

# Isolation and efficiency of native yeasts from fermentation vats for maguey (*Agave cupreata* Trel. & Berger)

## Aislamiento y eficiencia de levaduras nativas de tinas fermentadoras para maguey (*Agave cupreata* Trel. & Berger)

Damián-Sánchez, Gema; Román-Justo, Norely Y.; Méndez-Patiño, Maygualinda; Ibarra-Benítez, Giovanni;  
Ramírez-Peralta, Arturo<sup>1</sup>; Vargas-Álvarez, Dolores<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Guerrero, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Avenida Lázaro Cárdenas s/n colonia la Haciendita Chilpancingo de los Bravo, México. C.P: 39090.

\*Autor de correspondencia: dvargas@uagro.mx

### ABSTRACT

**Objective:** Isolate and characterize the synergism of native microorganisms in maguey (*Agave cupreata* Trel. & Berger) fermentation vats to distill mezcal.

**Materials and methods:** were scraped from the vat where the ground and formulated Agave is fermented to generate the fermentation and obtain mezcal, they were processed in selective media and a sieve was carried out first and then the sugar conversion efficiency.

**Results:** two yeasts were conveniently found, which showed promising indicators for the conversion of sugars to alcohol, they were called ca strain one and the union of the two chosen, additionally they were subjected to the evaluation of parameters such as cell dry weight, amount of ethanol produced ( $10.33 \pm 0.57$  (c) and  $12.57 \pm 0.57$  (m) respectively and the determination of total reducing sugars (starting from  $500 \text{ mg L}^{-1}$ ).

**Limitations of the study/implications:** it was subjected to an *in vitro* work, pending the efficiency in agave sugars and the concentration gradient.

**Conclusions:** the consortium in comparison of an isolated strain produced a greater quantity of alcohol regarding its growth in the medium after 32 h of fermentation at a constant temperature of  $37^\circ\text{C}$  and 160 rpm.

**Keywords:** fermentation, microorganisms, mezcal.

### RESUMEN

**Objetivo:** aislar y caracterizar el sinergismo de microorganismos nativos de tinas de fermentación de maguey (*Agave cupreata* Trel. & Berger) para destilar mezcal.

**Materiales y métodos:** se recolectaron raspados de tina donde se fermenta el Agave molido y formulado para generar la fermentación y obtener mezcal, se procesaron en medios selectivos y se realizó primero un tamiz y posteriormente la eficiencia de conversión de azúcares.

**Agroproductividad:** Vol. 13, Núm. 3, marzo. 2020, pp: 25-30.

**Recibido:** agosto, 2019. **Aceptado:** febrero, 2020.

**Resultados:** se encontraron convenientemente dos levaduras, que mostraron indicadores prometedores para la conversión de azúcares a alcohol se les denominó c a la cepa uno y m a la unión de las dos elegidas, adicionalmente se sometieron a la evaluación de parámetros como peso seco celular, cantidad de etanol producido ( $10.33 \pm 0.57$  (c) y  $12.57 \pm 0.57$  (m) respectivamente y la determinación de azúcares reductores totales (se partió de  $500 \text{ mg L}^{-1}$ ).

**Limitaciones del estudio/implicaciones:** se sometió a un trabajo *in vitro* quedando pendiente la eficiencia en azúcares de agave y el gradiente de concentración.

**Conclusiones:** el consorcio en comparación de una cepa aislada produjo mayor cantidad de alcohol respecto su crecimiento en el medio a 32 h de fermentación a una temperatura constante de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  y 160 rpm.

**Palabras clave:** fermentación, microorganismos, mezcal.

## INTRODUCCIÓN

El *Agave cupreata* Trel. & Berger (agave o maguey) es una especie endémica del estado de Guerrero, México, y ha sido usada desde la antigüedad para producir bebidas fermentadas mediante el conocimiento empírico. Las piñas o cabezas de los magueyes son ricas en inulinas (polisacáridos compuestos por moléculas de fructosa unidos con un azúcar terminal), que al cocerse da lugar a la hidrólisis que rompe los enlaces que unen a los polisacáridos proporcionando fructosas libres, que al metabolizarse en condiciones anaerobias se convierten a etanol liberando  $\text{CO}_2$  en este proceso participan diversos microorganismos, que desarrollan interacciones bióticas entre dos o más especies de acuerdo a las necesidades de sus miembros, involucrados en estrategias competitivas de intercambio de metabolitos entre especies; donde aseguran su nutrición y supervivencia en un medio con recursos limitados (Hibbing *et al.*, 2010; Ponomarova y Raosahab, 2015; Pérez *et al.*, 2016; Feichtmayer *et al.*, 2017; Ponomarova *et al.*, 2017; Martino *et al.*, 2018; Martínez *et al.*, 2018).

Al conjunto de microorganismos que se relacionan y coexisten en un mismo tiempo y espacio estableciendo relaciones antagónicas o sinérgicas se le ha deno-

minado consorcios microbianos. Sus interacciones son reguladas por el intercambio y equilibrio de moléculas señalizadoras, que poseen alta productividad, resistencia a la invasión, y capacidad de procesar los sustratos a su alcance. El grado de competencia de una cepa depende de factores bióticos y abióticos que determinan su capacidad para superar a otra, e interacciones negativas podrían disminuir la concentración de etanol producido y generar compuestos secundarios no deseados que influyen en la calidad sensorial del producto. (Höffner y Barton, 2014; Ciani *et al.*, 2016; Ming *et al.*, 2016). Los procesos de producción de bebidas alcohólicas son impulsados por consorcios microbianos, que interactúan con el medio a fermentar definiendo la seguridad de las fermentaciones y características del producto; por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los microorganismos más utilizados en la industria para la producción de etanol, debido a su prevalencia en la fermentación espontánea por su capacidad de fermentar etanol a partir de azúcares hidrolizados. Otro de los de microorganismos reportados en la literatura es *Saccharomyces paradoux*, nativo del aguamiel de agave, que sintetiza endoinulasas para desdoblar fructooligosacáridos, para la producción de mezcal (Ivey, Massel y Phister, 2013; Smid y Lacroix, 2013; Albuquerque *et al.*, 2013; Branco *et al.*, 2015; Sandoval-González *et al.*, 2018). con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio, fue aislar y caracterizar el sinergismo de microorganismos nativos de tinajas de fermentación de maguey (*Agave cupreata* Trel. & Berger) para destilar mezcal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La recolección se llevó a cabo en la comunidad de Amojileca, municipio de Chilpancingo Guerrero, México, la toma y manejo de la muestra de raspado de tinajas de fermentación se realizó conforme a la NOM-109-SSA1-1994. Para la preparación de las muestras e inoculación de las cajas, se homogenizaron 7.6 g de raspado con 65 mL de solución salina de la cual se tomó  $100 \mu\text{L}$  para su inoculación en los medios Sabouraud, Agar infusión cerebro corazón, Gelosa sangre BHI (GC). Se incubó a una temperatura de  $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 24 h. La identificación bioquímica se realizó tras aislar las colonias obtenidas y se inoculó en los medios sal y manitol y Mac conkey para evaluar algunas características bioquímicas. Se midió la actividad de la enzima ornitina decarboxilasa, la capacidad de movilidad y fermentación de carbohidratos en condiciones variables de nutrientes, con vitaminas (caldo tioglicolato) y sin vitaminas

(caldo soya (*Glycine max* L.)), a su vez se realizó tinción de Gram que permitió la identificación de las cepas y su morfología. Para los ensayos de competencia, se determinó usar de las cepas identificadas a la cepa 1, y cepa 3 para construir el consorcio. Se colocaron ambas cepas en el medio, formando dos líneas de cruce entre ellas para determinar si existía una relación antagónica a través de la inhibición de alguna de ellas. Para el peso seco celular, se inocularon ambas cepas en medio caldo soya tripticaseína, se incubó a 37 °C con una agitación constante de 160 rpm, y se determinó la absorbancia de las muestras por espectrofotometría a 600 nm, cada 3 h. Por último, se calculó peso seco celular mediante la siguiente fórmula:

$$\text{abs}=0.37 \text{ g peso seco celular L}^{-1}$$

### Método de DNS

Se cuantificaron los niveles de azúcares reductores, los resultados fueron comparados con estándares de concentraciones conocidas de glucosa a partir de una solución stock de 1 g L<sup>-1</sup> a una absorbancia de 540 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. Para la cuantificación de etanol, se determinó el porcentaje de etanol mediante el alcoholímetro de ambas cepas a las 32 h de fermentación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio, se aisló un total de siete cepas por medio del raspado de tinajas en las que se lleva a cabo la fermentación del mosto de agave. Se logró aislar dife-

rentes cepas de levaduras en distintos medios, de las cuales se eligieron dos para formar parte del consorcio microbiano asociado a la fermentación del jugo de agave (Cuadro 1).

Con base en los ensayos anteriores se seleccionaron las cepas 1 y 3 para el ensayo de competencia (Figura 1), las cuales presentaron una relación de sinergismo.

En relación a la cinética de crecimiento, los resultados de la Figura 2 muestran que la cepa c tuvo mayor consumo de azúcares reductores con  $0.05 \pm 0.03$ ; sin embargo, se observó una concentración menor de etanol con  $10.37 \pm 0.57$  en comparación con la cepa m con menor consumo de azúcares con  $0.06 \pm 0.01$  y mayor contenido de etanol con  $12.57 \pm 0.57$ . Para medir la concentración de etanol a 32 h de fermentación, se utilizó un alcoholímetro. La Figura 3 muestra que la cepa c tuvo menor porcentaje ( $10.37 \pm 0.57$ ) de etanol en comparación con la cepa m que presentó mayor porcentaje ( $12.57 \pm 0.57$ ) de etanol.

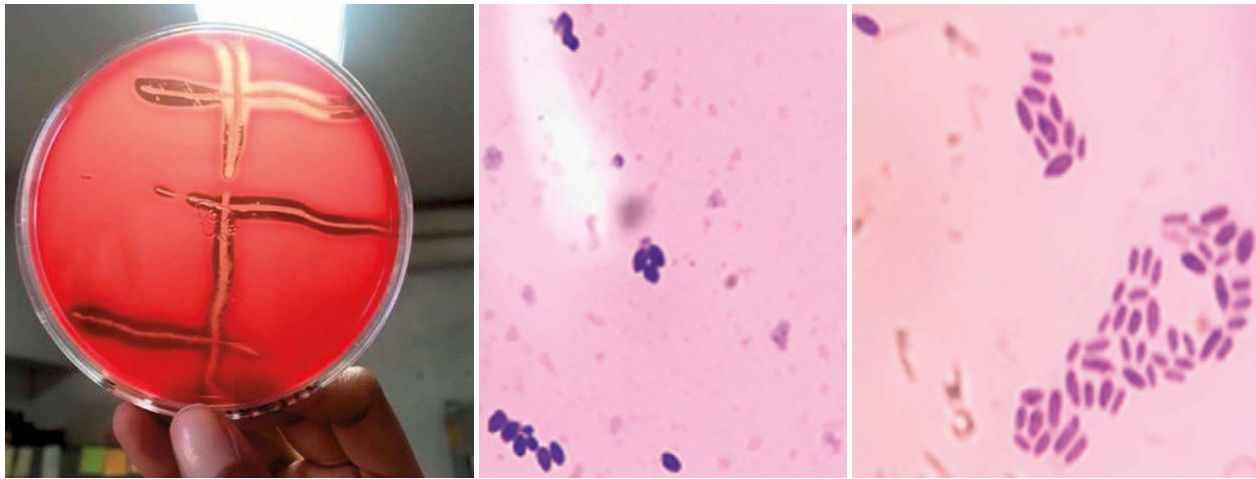
Con respecto a la cuantificación de etanol de las cepas a las 32 h de fermentación, se obtuvo diferencias significativas. En la cepa c tuvo una concentración menor de etanol con  $10.33 \pm 0.57$  en comparación con la cepa m que tuvo una mayor concentración de etanol con  $12.57 \pm 0.57$ .

En el Cuadro 2 se muestran los resultados de la determinación de azúcares reductores y del peso seco

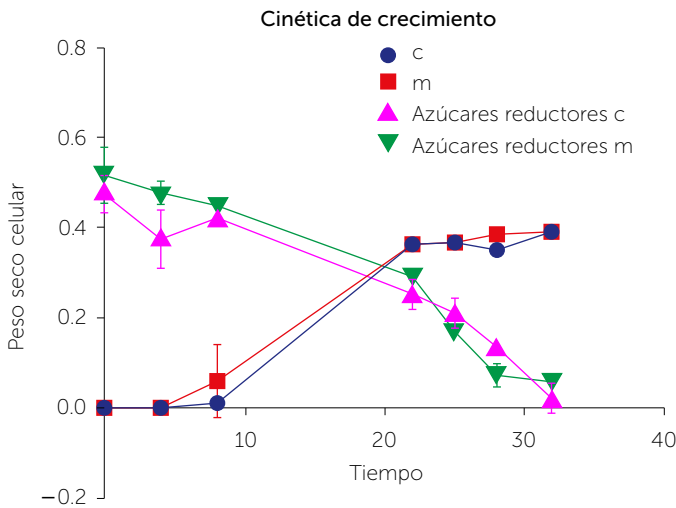
**Cuadro 1.** Perfil bioquímico de las cepas aisladas de mosto de agave.

	Perfil bioquímico						
	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7
Catalasas	-	+	-	-	-	-	-
Tinción de Gram	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Movilidad	+	N.D	+	+	+	+	+
Ornitina descarboxilasa	-	N.D	-	-	-	-	-
<b>Fermentación en caldo de soya</b>							
Dextrosa	+	N.D	+	-	+	-	-
Xilosa	-	N.D	-	-	-	+	-
Trehalosa	-	N.D	+	-	-	-	-
<b>Fermentación en medio tioglicolato</b>							
Dextrosa	+	N.D	-	-	+	+	+
Xilosa	+	N.D	+	+	+	-	+
Trehalosa	+	N.D	+	+	-	+	+

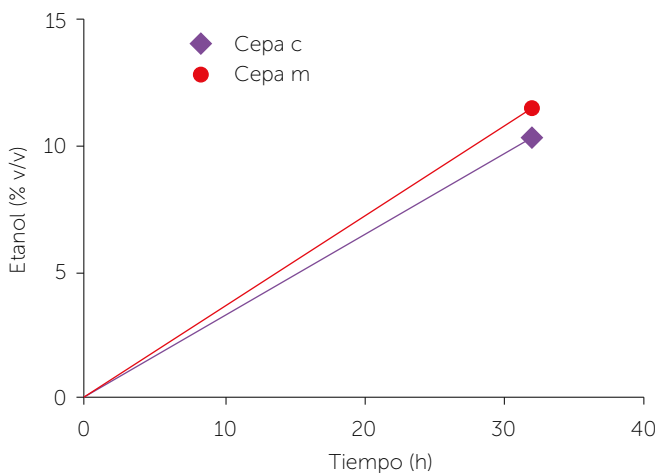
+ = Positivo. - = Negativo. N.D = No determinado. +/- = Misma morfología para Gram positivo o negativo.



**Figura 1.** Ensayo de competencia. a) Se puede apreciar el sinergismo existente entre las cepas 1 y 3 en agar sangre infusión cerebro corazón, observándose que las estrias se cruzan. b) Estudio morfológico de la cepa 1, se visualizan formas ovoides Gram variable. c) Estudio morfológico de la cepa 2, se observan microorganismos ovoides Gram variable. Tinción Gram. 100x.



**Figura 2.** Cinética de crecimiento celular y reducción de azúcares. Crecimiento celular y azúcares reductores de la cepa *c* (individual) y la cepa *m* (dos cepas) en función del tiempo de fermentación a una misma concentración de azúcares.



**Figura 3.** Porcentaje de producción de etanol por las cepas a 32 h de fermentación de la cepa *c* y cepa *m*.

**Cuadro 2.** Determinación de azúcares reductores y del peso seco celular en el tiempo de las cepas *c* y *m*.

Tiempo	Cepa	Azúcares reductores (g l <sup>-1</sup> )	Peso seco celular (g l <sup>-1</sup> )
0	cepa <i>c</i>	0.48±0.03 ab	0.009±0.0001 d
0	cepa <i>m</i>	0.52±0.06 a	0.0018±0.0011 d
4	cepa <i>c</i>	0.37± 0.07 cd	0.0019±0.0010 d
4	cepa <i>m</i>	0.48±0.02 ab	0.0009±0.0002 d
8	cepa <i>c</i>	0.42±0.02 bc	0.0131±0.0087 d
8	cepa <i>m</i>	0.45±0.012 abc	0.0124±0.0041 d
22	cepa <i>c</i>	0.26±0.03 ef	0.3649±0.0012 d
22	cepa <i>m</i>	0.29±0.02 de	0.3665±0.0006 c
25	cepa <i>c</i>	0.21±0.03 efg	0.3695±0.0004 c
25	cepa <i>m</i>	0.17±0.02 fg	0.3658±0.0045 c
28	cepa <i>c</i>	0.13±0.01 gh	0.3539±0.0198 bc
28	cepa <i>m</i>	0.076±0.02 h	0.3856±0.0013 ab
32	cepa <i>c</i>	0.05±0.03 h	0.3811±0.0069 c
32	cepa <i>m</i>	0.06±0.01 h	0.3943±0.0021 a

*c*: cepa 1. *m*: mixta. Más de dos letras indican que son estadísticamente diferentes.

celular en diferentes tiempos. Es importante resaltar que se registraron diferencias significativas en la determinación de azúcares reductores en el tiempo 0, cepa *c* (0.48±0.03 ab), en el tiempo 4, cepa *c* (0.37±0.07 cd) y cepa *m* (0.48±0.02 ab), en el tiempo 8, cepa *c* (0.42±0.02 bc) y cepa *m* (0.45±0.012 abc), en el tiempo 22, cepa *c* (0.26±0.03 ef) y cepa *m* (0.29±0.02 de), en el tiempo 25, cepa *c* (0.21±0.03 efg) y cepa *m* (0.17±0.02 fg), en el tiempo 28, cepa *c* (0.13±0.01 gh), lo que contrasta con lo obtenido en el peso seco celular en el mismo tiempo y en la misma cepa (0.3539±0.0198 bc).

Se aislaron siete cepas a partir del raspado de tinas en las que se lleva a cabo la fermentación del agave. La piña de agave es tratada en un medio enriquecido con carbohidratos complejos que al cocerse se hidrolizan y dan lugar a azúcares más sencillos. La mayoría de las cepas descritas en el Cuadro 1 se identificaron como levaduras, sin precisar la especie; sin embargo, se puede inferir que al menos una de las cepas podría pertenecer a la especie de *Saccharomyces cerevisiae*, lo anterior de acuerdo a Dashko y colaboradores (2014), que al trabajar con esta especie identificaron la predominancia de esta especie en las comunidades microbianas presentes en alimentos con altos contenidos de azúcar.

Mediante el ensayo de competencia se determinó interacción sinérgica entre los microorganismos de las cepas 1 y 3, a partir de lo cual se construyó un consorcio, el cual mostró buen desempeño en el proceso de fermentación, ya que se obtuvo mayor producción de etanol  $12.57 \pm 0.57$ ; lo que concuerda según lo reportado por Ponomarova et al. (2015), quienes mostraron métodos para reemplazar el metabolismo aislado de un cultivo puro contra el de las comunidades microbianas. Además determinaron conexiones entre las especies y expusieron que el intercambio de nutrientes entre los microorganismos proporciona una ventaja en la eficiencia a las comunidades microbianas.

La fermentación alcohólica espontánea, está determinada por el crecimiento de las levaduras inoculadas, la cepa aislada y denominada *c*, y las cepas en conjunto denominadas *m*, las interacciones entre las especies impacta en la producción de etanol y en el consumo de nutrientes (Fleet, 2003). En los cultivos realizados en un volumen de 100 mL, al calcular el peso seco celular de las levaduras inoculadas en el medio enriquecido con glucosa, se determinó que la fase de adaptación concluyó a la tercera hora después de su inoculación, la fase exponencial inicio llegada la hora seis.

En la evaluación del consumo de azúcares, la concentración de glucosa presente en el matraz disminuyó conforme la cepa aumentaba su crecimiento, el consumo de azúcares fue de 0.48 g a 0.03 g de la cepa *c*, y de 0.52 g a 0.06 g en la cepa *m* a lo largo de las 32 h de fermentación, aunque no se obtuvieron diferencias significativas entre el consumo de ambas; sin embargo, la producción del alcohol si fue diferente, siendo la cepa *m* la de mayor producción de etanol con 10.33% de alcohol, que es estadísticamente significativo con la cepa *c*, cuyo

contenido de alcohol fue de 12.57% (Figura 3). Renouf et al. (2006) evaluaron los niveles de fermentación entre *S. cerevisiae* y un cultivo mixto, el tiempo de consumo de azúcares fue de 20 d para *S. cerevisiae*, y para el cultivo mixto se redujo a un total de 14 d, en cuanto al porcentaje de alcohol de las muestras, *S. cerevisiae* tuvo un porcentaje de alcohol de 9%(v/v) que no resultó ser estadísticamente significativo al 8%(v/v) del cultivo mixto. Este fenómeno observado ha sido tratado por Ozilgen et al. (1991), quienes propusieron modelos matemáticos simples para simular el crecimiento bacteriano, reducir la utilización de azúcar y aumentar la producción de etanol en un proceso de fermentación espontánea.

## CONCLUSIONES

Mediante un perfil bioquímico, se aislaron siete cepas de levaduras obtenidas del raspado de tinas en las que se lleva a cabo la fermentación espontánea del mosto de agave. El ensayo de competencia se determinó en agar sangre infusión cerebro corazón, donde se observó sinergismo entre la agrupación de los microorganismos aislados de las cepas 1 y 3. Dado el sinergismo, éstas fueron elegidas para construir un consorcio microbiano.

Se evaluó la conversión de azúcares a etanol en un periodo de 32 h, encontrándose  $10.33 \pm 0.57$  en la cepa 1 y  $12.57 \pm 0.57$  en el consorcio microbiano.

## LITERATURA CITADA

- Albuquerque, M., Martín, C., Jackson, G., Ribeiro, E. (2013). Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 128, 448-456.
- Branco, P., Viana, T., Albergaria H., Arneborg N. (2015). Antimicrobial peptides (AMPs) produced by *Saccharomyces cerevisiae* induce alterations in the intracellular pH, membrane permeability and culturability of *Hanseniaspora guilliermondii* cells. *International Journal of Food Microbiology*, 205: 112-118.
- Brenner, K., You, L., Arnold, F. H. (2008). Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology*, 9: 484.
- Ciani, M., Capece, A., Comitini, F., Canonico, L., Siesto, G., Romano, P. (2016). Yeast Interactions in Inoculated Wine Fermentation. *Frontiers in microbiology*, 7: 1-7.
- Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C., Piskur, J. (2014) Why, when and how did yeast evolve into alcoholic fermentation? *14: 2-4*.
- Feichtmayer, J., Deng, L., Griebler, C. (2017). Antagonistic Microbial Interactions: Contributions and Potential Applications for Controlling Pathogens in the Aquatic Systems. *Frontiers in microbiology*, 8: 2192.
- Fleet, G. H. (2003) Yeast and wine flavor interactions. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 12-13.

- Hibbing, M., Fuqua, C., Parsek, M., Peterson, B. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, 8: 15-25.
- Höffner, K. y Barton, P. (2014). Design of Microbial Consortia for Industrial Biotechnology. *Computer Aided Chemical Engineering*, 34: 65-74.
- Ivey, M., Massel, M., & Phister, T. (2013). Microbial Interactions in Food Fermentations. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4(1), 141-162
- Martínez, L., Téllez, S., Rodríguez, G., Palos, P., Efrén, M., Cuarenta J. (2016). Producción de azúcares fermentables a partir del *Agave tequilana* weber variedad azul. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1: 226-230.
- Martino, M., Joncour, P., Leenay, R., Gillet, B., Beisel, C., Leulier, F. (2018). Bacterial Adaptation to the Host's Diet Is a Key Evolutionary Force Shaping *Drosophila*-*Lactobacillus* Symbiosis. *Cell Host and Microbe*, 24: 109-119.
- Ming, Z. D., Hao, S., En-Xu, W., Yue, L., Ying-Jin, Y. (2016). Design and construction of synthetic microbial consortia in China. *Synthetic and systems biotechnology*, 1: 232-233.
- Ozilgen, M., Çelik, M., Bozoğlu, T. (1991) Kinetics of spontaneous wine production. *Enzyme and Microbial Technology*, 13(3): 252-256.
- Pérez, E., Chávez-Parga, M. C. González, J. (2016). Revisión del agave y el mezcal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 1: 23-58.
- Ponomarova, O., Gabrielli, N., Sévin, D., Zirngibl, K., *et al.* (2017). Yeast Creates a Niche for Symbiotic Lactic Acid Bacteria through Nitrogen Overflow. *Cell Systems*, 5: 345- 357.
- Ponomarova, O. y Raosaheb, K. (2015). Metabolic interactions in microbial communities: untangling the Gordian knot. *Current Opinion in Biotechnology*, 27: 37-44.
- Renouf, V., Falcou, M, Miot, S., Perello, C., De Revel, M., Lonvaud, F. A. (2006) Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *Journal of applied microbiology*, 6: 3-7.
- Ruiz-Marín, A., Canedo-López, Y., Narváez-García, A., Robles-Heredia, J. (2016) Production of ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* coimmobilized: proposal for the use of organic waste. *Agrociencia*, 50(5): 551-563
- Sandoval-González, R., Jiménez-Islas, H., Navarrete-Bolaños, J. (2018). Design of a fermentation process for agave fructooligosaccharides production using endo-inulinases produced *in situ* by *Saccharomyces paradoxus*. *Carbohydrate Polymers*, 198: 94-100.
- Smid, E., Lacroix, C. (2013). Microbe-microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology*, 24: 148-154.

