible en https://comercam-dom.org.mx/wp-content/uploads/2023/05/INFORME-2023_PUBLICO.pdf
- Diario Oficial de la Federación (DOF) (2016). Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. México: Secretaria de Comercio y Fomento Industrial.

- Duran-Garcia, H. M., González-Galvan, E. J., and Matadamas-Ortiz, P. (2007). Mechanization process in the production of mezcal. *J. Food Agric. Environ.* 5, 32–35. <https://doi.org/10.1234/4.2007.1034>
- Escobar-Zepeda, A., Montor, J., Olvera, C., Sanchez-Flores, A., & Lopez-Munguia, A. (2020). An Extended Taxonomic Profile and Metabolic Potential Analysis of Pulque Microbial Community Using Metagenomics. *Journal of Food Science and Technology*, 5, 83–97. <https://doi.org/10.25177/JFST.5.2.RA.10637>.
- Escobar-Zepeda, A., Vera-Ponce de León, A. y Sanchez-Flores, A. (2015) The Road to Metagenomics: From Microbiology to DNA Sequencing Technologies and Bioinformatics. *Front. Genet.* 6:348. <https://doi.org/10.25177/JFST.5.2.RA.10637>
- Farid, F., Sideeq, O., Khan, F., & Niaz, K. (2019). *Saccharomyces cerevisiae*. Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements, 501–508. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812491-8.00066-7>
- García-Mendoza A. J. (2007). Los agaves de México. *Ciencias*, Jul-Sep, No. 87 Universidad Nacional Autónoma de México: Distrito Federal, México pp. 14-23.
- García-Mendoza, A. (2012). México, país de magueyes. La Jornada, 53. Suplemento La Jornada del campo. Consultado el 23 de febrero de 2023 de <http://www.jornada.unam.mx/2012/02/18/cam-pais.html>
- García-Mendoza, A. J., Cházaro-Basañez, M. J., Nieto-Sotelo, J., Sánchez-Teyer, L. F., Tapia-Campos, E., Gómez-Leyva, J. F. (2017). “Agave,” en Panorama del Aprovechamiento de los Agaves en México, Ed. A. Gschaedler (Guadalajara: CONACYT, CIATEJ, Agared), 15–68.
- García-Mendoza, A. J., Franco-Martínez, I. S. y Sandoval-Gutiérrez D. (2019) Cuatro especies nuevas de *Agave* (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México. *Acta Botánica Mexicana* 126: e1461. <https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1461>
- Garcia-Soto, M. J., Jiménez-Islas, H., Navarrete-Bolaños, J. L., Rico-Martinez, R., Miranda-López, R., and Botello-Álvarez, J. E. (2011). Kinetic study of the thermal hydrolysis of *Agave salmiana* for mezcal production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 7333–7340. <https://doi.org/10.1021/jf200026y>
- Gómez-Zamora O., De Jesús-Fuentes Kl., Peñafiel-López F., & Tovar-Hernández P. (2016). Perfil químico y organoléptico de los compuestos volátiles del mezcal. *Investigación y Desarrollo En Ciencia*, 1(1), 916–923. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/1/10/158.pdf>
- Hernández, M., Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., & Eiros, J. M. (2019). Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. *Revista Argentina de Microbiología*. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.003>

- Izquierdo, P., Romero, E., Pérez-Martín, F., Seseña, S., Palop, M. (2014). Sequential inoculation versus co-inoculation in Cabernet Franc wine fermentation. *Food Sci Technol Int* 21:203–212. <https://doi.org/10.1177/1082013214524585>
- Jackson, R. S. (2020). Fermentation. *Wine Science*, 461–572. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816118-0.00007-6>
- Kirchmayr, M., Arellano-Plaza, M., Estarrón-Espinoza, M., Gallardo-Valdez, J., Gschaedler Mathis, A., López Ramírez, J., et al. (2014). Manual para la estandarización de los procesos de producción del mezcal guerrerense. Disponible en <https://centroconacyt.mx/wp-content/uploads/2015/04/manualmezcalguerrerense.pdf>
- Kirchmayr, M. R., Segura-García, L. E., Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., de la Rosa, M., and 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 Sci. Technol.* 79, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.052>
- Liburdi, K., Bernini, R., & Esti, M. (2020). Fermented beverages: geographical distribution and bioactive compounds with health benefits. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, 131–151. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64301-8.00006-8>
- Little AEF, Robinson CJ, Peterson SB, Rafa KF, Handelsman J. (2008). Rules of engagement: interspecies interactions that regulate microbial communities. *Ann Rev Microbiol* 62:375–401. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.030608.101423>
- Mahlomaholo, B.J. (2017). Microbial succession in indigenous fermented cereal beverages of Lesotho (PhD diss.), University of Free State, South Africa,
- Martínez, S., Nuñez-Guerrero, M., Gurrola-Reyes, J. N., Rutiaga-Quiñones, Paredes-Ortíz, A., Soto, O. N., Rodríguez-Herrera, R. (2019). Mescal an alcoholic beverage from *Agave* spp. with great commercial potential. *alcoholic beverages*, 113–140. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815269-0.00004-0>
- Molina-Guerrero, J.A., Botello-Álvarez, J.E., Estrada-Baltazar, A., Navarrete-Bolaños, J.L., Jiménez-Islas, H., Cárdenas-Manríquez, M., Rico-Martínez, R., 2007. Compuestos volátiles en el mezcal. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 6 (001), 41–50.
- Moreno-Indias, I., & Tinahones, F. J. (2020). Metagenomics. Principles of Nutrigenetics and Nutrigenomics, 81–87. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804572-5.00011-2>
- Narzary, Y., Brahma, J., Brahma, C., & Das, S. (2016). A Study on Indigenous Fermented Foods and Beverages of Kokrajhar, Assam, India. *Journal of Ethnic Foods*, 3(4), 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.jef.2016.11.010>

- Nielsen, J., Villadsen, J., Lidén, G. (2011). *Bioreaction engineering principles*. New York: Plenum Publishers.
- Nolasco-Cancino, H., Jarquín-Martínez, D., Ruiz-Terán, F., & Santiago-Urbina, J. A. (2022). Behavior of the volatile compounds regulated by the Mexican Official Standard NOM-070-SCFI-2016 during the distillation of artisanal Mezcal. *Biotecnia*, 24(2), 20–27. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v24i2.1577>
- Pérez-Armendáriz, B., & Cardoso-Ugarte, G. A. (2020). Traditional Fermented Beverages in Mexico: Biotechnological, Nutritional, and Functional Approaches. *Food Research International*, 136, 109307. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109307>.
- Romano, P., Capece, A., Jespersen, L., (2006). Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeasts, *Yeasts in Food and Beverages*, Springer, pp. 13-53.
- Sánchez-López, A. (2005). Oaxaca tierra de maguey y mezcal. Reporte de proyecto del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología “*Plan de desarrollo de la agroindustria del Agave en Oaxaca*”. Centro de Graduados del Instituto Tecnológico de Oaxaca, Comercializadora Oaxaqueña del Centro, Oaxaca, México.
- Tamang, J.P. & Fleet, G.H. (2009). Yeasts diversity in fermented foods and beverages, *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, Springer pp. 169-198.
- Tamang, J. P., Holzapfel, W. H., Shin, D. H., & Felis, G. E. (2017). Editorial: Microbiology of Ethnic Fermented Foods and Alcoholic Beverages of the World. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1377. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01377>.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2010). *Microbial Mechanisms of Pathogenicity*. En G. J. Tortora, B. R. Funke, & C. L. Case (Eds.), *Microbiology: An Introduction*: Pearson.
- Walker, G.M., Walker, R.S.K., 2018. *Enhancing yeast alcoholic fermentations*, en: Gadd, G., Sariaslani, S. (Eds.), *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier Ltd, pp. 87-129.
- Zamora, R. (2021) El mezcal de Villa Sola de Vega, Oaxaca: Proceso de producción, comercialización y economía moral (Tesis de maestría). El Colegio de San Luis, San Luis Potosí. Disponible en <https://colsan.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1013/958/1/EI%20mezcal%20de%20Villa%20Sola%20de%20Vega.pdf>

3 DETERMINACIÓN DEL PERFIL TAXONÓMICO MICROBIANO EN MOSTO DE ENSAMBLE PARA MEZCAL MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA TIPO *SHOTGUN*

3.1 Introducción

El mezcal es una bebida destilada tradicional mexicana producida a partir de los jugos fermentados del corazón (piña) de la planta de agave (maguey) cocida (Escalante-Minakata et al., 2008). El mezcal se produce a partir de varias especies en el territorio que están protegidas por la Denominación de Origen Mezcal (DOM), y en diferentes regiones del país reconocidas por la DOM (NOM-070-SCFI-2016, 2017). El proceso de elaboración consta de cinco pasos principales: retirada de las hojas, dejando el tallo y las bases de las hojas, conocidas como cabeza o piña; cocción de las piñas; extracción del mosto; fermentación (espontánea); destilación; y a veces la maduración (Lappe-Oliveras et al., 2008). El proceso bioquímico que determina las principales características sensoriales del mezcal se lleva a cabo durante la fermentación del jugo de agave, la cual dura varios días y se lleva a cabo de manera espontánea por diversos microorganismos en procesos de producción que difieren de una región a otra. La biodiversidad involucrada varía dependiendo de la especie de agave, las prácticas de producción y las condiciones climáticas regionales (Torres-Velázquez et al., 2022).

Anteriormente, se han realizado investigaciones sobre la diversidad microbiana presente en el proceso de producción del mezcal, teniendo algunas variaciones,

principalmente, en la metodología de obtención de ADN, así como el sustrato empleado para ello, y en el método de identificación aplicado y la profundidad de este. Los pioneros en realizar este tipo de análisis, sobre el mezcal en particular, fueron Escalante-Minakata et al. (2008) en su estudio del proceso de fermentación de *Agave salmiana* (maguey pulquero), en San Luis Potosí, mediante el análisis filogenético de secuencias de ADNr 16S e ITS de inóculo para producción de mezcal, cultivado bajo condiciones de laboratorio, identificaron 12 especies, 8 de las cuales correspondieron a bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Weissella* y *Zymomonas*. En su estudio sobre las bacterias presentes en la fermentación de agave del estado de Tamaulipas, Narváez-Zapata et al. (2010), encontraron la abundancia de los géneros *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella* y *Bacillus*. Así mismo, Verdugo Valdez et al. (2011), detectaron una gran biodiversidad de microorganismos de tipo eucarionte (levaduras) en una fermentación de *A. salmiana* de San Luis Potosí, donde destacó el género por excelencia en fermentaciones de este tipo, *Saccharomyces*, pero al mismo tiempo se encontró la presencia de levaduras no-*Saccharomyces* de los géneros *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Torulaspora* y *Candida*. En otro estudio, desarrollado por Páez-Lerma et al. (2013), en el que analizaron el proceso de fermentación de mezcal en Durango, encontraron géneros similares en sus muestras. Posteriormente, los autores Kirchmayr et al. (2017), combinando la aplicación de técnicas tradicionales (dependientes de cultivo) y moleculares detectaron 21 especies de levaduras y 27 especies de bacterias en el proceso de fermentación de *A. angustifolia* (maguey espadín) de Oaxaca, siendo los primeros en reportar tal cantidad de microorganismos, en comparación con estudios anteriores en otras regiones. Los principales géneros identificados por los autores fueron *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces*, *Torulaspora* y *Pichia*, además de *Saccharomyces*, en el caso de los eucariontes, y *Lactobacillus*, *Zymomonas* y bacterias ácido-acéticas, para el caso de los procariontes. En un estudio más reciente, Hernández-delgado et al. (2021), realizaron aislamientos de bacterias con potencial probiótico encontradas en mosto de mezcal del estado de Oaxaca, dentro de las cuales se

identificaron especies de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Enterococcus*. Chacón-Vargas et al. (2020), reportaron que, durante el proceso de fermentación de pulque, una bebida fermentada derivada del aguamiel obtenido de magueyes, conducido en laboratorio, se identificaron 16 géneros principales que incluyeron 35 especies distribuidas a lo largo del proceso, principalmente bacterias de los géneros *Acinetobacter*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Zymomonas* y *Lactobacillus*. El propósito de este estudio fue determinar la composición microbiana presente durante la fermentación de jugo de maguey en el proceso de producción de mezcal artesanal tipo ensamble, elaborado a partir de cuatro especies regionales, utilizando un enfoque de metagenoma completo (*Shotgun*).

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Material experimental

Se recolectaron muestras de mosto de ensamble elaborado a partir de cuatro especies de magueyes silvestres: Bicuishe (*A. karwinskii* Zucc., 35 %), Madrecuishe (*A. karwinskii* Zucc., 35 %), Coyote (*A. americana* L., 10 %) y Pulquero (*A. salmiana* Otto ex Salm., 20 %); en un palenque de mezcal artesanal perteneciente a la asociación de productores “Tres magueyes”, localizado en el municipio de San Luis Amatlán (16°23'00"N 96°30'00"O), México.

Las muestras se obtuvieron durante tres etapas fermentativas de acuerdo con la metodología descrita por Narváez-Zapata et al. (2010), correspondientes a jugo de agaves recién horneados y triturados (T1), mosto fermentado durante 3 días (T2) y 6 días (T3). Se recuperaron 200 mL de mosto por lapso en frascos de vidrio previamente esterilizados, que se transportaron en hielo al laboratorio de biología molecular de la Universidad Autónoma Chapingo donde las muestras fueron fraccionadas, etiquetadas y almacenadas a -8 °C hasta su uso en análisis moleculares. Los procesos de fermentación se realizaron por fermentación espontánea.

3.2.2 Cuantificación de sólidos solubles

La concentración de sólidos solubles expresada por 100 gramos de fase líquida se cuantificó a temperatura ambiente utilizando un refractómetro HI96801 (HANNA®, HANNA® instruments, EUA). Las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en ° Brix.

3.2.3 Obtención de la fracción microbiana para análisis metagenómico

Se centrifugaron 40 mL de mosto de maguey en una centrifuga IEC CL31 Multispeed (Thermo Fisher, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA), a 10 000 rpm por 30 min a temperatura ambiente (TA) para descartar partículas residuales de fibra de maguey. El sobrenadante se separó por decantación obteniendo una pastilla semisólida al final del tubo, la cual se disolvió en 50 mL de solución amortiguadora TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) y se almacenó a -8 °C hasta su uso.

3.2.4 Extracción del ADN

La extracción del ADN de las muestras se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de investigación genética Bio Genetix Lab S. de R.L. de C.V. (Estado de México, México). Se colocó 1 mL de cada una de las muestras en viales por triplicado, los cuales se centrifugaron en una microcentrífuga Mikro 20 (Hettich, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Alemania) a 13 000 rpm durante 20 min para continuar con la extracción del ADN a través del protocolo comercial ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit (Zymo, Zymo Research, EUA), siguiendo el procedimiento descrito por el proveedor con algunas modificaciones en las fases de reposo de limpieza para asegurar una mejor extracción (Zymo Research, 2022). El ADN extraído se conservó a -20 °C hasta su uso.

3.2.5 Evaluación de la concentración y la calidad del ADN.

Para llevar a cabo la cuantificación de ADN, se empleó un espectrofotómetro nanodrop UVS-99 (ACTGene, ACTGene Inc., EUA) donde se colocaron 2 µL de muestra. La absorbancia se leyó a 260 nm y se registraron los datos correspondientes a la concentración, expresada en ng/µL, y a la relación A260/280. Las extracciones de ADN se almacenaron a -20 °C hasta su posterior uso.

3.2.6 Técnica *Shotgun*

La secuenciación del ADN mediante la técnica *shotgun* fue llevada a cabo a través de los servicios de Macrogen, Inc. (Seoul, Corea del Sur). Las muestras se prepararon de acuerdo con el flujo de trabajo de preparación de la biblioteca NGS y se secuenciaron utilizando la plataforma Illumina (California, Estados Unidos).

3.2.7 Análisis bioinformático

Se empleó el servidor de UseGalaxy australiano (<https://usegalaxy.org.au/>) para llevar a cabo el análisis de las muestras, para ello, se cargaron los datos en crudo con las secuencias *forward* y *reverse* correspondientes a cada una. El control de calidad se ejecutó empleando la herramienta FastQC (Galaxy Version 0.73+galaxy0) (Andrews, s.f.), para crear reportes sobre la calidad de la secuencia. Los reportes generados por FastQC se agregaron en uno solo a través de la herramienta MultiQC (Galaxy Version 1.11+galaxy1) (Ewels et al., 2016). Las lecturas que comienzan o terminan con muy baja calidad se pueden alinear mejor si las piezas de mala calidad se recortan, es por ello que, tras verificar la calidad general, se realizó una limpieza de las lecturas, empleando la herramienta Trimmomatic (Galaxy Version 0.36.6) (Bolger et al., 2014), para recortar lecturas y eliminar secuencias de adaptador. Los parámetros empleados fueron: realizar el paso inicial ILLUMINACLIP (Adaptador de corte y otras secuencias específicas de illumina de la lectura); para la secuencia de

adaptadores a utilizar se seleccionó TruSeq3 (additional seqs) (paired-ended, for MiSeq and HiSeq); en las operaciones a realizar por trimmomatic para los cortes de las bases, iniciales (LEADING) y finales (TRAILING), se especificó como nivel de calidad Phred mínimo el valor de 30, dicho valor se basó en el nivel de calidad Phred de las lecturas. Para eliminar las lecturas que estaban por debajo de 100 pb de longitud, se empleó la operación MINLEN.

Tras la limpieza, se volvió a verificar la calidad con FastQC y MultiQC y se emparejaron las secuencias *reverse* y *forward* de cada tiempo, con la herramienta FastQC interlacer (Galaxy Version 1.2.0.1+galaxy0) (Blankenberg et al., 2010).

Para la clasificación taxonómica, se empleó la herramienta MetaPhlan (Galaxy Version 4.0.5+galaxy0) (Beghini et al., 2021), para perfilar la composición de las comunidades microbianas (bacterias, arqueas y eucariotas) a nivel de especie. Los resultados se visualizaron con Krona (Galaxy Version 2.7.1+galaxy0) (Ondov et al., 2011; Cuccuru et al., 2014).

3.3 Resultados y Discusión

3.3.1 Sólidos solubles totales

La concentración de sólidos solubles totales (SST) de la muestra inicial fue de 34.65 ± 0.5 °Bx, mientras que para las que se tomaron a los 3 y 6 días posteriores fueron de 27.55 ± 0.5 y 25.75 ± 0.5 °Bx, respectivamente. El porcentaje del mosto final fue de 8.0 ± 0.5 °Bx. La disminución en la concentración de SST se debe a que los azúcares presentes en la mezcla se utilizaron para el crecimiento microbiano y la producción de etanol, tal como lo apuntan Kirchmayr et al. (2017).

3.3.2 Extracción de ADN metagenómico durante la fermentación del mosto y su secuenciación

Se extrajo ADN metagenómico de 3 momentos de fermentación de jugo de agave (T1, T2 y T3). La cantidad de ADN obtenida para el primer tiempo fue de 5.381 μg en un volumen final de 150 μL de solución de almacenamiento, lo cual significó que la concentración de ADN presente en la muestra fue de 35.873 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; para el segundo momento de muestreo se obtuvo un total de 7.72 μg de ADN en 154 μL , teniendo una concentración de 50.131 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; y, para el último lapso muestreado se obtuvieron 9.962 μg de ADN en 158 μL , es decir 63.051 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.

Tras la secuenciación se obtuvieron fragmentos de ADN de 151 pb para todas las muestras, con 39.1, 35.6 y 34.6 millones de lecturas para las muestras de mosto fresco, etapa fermentativa inicial y posterior, respectivamente, lo cual indicó que la secuenciación tuvo una cobertura adecuada, aumentando la probabilidad de detectar secuencias raras y proporcionando una imagen más completa de la diversidad genética presente en las muestras.

Para la cuantificación de la calidad de las bases nucleotídicas obtenidas durante el proceso de secuenciación se tomó como medida el Phred score obtenido por las lecturas. Cada valor del Phred score se traduce en una probabilidad de error asociada con la base de secuencia correspondiente. Cuanto mayor es el Phred score, menor es la probabilidad de que la base esté incorrecta, lo que indica una alta calidad de la secuencia, así, una secuencia con Phred Score = 10 tiene un 90% de eficacia (una base mal secuenciada cada 10) y una secuencia con Phred score = 30 tiene un 99,9% de eficacia (una base mal secuenciada cada 1000) (Ewing et al., 1998).

Las lecturas que comienzan o terminan con muy baja calidad se pueden alinear mejor si las piezas de mala calidad se recortan, es por ello que, tras verificar la calidad general, se realizó una limpieza de las lecturas, empleando la herramienta Trimmomatic (Galaxy Version 0.36.6) (Bolger et al., 2014), tras lo

cual, se obtuvieron 15.6, 16 y 14.6 millones de lecturas para las muestras de mosto fresco, etapa fermentativa inicial y posterior, respectivamente.

La calidad de las lecturas resultantes se encontró en un rango de Phred scores entre 30 y 40, lo cual indicó una alta calidad de las secuencias obtenidas y, por ende, una alta confiabilidad en los datos de secuenciación.

3.3.3 Perfil taxonómico de la comunidad microbiana durante la fermentación del mosto para mezcal artesanal

El perfil taxonómico y la abundancia relativa de la comunidad microbiana desarrollada en las tres etapas fermentativas analizadas en este estudio se determinaron mediante el programa MetaPhlAn (Galaxy Version 4.0.5+galaxy0) (Beghini et al., 2021).

La fermentación es un paso crucial durante la producción de mezcal donde interviene una microbiota compleja y variable (Kirchmayr et al., 2017). Al desarrollarse de forma espontánea con microorganismos autóctonos, se favorece la producción de compuestos que le otorgan cualidades organolépticas al producto final (Kirchmayr et al., 2014).

En el presente estudio, se identificaron 9 géneros principales y 66 especies microbianas en el proceso de fermentación evaluado (**Figura 12**), las cuales se distribuyeron de la manera en que se observa en la **Figura 13**, donde se destaca la presencia del 59.1% de los microorganismos durante los 3 tiempos de fermentación, lo cual indica un alto grado de homogeneidad en la diversidad microbiana durante el proceso, hecho que se puede constatar al observar las distribuciones únicas en cada círculo del diagrama de Venn (**Figura 13**), siendo en el mosto fresco donde se encontró una mayor cantidad de microorganismos únicos en comparación con el tiempo inicial de fermentación y la fase posterior.

Dentro de los resultados obtenidos en el perfil taxonómico, se destaca la presencia de bacterias de las familias Lactobacillaceae, Acetobacteraceae y Leuconostocaceae, cuyas abundancias relativas representaron el 37.08, 41.99 y

16.99%, respectivamente para el caso del mosto fresco; 83.04, 5.20 y 11.59% para la etapa inicial de la fermentación y 93.28, 1.36 y 5.12% para la etapa posterior (**Figura 14**).

La familia Saccharomycetaceae fue la única de tipo eucarionte identificada durante todos los periodos, siendo en el mosto fresco el momento en el que representó una abundancia relativa mayor, al ser del 3.82 %.

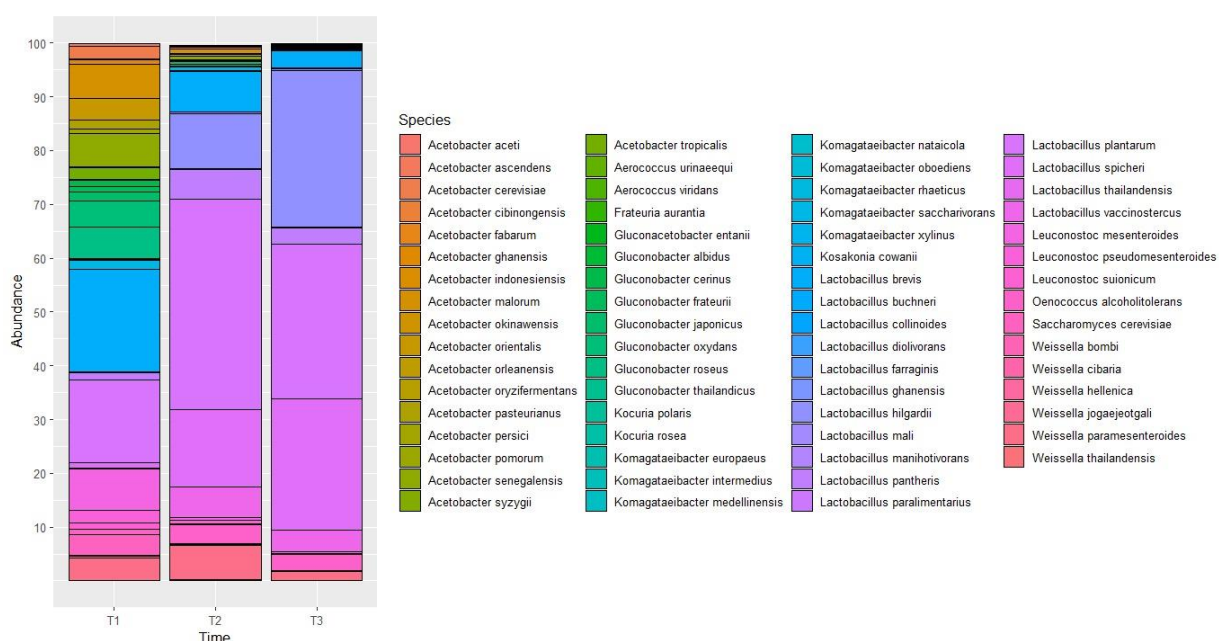


Figura 12. Diversidad de microorganismos identificados durante los momentos T1 (agaves recién horneados y triturados), T2 (mosto fermentado entre 2-3 días) y T3 (mosto fermentado entre 5-6 días), empleando el programa MetaPhlAn.

El proceso de fermentación no es el resultado de un solo microorganismo. Para tener productos de alta calidad, a menudo se requiere la presencia de varias especies y / o cepas, y el predominio de una especie o cepa sobre las otras es el resultado de diferentes tipos de efecto, basado en las interacciones que efectúan, tanto con el medio como entre ellas, tal como apuntan Torres-Guardado et al. (2021). En bebidas alcohólicas no destiladas, principalmente, la presencia y/o ausencia de ciertas cepas puede significar un enriquecimiento a las cualidades organolépticas de estas; o por el contrario, la generación de sabores o aromas

no apetecibles en los productos finales. En bebidas como el vino, la sidra, o la cerveza, se ha documentado que el proceso de fermentación alcohólica es conducido principalmente por especies del género *Saccharomyces*, sin embargo, también involucran la participación de bacterias ácido-lácticas (BAL), e incluso ácido-acéticas (BAA) (Cordes et al., 2021; De Roos & De Vuyst, 2019; Fleet, 2003)

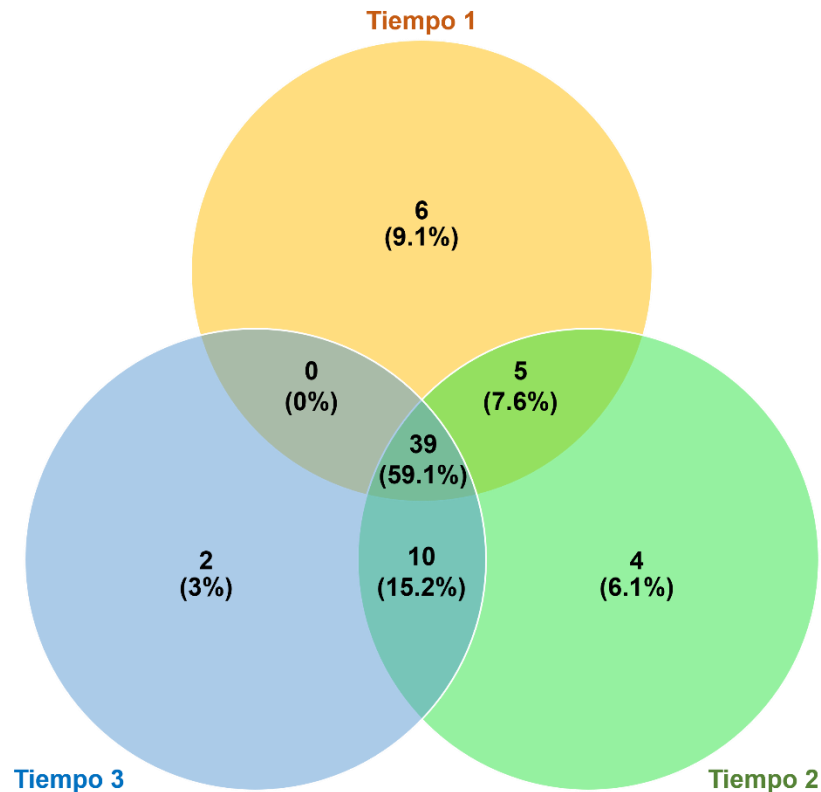


Figura 13. Diagrama de Venn de los microorganismos compartidos y únicos identificados durante los 3 tiempos del proceso de producción de mezcal artesanal evaluado.

A nivel de género, el mosto fresco estuvo dominado por *Lactobacillus* (*L. brevis*, 18.98 %; *L. plantarum*, 15.39 %); *Acetobacter* (*A. malorum*, 6.21 %; *A. senegalensis*, 6.18 %; *A. orientalis*, 4.12 %); *Gluconobacter* (*G. roseus*, 5.89 %; *G. oxydans*, 4.85 %); *Leuconostoc* (*Leuc. mesenteroides*, 7.62 %); *Weissella* (*W. paramesenteroides*, 4.16 %); *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, 3.81 %); *Komagataeibacter* (*K. saccharivorans*, 1.64 %), *Oenococcus* (*O. alcoholitolerans*, 0.91 %), *Kocuria* (*K. rosea*, 0.048 %; *K. polaris* 0.04 %) y *Frateuria* (*F. aurantia*,

0.02 %). En el jugo de maguey con 3 días de fermentación, los géneros microbianos identificados fueron *Lactobacillus* (*L. plantarum*, 39.09 %; *L. spicheri*, 14.46 %; *L. hilgardii*, 10.22 %; *L. brevis*, 7.62 %; *L. vaccinostercus*, 5.69 %; *L. pantheris*, 5.52 %); *Weisella* (*W. paramesenteroides*, 6.42 %); *Oenococcus* (*O. alcoholitolerans*, 3.53 %), *Acetobacter* (*A. malorum*, 0.75 %), *Leuconostoc* (*Leuc. pseudomesenteroides*, 0.74 %); *Komagataeibacter* (*K. saccharivorans*, 0.67 %), *Gluconobacter* (*G. oxydans*, 0.5 %) y *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, 0.15 %). Para el caso del mosto fermentado durante 6 días, los géneros que se encontraron fueron *Lactobacillus* (*L. hilgardii*, 29.14 %; *L. plantarum*, 28.77 %; *L. spicheri*, 24.51 %; *L. vaccinostercus*, 4.03 %; *L. brevis*, 3.18 %; *L. pantheris*, 2.96 %; *L. ghanensis*, 0.38 %); *Oenococcus* (*O. alcoholitolerans*, 2.86 %), *Weisella* (*W. paramesenteroides*, 1.64 %); *Acetobacter* (*A. malorum*, 0.73 %; *A. senegalensis*, 0.13 %); *Leuconostoc* (*Leuc. pseudomesenteroides*, 0.27 %; *Leuc. mesenteroides*); *Komagataeibacter* (*K. saccharivorans*, 0.17 %), *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, 0.24 %) y *Gluconobacter* (*G. oxydans*, 0.13 %; *G. roseus*, 0.11 %).

Escalante-Minakata et al. (2008) identificaron levaduras y bacterias presentes en la fermentación de *A. salmiana*, donde la diversidad microbiana se constituyó principalmente de BAL y levaduras no-*Saccharomyces*. Como ya se observó, en el presente estudio la única levadura identificada fue *S. cerevisiae*, el hecho de que no se hayan encontrado más levaduras puede atribuirse a tres factores principales: en primera instancia, a la capacidad de las BAL para inhibir el crecimiento de levaduras no-*Saccharomyces*, al inducir la regulación positiva de la expresión génica de *S. cerevisiae* que codifica para la lactato deshidrogenasa, la biosíntesis de lípidos, los aminoácidos, la hexosa y los transportadores de amoníaco, compuestos necesarios para su crecimiento y reproducción (Torres-Guardado et al., 2021); en segundo lugar, al “efecto killer” de *S. cerevisiae*, el cual está relacionado con la producción y liberación de varios tipos de toxinas con bajo peso molecular y modificaciones postraduccionales, que pueden matar células sensibles, algo muy empleado en la industria vitivinícola para controlar el crecimiento y la persistencia de levaduras indeseables (Vuuren & Jacobs, 1992).

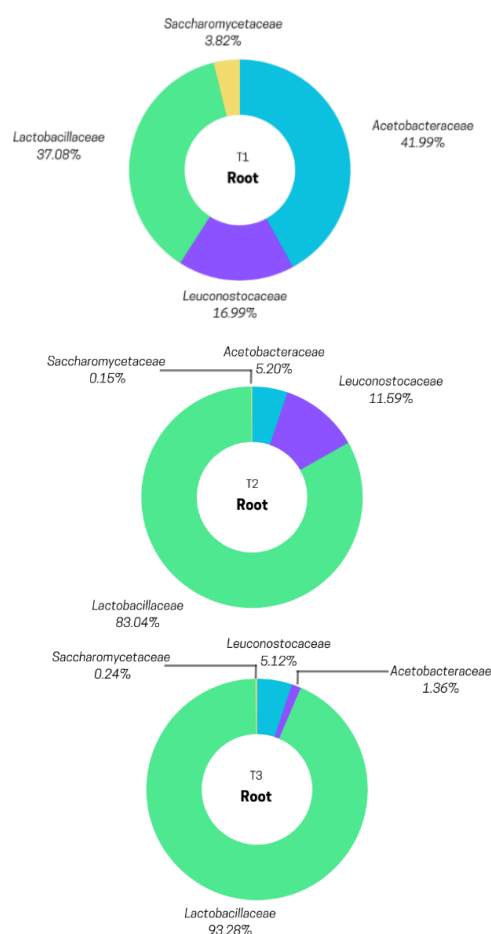


Figura 14. Abundancias relativas de las familias taxonómicas identificadas en mosto de maguey para elaborar mezcal artesanal: mosto fresco (T1), etapa inicial de la fermentación (T2) y etapa posterior de la fermentación (T3).

Y, por último, a la generación de otros compuestos del metabolismo secundario de *S. cerevisiae*, como los alcoholes aromáticos tirosol, triptofol y 2-feniletanol, derivados del metabolismo de la tirosina, el triptófano y la fenilalanina, respectivamente, los cuales se ha demostrado que funcionan como moléculas sensibles al *quórum* en condiciones de bajo contenido de nitrógeno cuando los cultivos de *S. cerevisiae* alcanzan una alta densidad en condiciones de vinificación (Avbelj et al., 2016; Zupan et al., 2013) y son responsables de reducir el crecimiento de células de levadura e inducir morfogénesis, especialmente en especies que no son *Saccharomyces* (González et al., 2018). Esta interacción antagonista de los alcoholes aromáticos en la fermentación puede tener un

impacto significativo en la dinámica del crecimiento y la interacción de diferentes microorganismos involucrados en este proceso.

La presencia de BAL durante todo el proceso de fermentación del mezcal ha sido demostrada anteriormente mediante métodos de cultivo tradicionales (Escalante-Minakata et al., 2008) e independientes de cultivo (Narváez-Zapata et al., 2010), lo cual indica la influencia de la fermentación maloláctica, conducida por este tipo de microorganismos, en el proceso de fermentación general y, por ende, en las cualidades del producto final, hecho que constatan Kirchmayr et al. (2017) al identificar 11 especies diferentes de BAL en mezcal oaxaqueño, entre las que se encontraron *L. brevis*, *L. ghanensis*, *L. hilgardii* y *L. plantarum*, microorganismos que también se identificaron en esta investigación durante los tres tiempos analizados del proceso de fermentación, a excepción de *L. ghanensis*, la cual se observó a partir del T2. Así mismo, *Leuconostoc mesenteroides* ha sido reportada durante fermentación de vino y pozol, una bebida fermentada tradicional Mexicana (Díaz-Ruiz et al., 2003; Fleet et al., 1984).

Narváez-Zapata et al. (2010), reportaron la presencia de *Lactobacillus thailandensis* y *L. spicheri* durante todas las fases de la fermentación activa del mezcal, especies que también se encontraron en el presente estudio y que han sido observadas en la fermentación de hojas de té para hacer miang, una bebida tradicional tailandesa y en masa madre belga, al igual que *L. vaccinostercus*, *L. thailandensis*, *L. pantheris*, *L. paralimentarius*, *L. spicheri*, *L. buchneri*, y *Leuconostoc mesenteroides* (Scheirlinck et al., 2007; Tanasupawat et al., 2007).

Weissella cibaria y *W. paramesenteroides*, fueron observadas por primera vez en fermentados de maguey por Escalante-Minakata et al. (2008), reportando la primera evidencia de un cultivo mixto en la fermentación alcohólica de maguey.

Las especies de BAL son capaces de producir ácido láctico, etanol, ácido acético y dióxido de carbono como productos principales, así como metabolitos secundarios en menor proporción como diacetilo, acetoína, 2-3 butanodiol y formiato, los cuales proveen cuerpo y aroma al producto final (Liu, 2003). Las

especies BAL encontradas en el presente estudio (*Lactobacillus*, *Weissella*, *Leuconostoc* y *Oenococcus*) también pueden ser las responsables de proveer cuerpo y aroma al mezcal obtenido de la fermentación estudiada en la presente investigación, tal como lo apunta Liu (2003).

Diferentes estudios sugieren que diversas especies de *Lactobacillus*, como *L. plantarum*, *L. casei*, *L. brevis*, y *L. fermentum* pueden servir como un posible complemento de la levadura para mejorar el contenido de terpenos en las fermentaciones (Lorizzo et al., 2016; Sun et al., 2016).

El proceso de fermentación inducido por co-inoculación de BAL y levaduras, principalmente *S. cerevisiae*, para inducir las fermentaciones maloláctica y alcohólica de manera simultánea en el mosto, ha demostrado derivar en bebidas con mayor complejidad en los perfiles aromáticos, al aumentar el contenido de terpenos, ésteres de acetato de alcoholes superiores y ésteres de etilo de ácidos grasos (Hu et al., 2022; Lorizzo et al., 2016; Sun et al., 2016; Taniyasuri et al., 2016). La diversidad de BAL encontrada en el presente estudio, sugiere que la fermentación se desarrolló de manera similar a una lograda por co-inoculación, lo cual abre un panorama importante para la producción de ensambles de mezcal con cualidades organolépticas definidas por una mayor riqueza en compuestos aromáticos en comparación con los obtenidos de una sola especie de maguey. Así, la co-inoculación de levaduras y BAL podría considerarse como una estrategia para mejorar la complejidad de los perfiles aromáticos del mezcal.

Por otra parte, la presencia de bacterias ácido acéticas (BAA) también se ha observado previamente durante la fermentación de maguey (Kirchmayr et al., 2017), exhibiendo un comportamiento de permanencia a lo largo de todo el proceso (Torres-Velázquez et al., 2022). Estos microorganismos son los responsables de la producción de ácido acético, el mayor componente del vinagre, el cual también es un compuesto volátil encontrado en el mezcal (Kirchmayr et al., 2017; Torija et al., 2010; Torres-Velázquez et al., 2022). La identificación de este tipo de microorganismos a lo largo de la fermentación sugiere que estos pueden contribuir a la generación de sabores indeseables en

el producto final si las concentraciones de ácido acético producido son elevadas (Torres-Velázquez et al., 2022), en el caso del presente estudio, aunque la presencia de BAA se observó durante todo el proceso de fermentación, esta fue decreciendo conforme el tiempo del proceso fue aumentando, teniendo su mayor abundancia relativa durante el primer periodo, al ser esta del 49.99%, hasta disminuir a 5.20 y 1.36% en el segundo y tercer tiempo.

Se identificaron, además, microorganismos que en otras investigaciones no se han documentado y que pueden estar relacionados con factores como el contacto del maguey cocido con vectores biológicos, el suelo, agua, aire, además de la manipulación por parte del productor (Lappe-Oliveras et al., 2008a). Microorganismos como *Fratueria aurantia* y *Kosakonia cowanii*, los cuales se han reportado anteriormente como biofertilizantes (El-Sheshtawy et al., 2022; Lisdiyanti et al., 2003; Subhashini, 2015, 2016), se presentaron durante el primer y segundo periodo evaluado, respectivamente. Cabe destacar que, la fermentación durante el proceso artesanal del mezcal en la región suele realizarse en piletas, que, a fin de poder monitorearlas de manera constante, se convierten en un sistema semicerrado expuesto a la intemperie, lo cual podría explicar la presencia de microorganismos del suelo a través de polvo u organismos más grandes, como insectos, en la fermentación.

Microorganismos de interés sanitario relacionados con infecciones en el tracto urinario y la piel también fueron identificados en la presente investigación. *Kokuria polaris*, *K. rosea*, *Aerococcus urinaeequi* y *A. viridans*, se encontraron durante el primer, segundo y tercer tiempo de la fermentación, lo cual evidencia la necesidad de llevar a cabo un control estricto para evitar la proliferación de especies no deseadas, considerando la mejora en las prácticas de higiene a lo largo del proceso de producción, estableciendo protocolos de limpieza y desinfección rigurosos y capacitando al personal en prácticas seguras de manipulación de materias primas.

3.4 Conclusiones

Este estudio representa un acercamiento al conocimiento microbiano involucrado en la producción de mezcales a partir de un ensamble, donde se favorece un perfil aromático más complejo del producto final gracias a la presencia de los géneros representativos de las BAL: *Lactobacillus*, *Weisella*, *Leuconostoc* y *Oenococcus*.

El conocimiento preciso de la flora involucrada durante la producción del mezcal puede abrir oportunidades para la producción de esta bebida con características organolépticas más complejas y enriquecidas debido a la mezcla de especies de maguey y a su flora nativa.

Para el análisis de este tipo de procesos de fermentación durante la producción de bebidas alcohólicas de interés comercial, las herramientas metagenómicas, como es el caso de la técnica *shotgun*, permiten conocer de manera masiva la diversidad microbiana y su variabilidad presentes en el proceso fermentativo.

A través de los análisis bioinformáticos se logró conocer la abundancia relativa de cada especie identificada en los tres tiempos de muestreo.

Los microorganismos Lactobacillus brevis, Lactobacillus plantarum, L. hilgardii, Weisella paramesenteroides, así como Saccharomyces cerevisiae se consideran representativos e importantes para la producción del mezcal, ya que estuvieron presentes durante todo el proceso de fermentación y en abundancia relativamente alta durante los tiempos de muestreo

3.5 Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT), porque a través de la beca No. 1144055 pude llevar a cabo mis estudios de Maestría en Ciencia Agroalimentaria. A la Universidad Autónoma Chapingo, por ofrecerme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría, a través del

proyecto 22023-DTT-62 aprobado por la Dirección General de Investigación y Posgrado. Al Dr. Artemio Pérez López, a la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma y a la Dra. Rosa Elvira Sánchez Fernández por su paciencia, sabiduría, confianza y la oportunidad de trabajar bajo su dirección durante la realización de este trabajo de investigación. Al Dr. Samir Samah y al laboratorio de Bio Genetix Lab S. de R.L. de C.V., por permitirme realizar parte de mi investigación con su orientación y recursos materiales. A Don Ché, Don Jaime y Don Osvaldo, por compartir su conocimiento y experiencias como maestros mezcaleros y permitirnos llevar a cabo esta investigación en sus palenques.

3.6 Literatura citada

- Abubucker, S., Segata, N., Goll, J., Schubert, A. M., Izard, J., Cantarel, B. L., Rodriguez-Mueller, B., Zucker, J., Thiagarajan, M., Henrissat, B., White, O., Kelley, S. T., Methé, B., Schloss, P. D., Gevers, D., Mitreva, M., & Huttenhower, C. (2012). Metabolic Reconstruction for Metagenomic Data and Its Application to the Human Microbiome. *PLoS Computational Biology*, 8(6), e1002358. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002358>
- Andrews, S. (s.f.). FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Avbelj, M., Zupan, J., & Raspor, P. (2016). Quorum-sensing in yeast and its potential in wine making. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2016 100:18, 100(18), 7841–7852. <https://doi.org/10.1007/S00253-016-7758-3>
- Beghini, F., McIver, L. J., Blanco-Míguez, A., Dubois, L., Asnicar, F., Maharjan, S., Mailyan, A., Manghi, P., Scholz, M., Thomas, A. M., Valles-Colomer, M., Weingart, G., Zhang, Y., Zolfo, M., Huttenhower, C., Franzosa, E. A., & Segata, N. (2021). Integrating taxonomic, functional, and strain-level profiling of diverse microbial communities with bioBakery 3. *eLife*, 10. <https://doi.org/10.7554/elife.65088>
- Blankenberg, D., Gordon, A., Kuster, G. V., Coraor, N., Taylor, J., & and, A. N. (2010). Manipulation of FASTQ data with Galaxy. *Bioinformatics*, 26(14), 1783–1785. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq281>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

- Chacón-Vargas, K., Torres, J., Giles-Gómez, 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. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71864-4>
- Cordes, A., Henriksen, P. S., Hald, M. M., Sørensen, L., Nielsen, P. O., Xu, J., Lund, J., Møller, N. A., Nielsen, F. O. S., Sarauw, T., Simonsen, J., Sparrevohn, L. R., Westphal, J., Blennow, A., & Hebelstrup, K. H. (2021). Identification of prehistoric malting and partial grain germination from starch granules in charred barley grains. *Journal of Archaeological Science*, 125, 105297. <https://doi.org/10.1016/J.JAS.2020.105297>
- Cuccuru, G., Orsini, M., Pinna, A., Sbardellati, A., Soranzo, N., Travaglione, A., Uva, P., Zanetti, G., & Fotia, G. (2014). Orione, a web-based framework *Bioinformatics*, 30(13), 1928–1929. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu135>
- De Roos, J., & De Vuyst, L. (2019). Microbial acidification, alcoholization, and aroma production during spontaneous lambic beer production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(1), 25–38. <https://doi.org/10.1002/JSFA.9291>
- Diario Oficial de la Federación (DOF) (2016). Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. México: Secretaria de Comercio y Fomento Industrial.
- Díaz-Ruiz, G., Guyot, J. P., Ruiz-Teran, F., Morlon-Guyot, J., & Wachter, C. (2003). Microbial and Physiological Characterization of Weakly Amylolytic but Fast-Growing Lactic Acid Bacteria: a Functional Role in Supporting Microbial Diversity in Pozol, a Mexican Fermented Maize Beverage. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4367. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4367-4374.2003>
- El-Sheshtawy, H. S., Fahim, I., Hosny, M., & El-Badry, M. A. (2022). Optimization of lactic acid production from agro-industrial wastes produced by *Kosakonia cowanii*. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 5. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2021.100228>
- Escalante-Minakata, P., Blaschek, H. P., Barba De La Rosa, A. P., Santos, L., & De León-Rodríguez, A. (2008). Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of *Agave salmiana*. *Letters in Applied Microbiology*, 46(6), 626–630. <https://doi.org/10.1111/J.1472-765X.2008.02359.X>
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Käller, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single

report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047–3048.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>

- Ewing, B., & Green, P. (1998). Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred.II. Error Probabilities. *Genome Research*, 8(3), 186–194. doi:10.1101/gr.8.3.186
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 11–22. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00245-9)
- Fleet, G. H., Lafon-Lafourcade, S., & Ribereau-Gayon, P. (1984). Evolution of Yeasts and Lactic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Bordeaux Wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(5), 1034. <https://doi.org/10.1128/AEM.48.5.1034-1038.1984>
- González, B., Vázquez, J., Cullen, P. J., Mas, A., Beltran, G., & Torija, M. J. (2018). Aromatic amino acid-derived compounds induce morphological changes and modulate the cell growth of wine yeast species. *Frontiers in Microbiology*, 9(APR), 325667. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00670/BIBTEX>
- Hernández-delgado, N. C., Torres-maravilla, E., Mayorga-reyes, L., Martín, R., Langella, P., Pérez-pastén-borja, R., Sánchez-pardo, M. E., & Bermúdez-humarán, L. G. (2021). Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Probiotic Candidate Strains Isolated during Fermentation of Agave (*Agave angustifolia* Haw). *Microorganisms* 2021, Vol. 9, Page 1063, 9(5), 1063. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9051063>
- Hu, K., Zhao, H., Kang, X., Ge, X., Zheng, M., Hu, Z., & Tao, Y. (2022). Fruity aroma modifications in Merlot wines during simultaneous alcoholic and malolactic fermentations through mixed culture of *S. cerevisiae*, *P. fermentans*, and *L. brevis*. *LWT*, 154, 112711. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112711>
- 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*, 79, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.052>
- Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizón-Gaviño, J., Herrera-Suárez, T., García-Mendoza, A., & Gschaedler-Mathis, A. (2008a). Yeast 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>

- Lisdiyanti, P., Yamada, Y., Uchimura, T., & Komagata, K. (2003). Identification of *Frateuria aurantia* Strains Isolated from Indonesian Sources. *Microbiol. Cult. Coll. Dec.*, 19(2), 81–90.
- Liu, S. Q. (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 83(2), 115–131. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00366-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00366-5)
- Lorizzo, M., Testa, B., Lombardi, S. J., García-Ruiz, A., Muñoz-González, C., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2016). Selection and technological potential of *Lactobacillus plantarum* bacteria suitable for wine malolactic fermentation and grape aroma release. *LWT*, 73, 557–566. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.06.062>
- Montalvo-Navarro, C.A. & Lugo-Flores, M.A. (2019). Electrophoresis: fundamentals, advances and applications. *Epistemos* 13(26), 48-54. <https://doi.org/10.36790/epistemos.v13i26.96>
- Narváez-Zapata, J. A., Rojas-Herrera, R. A., Rodríguez-Luna, I. C., & Larralde-Corona, C. P. (2010). Culture-independent analysis of lactic acid bacteria diversity associated with mezcal fermentation. *Current Microbiology*, 61(5), 444–450. <https://doi.org/10.1007/S00284-010-9636-Z/FIGURES/2>
- Ondov, B. D., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-385>
- 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>
- Scheirlinck, I., Van Der Meulen, R., Van Schoor, A., Vancanneyt, M., De Vuyst, L., Vandamme, P., & Huys, G. (2007). Influence of Geographical Origin and Flour Type on Diversity of Lactic Acid Bacteria in Traditional Belgian Sourdoughs. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(19), 6262. <https://doi.org/10.1128/AEM.00894-07>
- Subhashini, D. V. (2015). Growth Promotion and Increased Potassium Uptake of Tobacco by Potassium-Mobilizing Bacterium *Frateuria aurantia* Grown at Different Potassium Levels in Vertisols. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 46(2), 210–220. <https://doi.org/10.1080/00103624.2014.967860>

- Subhashini, D. V. (2016). Effect of NPK Fertilizers and Co-inoculation with Phosphate-Solubilizing Arbuscular Mycorrhizal Fungus and Potassium-Mobilizing Bacteria on Growth, Yield, Nutrient Acquisition, and Quality of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 47(3), 328–337. <https://doi.org/10.1080/00103624.2015.1123724>
- Sun, S. Y., Gong, H. S., Liu, W. L., & Jin, C. W. (2016). Application and validation of autochthonous *Lactobacillus plantarum* starter cultures for controlled malolactic fermentation and its influence on the aromatic profile of cherry wines. *Food Microbiology*, 55, 16–24. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2015.11.016>
- Tanasupawat, S., Pakdeeto, A., Thawai, C., Yukphan, P., & Okada, S. (2007). Identification of lactic acid bacteria from fermented tea leaves (miang) in Thailand and proposals of *Lactobacillus thailandensis* sp. nov., *Lactobacillus camelliae* sp. nov., and *Pediococcus siamensis* sp. nov. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 53(1), 7–15. <https://doi.org/10.2323/JGAM.53.7>
- Taniasuri, F., Lee, P. R., & Liu, S. Q. (2016). Induction of simultaneous and sequential malolactic fermentation in durian wine. *International Journal of Food Microbiology*, 230, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2016.04.006>
- Torija, M. J., Mateo, E., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2010). Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan–MGB probes. *Food Microbiology*, 27(2), 257–265. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2009.10.001>
- Torres-Guardado, R., Esteve-Zarzoso, B., Reguant, C., & Bordons, A. (2021). Microbial interactions in alcoholic beverages. *International Microbiology* 2021 25:1, 25(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/S10123-021-00200-1>
- Torres-Velázquez, D. S., Rojas-Contreras, J. A., Soto-Cruz, N. O., Urtiz-Estrada, N., López-Miranda, J., Kirchmayr, M. R., & 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), 112–122. <https://doi.org/10.7764/ijanr.v49i2.2367>
- Verdugo Valdez, A., Segura Garcia, L., Kirchmayr, M., Ramírez Rodríguez, P., González 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>

- Vuuren, H. J. J. Van, & Jacobs, C. J. (1992). Killer Yeasts in the Wine Industry: A Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43(2), 119–128. <https://doi.org/10.5344/AJEV.1992.43.2.119>
- Zupan, J., Avbelj, M., Butinar, B., Kosel, J., Šergan, M., & Raspor, P. (2013). Monitoring of quorum-sensing molecules during minifermentation studies in wine yeast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(10), 2496–2505. https://doi.org/10.1021/JF3051363/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2012-051363_0008.GIF
- Zymo Research (2022). ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit DNA for microbiome or metagenome analyses. Instruction Manual Ver.1.5.3. Zymo Research: EUA. https://files.zymoresearch.com/protocols/_d4300t_d4300_d4304_zymobio mics_dna_miniprep_kit.pdf

4 ANEXOS

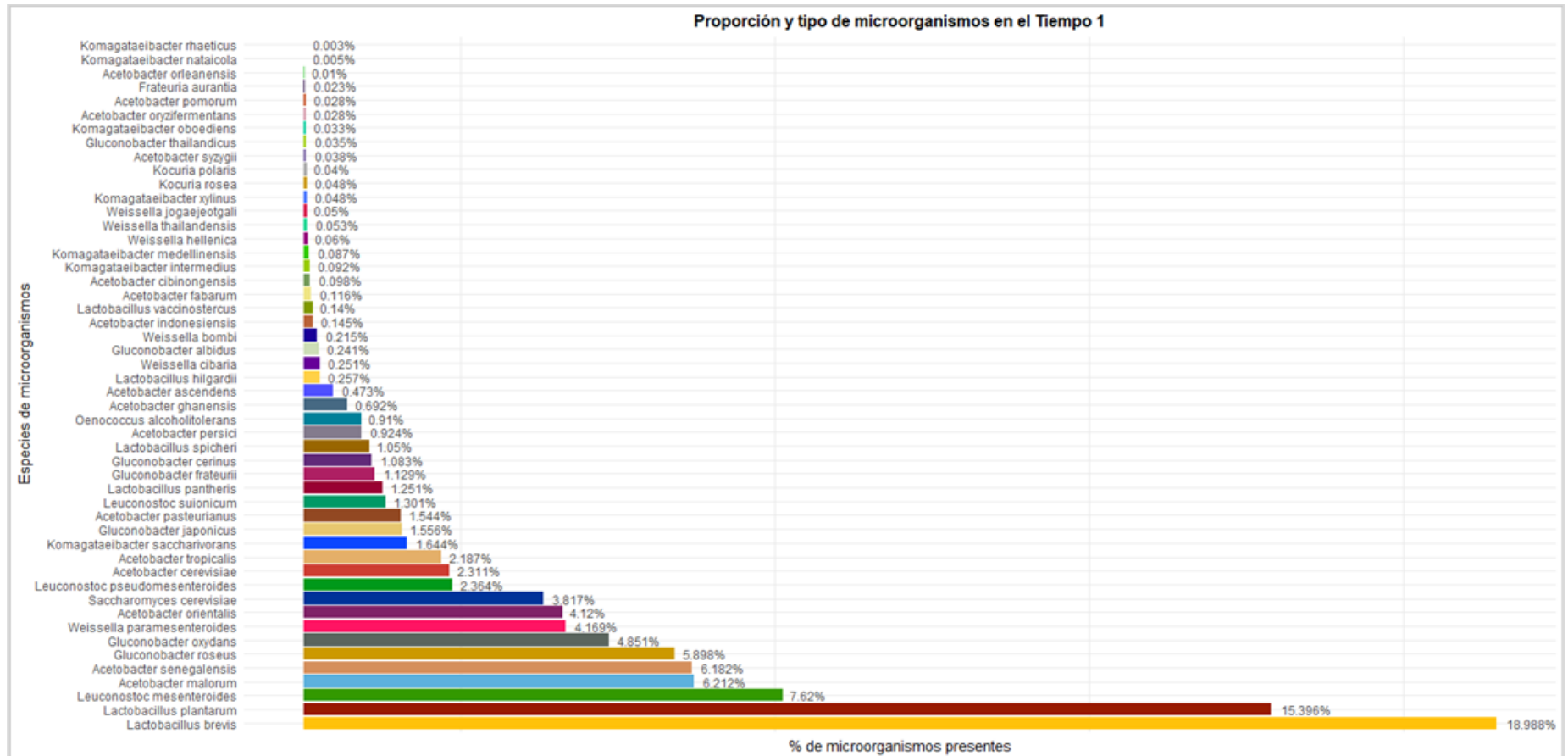


Figura 15. Abundancias relativas de los microorganismos identificados en el mosto fresco.

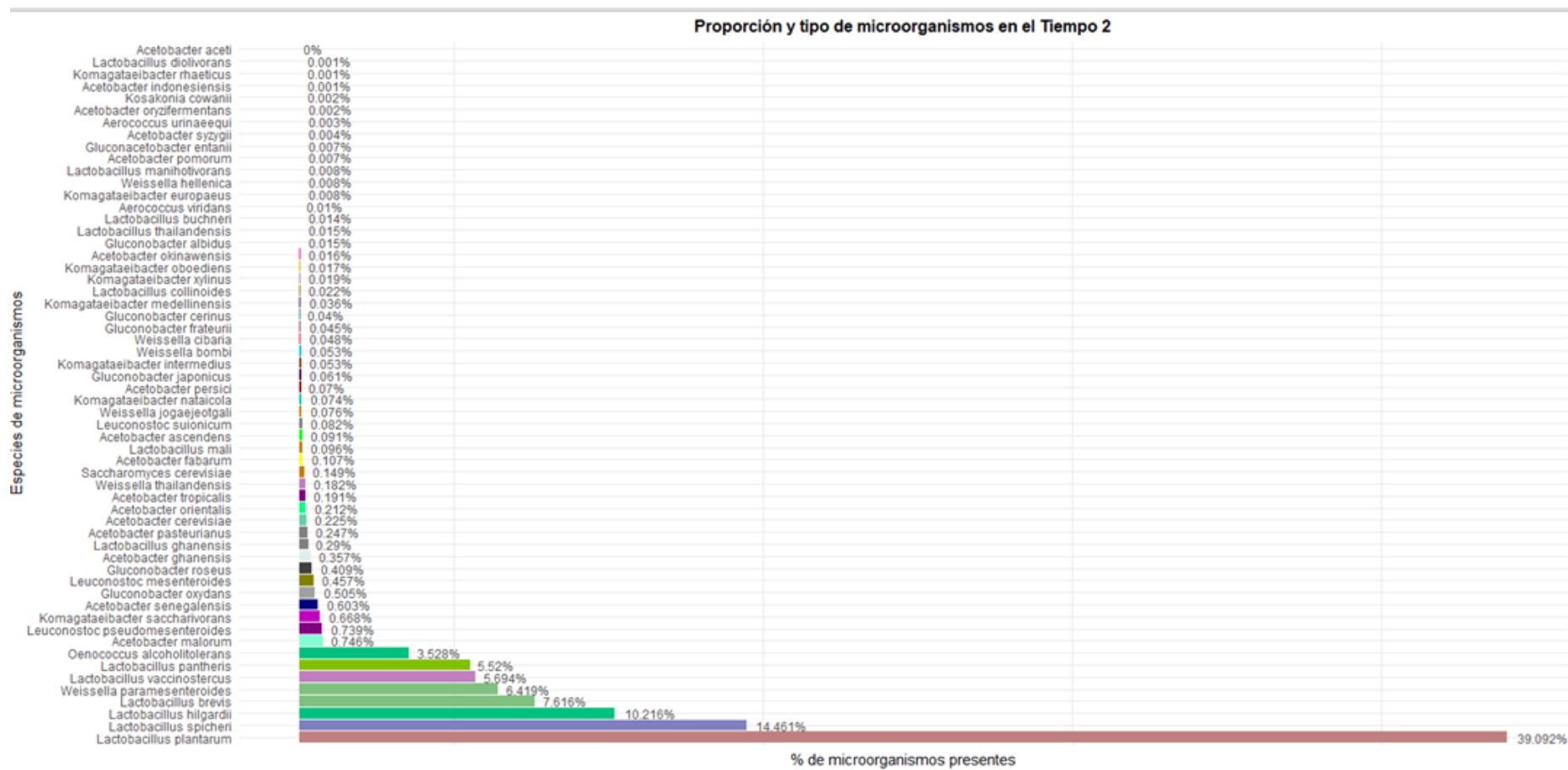


Figura 16. Abundancias relativas de los microorganismos identificados en mosto con 3 días de fermentación.

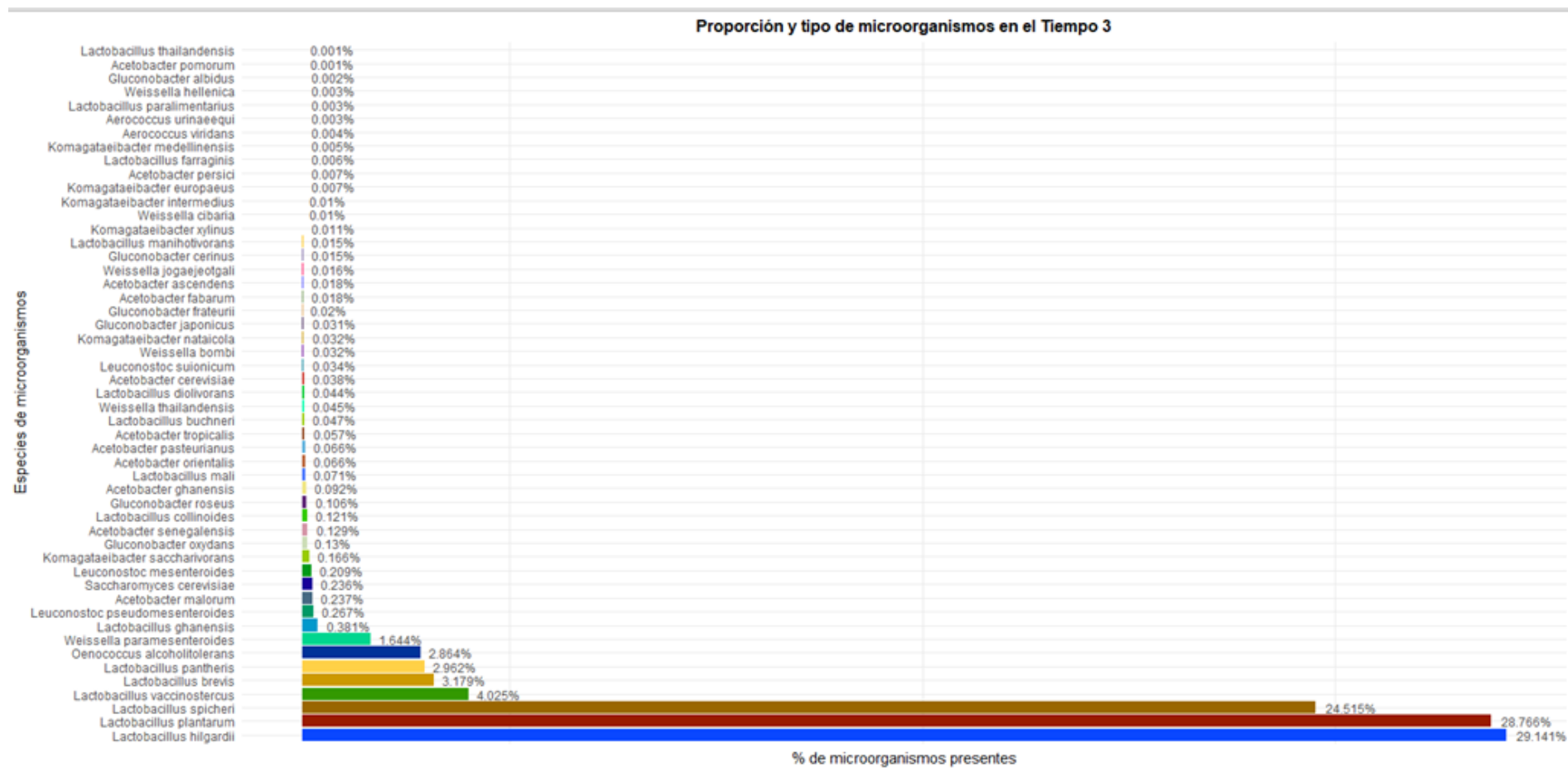


Figura 17. Abundancias relativas de los microorganismos identificados en mosto con 6 días de fermentación