

**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA GENOMICA**



**CENTRO DE
BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**

TESIS

**Análisis metagenómico y fisicoquímico de mostos de mezcal
Tamaulipeco**

Que para obtener el grado de:

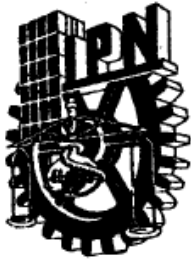
MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA

Presenta:

ELIZABETH GUADALUPE HERNANDEZ MOTA

Reynosa Tamaulipas

Diciembre de 2009



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Reynosa, Tam. el día 03 del mes Diciembre del año 2009, el (la) que suscribe Elizabeth Guadalupe Hernández Mota alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica con número de registro B071101, adscrito a Centro de Biotecnología Genómica, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. José Alberto Narváez Zapata y cede los derechos del trabajo intitulado "Análisis metagenómico y fisicoquímico de mostos de mezcal tamaulipeco", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección Bldv. del Maestro esq. con Elías Piña S/N Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710 Cd. Reynosa, Tamaulipas, México Tels. 01-899 9243627, 9251656. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Elizabeth Guadalupe Hernández Mota
Nombre y firma



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Reynosa, Tam. siendo las 12:00 horas del día 03 del mes de Diciembre del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CBG para examinar la tesis titulada:
Análisis metagenómico y fisicoquímico de mostos de mezcal tamaulipeco.

Presentada por el alumno:

<u>Hernández</u> Apellido paterno	<u>Mota</u> Apellido materno	<u>Elizabeth Guadalupe</u> Nombre(s)
Con registro:		
B	0	7 1 1 0 1

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica

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

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

Dr. José Alberto Narváez Zapata

Dra. Claudia Patricia Larralde Corona

Dr. Gaspar Manuel Párraga Bracamonte

Dra. Paulina Estrada de los Santos



Dr. Xianwu Guo

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. Alberto Mendoza Herrera

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
 CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA

El presente trabajo que lleva por título “Análisis metagenómico y fisicoquímico de mostos de mezcal tamaulipeco”, se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Industrial del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. José Alberto Narváez Zapata, y fue financiado por los Proyectos SIP-IPN:20080081 y CONACyT-BASICA 2006-57576.

INDICE

	Página
DEDICATORIA.....	xii
AGRADECIMIENTOS.....	xiv
ABREVIATURAS	xvi
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Características del mezcal	3
2.2. Historia del Mezcal.....	4
2.3. Clasificación del mezcal.....	5
2.4. Elaboración del mezcal	6
2.5. Fermentación en las bebidas alcohólicas.....	8
2.5.1. Fermentación alcohólica	8
2.5.2. Fermentación maloláctica	8
2.5.3. Otros productos de la fermentación	9
2.5.4. Factores que influyen en la fermentación alcohólica	10
2.6. Compuestos volátiles presentes en bebidas mexicanas.....	11
2.7. Principales modelos de estudio en bebidas fermentadas.....	11
2.7.1. Diversidad microbiana en vinos	12
2.7.2. Diversidad microbiana en el Vinagre Balsámico Tradicional.....	13
2.7.3. Diversidad microbiana en el pozol.....	13
2.7.4. Diversidad microbiana en el pulque.....	14
2.7.5. Diversidad microbiana en el Mezcal	14
2.8. Metagenomas y análisis de diversidad.....	16

2.8.1. Métodos de estudio de los metagenomas.....	17
2.8.2. Pasos críticos en el establecimiento de las técnicas metagenómicas	18
2.8.3. Extracción del ADN metagenómico	18
2.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	19
2.9.1. Utilización de oligonucleótidos universales para el estudio metagenómico.....	20
2.10. Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE).....	21
2.10.1. Polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP).....	21
3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. HIPOTESIS	24
5. OBJETIVOS.....	24
5.1. Objetivo General	24
5.2. Objetivos específicos	24
6. METODOLOGÍA	25
6.1. Área de estudio.....	25
6.2. Colecta del mosto	26
6.3. Análisis de la diversidad microbiana	26
6.4. Determinación de la integridad del ADN por electroforesis	27
6.5. Cuantificación del ADN obtenido	28
6.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	28
6.7. Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE)	29
6.8. Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP).....	30
6.9. Montaje de gel de SSCP y DGGE.....	31
6.10. Clonación.....	33
6.11. Tamizaje por PCR	33
6.12. Proceso de secuenciación	34

6.13. Análisis de las Secuencias	34
6.14. Análisis estadístico del patrón de bandas resultantes del DGGE y SSCP	34
6.15. Análisis fisicoquímico.....	35
6.15.1. Análisis de metabolitos principales por medio de la técnica HPLC	35
6.15.2. Determinación de proteínas.....	35
6.16. Análisis estadístico de comunidades microbianas.....	35
6.17. Análisis estadístico de los parámetros fisicoquímicos	36
6.18. Análisis de las propiedades organolépticas de los destilados producidos por los mostos.....	37
7. RESULTADOS.....	38
7.1. Características generales de las fabricas de mezcal de estudio.....	38
7.2. Extracción de ADN metagenómico con el método de silica de acuerdo a Rojas Herrera et al., (2008)	40
7.3. Determinación de la cantidad de ADN obtenido.....	41
7.4. Amplificación por PCR de la región 16S de ADN ribosomal	42
7.5. Análisis del Perfil Microbiano en la etapa activa de la fermentación de los mostos de mezcal	43
7.6. Análisis de patrones de bandas obtenidos de los geles de acrilamda	44
7.6.1. Análisis de los dendrogramas de distancias	44
7.6.2. Índice de similitud de Sorensen.....	46
7.7. Análisis filogenético	47
7.8. Análisis fisicoquímico de los mostos de estudio.....	55
7.8.1. Cuantificación de proteínas.....	55
7.8.2. Cinética de la fermentación en la mezcalera más industrializada de Sierra Chiquita.	58
7.8.3. Cinética de la fermentación en la mezcalera Los Fresnos.	59
7.8.4. Análisis de los principales metabolitos de la fermentación	60
7.8.5. Análisis de los ácidos orgánicos durante la fermentación	62

7.8.6. Análisis estadístico de los parámetros fisicoquímicos	64
7.9. Análisis de preferencia de consumo de los destilados de las mezcaleras de estudio.....	65
8. DISCUSIÓN.....	70
9. CONCLUSIONES.....	76
10. RECOMENDACIONES	77
11. GLOSARIO.....	78
12. LITERATURA CITADA.....	82
13. APENDICE	89

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estados de la república Mexicana donde producen mezcal son: 1) Oaxaca, 2) Guerrero, 3) San Luis Potosí, 4) Zacatecas, 5) Durango, 6) Guanajuato, 7) Jalisco y 8) Tamaulipas _____	4
Figura 2. Municipios productores del mezcal en Tamaulipas. 1) San Carlos, 2) San Nicolás, 3) Burgos, 4) Miquihuana, 5) Bustamante, 6) Palmillas, 7) Jaumave, 8) Tula, 9) Cruillas, 10) Jiménez y 11) Méndez (Jacques, <i>et al.</i> , 2003) _____	5
Figura 3. Etapas más importantes de la fermentación del mezcal. A). Molienda (donde se observa un trapiche artesanal a base de madera con un tornillo), B) Cocción de las piñas en un pozo artesanal, C) Fermentación de las piñas en un tanque a base de madera el cual ha sido cubierto con Cuadros y paja. D) Destilación en alambiques metálicos que han sido introducidos en un pozo cubierto por tierra _____	7
Figura 4. Ruta bioquímica resumida de la fermentación alcohólica y láctica (Bravo <i>et al.</i> , 1995) _____	8
Figura 5. Etapas básicas de la reacción en cadena de la polimerasa _____	20
Figura 6. Sitios de muestreo de los mostos de mezcal _____	25
Figura 7. Proceso de elaboración de mezcal principales diferencias en las tres mezcaleras de estudio: 1A) trapiche artesanal, 2A) barril de fermentación, 3A) Alambique de destilación, 1B) tornillo de molienda, 2B) tanque de fermentación, 3B) alambique de destilación, 1C) molino mecánico, 2C) tanques de fermentación, 3C) alambique de destilación _____	39
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de la extracción de ADN metagenómico de los mostos de estudio. A) Cinética fermentativa de la mezcalera Sierra Chiquita (MSCH). B) Cinética fermentativa de la mezcalera Los Fresnos (MFRE). C) ADN metagenómico de las etapas Activa I (AI) y Activa II (AII) de las tres mezcaleras MSCH, MELZ (Ejido el Palmar) y MFRE. _____	41
Figura 9. Amplificación de la región 16S de ADN ribosomal empleando diversos juegos de oligonucleotidos. A) Oligonucleotidos 16S universales, B) Oligonucleotidos 341F y 907R, C) Oligonucleotidos COM, D) Oligonucleotidos Lb. _____	42
Figura 10. Análisis del perfil bacteriano por medio de la técnica DGGE empleando los oligonucleotidos 16S A), B). Análisis del perfil bacteriano empleando oligonucleotidos LB por medio de la técnica SSCP. Fig. C).	

Perfil bacteriano empleando oligonucleotidos (341F y 901R) por medio de la técnica SSCP. D). perfil bacteriano empleando oligonucleotidos COM por medio de la técnica SSCP. _____	43
Figura 11. Dendrogramas de distancias euclidianas con tres variables elaborados en el programa STATISTICA 7 donde se evaluó el perfil bacteriano resultante del juego de oligonucleotidos Com1 y Com2 (A y B), 341F y 907R (C y D) LbF y LbR (E y F) y 16S (G y H) _____	45
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa, PCR de tamizaje, correspondiente a la región 16S de ADN ribosomal. Carriles 1 al 7 clonas de la fermentación de MSCH, Carriles 8-11 clonas de la fermentación de MELZ, Carriles 12 al 16 clonas correspondientes a la fermentación de MFRE _____	48
Figura 13. Dendrograma empleando secuencias obtenidas por medio de los oligonucleotidos COM en el cual se realizó un análisis de distancias filogenéticas utilizando el programa MEGA 4. (Tamura <i>et al.</i> 2007). El análisis fue inferido por el Método de UPGMA con un Bootstrap de 1000 replicones. Secuencia DQ248009 de <i>Synechococcus</i> sp. utilizada como grupo de salida. _____	51
Figura 14. Dendrograma empleando secuencias obtenidas por medio de los oligonucleotidos 341F Y 907R. En el cual se realizó un análisis de distancias filogenéticas utilizando el programa MEGA 4. (Tamura <i>et al.</i> 2007). El análisis fue inferido por el Método de UPGMA con un Bootstrap de 1000 replicones. Secuencia EU121859 de <i>Chryseobacterium</i> sp. Utilizada como grupo de salida. (Las claves con letra inicial K pertenecen a los productos de los oligonucleótidos 341F y 907R). _____	52
Figura 15. Dendrograma empleando secuencias obtenidas por medio de los oligonucleotidos Lb En el cual se realizó un análisis de distancias filogenéticas utilizando el programa MEGA 4. (Tamura, <i>et al.</i> 2007). El análisis fue inferido por el Método de UPGMA con un Bootstrap de 1000 replicones. Secuencia Z84587 de <i>Bacillus thuringiensis</i> utilizada como grupo de salida. _____	53
Figura 16. Dendrograma empleando secuencias obtenidas por medio de los oligonucleotidos 16S En el cual se realizó un análisis de distancias filogenéticas utilizando el programa MEGA 4. (Tamura <i>et al.</i> 2007). El análisis fue inferido por el Método de UPGMA con un Bootstrap de 1000 replicones. Secuencia AJ786070 de <i>Delta Proteobacterium</i> utilizada como grupo de salida _____	54
Figura 17. Concentración de proteínas en la cinética fermentativa de la mezcalera Sierra Chiquita (MSCH) y Los Fresnos (MFRE). _____	56

Figura 18. Concentración de proteínas presentes en la fermentación del mezcal en la fase activa inicial A) y activa final B) _____	57
Figura 19. Evaluación de los principales metabolitos y azúcares presentes en la fermentación de los mostos en la mezcalera de Sierra Chiquita. A) Principales metabolitos involucrados con la fermentación alcohólica. B) Ácidos orgánicos presentes _____	58
Figura 20. Azúcares residuales y metabolitos principales A), ácidos orgánicos, presentes en los mostos B) de la mezcalera Los Fresnos. _____	60
Figura 21. Evaluación de los sustratos y metabolitos principales de la fermentación alcohólica, presentes en la fermentación activa inicial A), y en la fermentación activa final B) de las diferentes mezcaleras de estudio. _____	61
Figura 22. Evaluación de los ácidos orgánicos presentes en la fermentación activa inicial A), y activa final B) de las tres mezcaleras de estudio. _____	63
Figura 23. Preferencia de consumo evaluando promedios generales de las mezcaleras Sierra Chiquita, Emilio Lozoya y Los Fresnos. _____	66
Figura 24. Consumidores que prefirieron el mezcal destilado de Sierra Chiquita. _____	67
Figura 25. Consumidores que prefirieron el mezcal destilado de Emilio Lozoya _____	68
Figura 26. Consumidores que prefirieron el mezcal destilado de Los Fresnos. _____	69
Figura 27. Relación de los principales descriptores comparativos entre las mezcaleras de estudio del estado de Tamaulipas. La dirección de las flechas y el símbolo indican mayor ó menor nivel en la característica señalada. MELZ: Mezcalera Emilio Lozoya, MFRE: Mezcalera los Fresnos, MSCH: Mezcalera Sierra Chiquita. _____	71

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Microorganismos presentes en los mostos del vino (Fleet <i>et al.</i> , 1984) _____	12
Cuadro 2. Microorganismos reportados en el Vinagre Balsamico Tradicional (Soleri, <i>et al.</i> , 2007) ____	13
Cuadro 4. Microorganismos reportados en los mostos de pozol (Díaz <i>et al.</i> , 2003) _____	14
Cuadro 5. Microorganismos reportados en el pulque (Escalante, <i>et al.</i> , 2004) _____	14
Cuadro 6. Levaduras aisladas de mostos de mezcal tamaulipeco (Jackes <i>et al.</i> , 2006) _____	15
Cuadro 7. Microorganismos aislados de mostos de mezcal de agave salmiana _____	16
Cuadro 8. Claves de los mostos colectados en las tres mezcaleras de estudio _____	26
Cuadro 9. Reactivos empleados en la PCR y condiciones finales de amplificación _____	29
Cuadro 10. Oligonucleotidos empleados para la amplificación 16S de ADN ribosomal _____	29
Cuadro 11. Reactivos empleados para la elaboración del gel de acrilamida al 10X _____	30
Cuadro 12. Componentes de la reacción de la PCR de tamizaje _____	33
Cuadro 13. Condiciones de Secuenciación _____	34
Cuadro 14. Características evaluadas por los encuestados así como para cada una se le aplicó un valor que corresponde al grado de aceptación por preferencia de consumo (División de Pruebas Sensoriales del “ <i>Institute of Food Technologists</i> ”, 1975) _____	37
Cuadro 15. Variables descriptivas que intervienen en el proceso de elaboración de mezcal en los tres lugares de estudio _____	40
Cuadro 16. Resultados de la cuantificación de ADN por espectrofotometría a 260 y 280 nm _____	41
Cuadro 17. Comparación de la etapa de fermentación activa entre las tres mezcaleras obtenida a través del índice de similaridad de Sorensen empleando matrices binarias _____	46
Cuadro 18. Identidades obtenidas de los productos de PCR del 16S en la base de datos del NCBI ____	49
Cuadro 19. Análisis estadístico de los parámetros fisicoquímicos _____	64

LISTA DEL APENDICE

	Pagina
Apendice 1. Protocolos _____	90
Apendice 2. Matrices de ausencia presencia _____	95
Apendice 3. Resultados del analisis de preferencia de consumo _____	98
Apendice 4. Curvas de calibración para análisis fisicoquímico. _____	99
Apendice 5. Secuencias en fasta _____	102

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi madre Enfermera Blanca Rosa Mota Carmona (Q.E.P.D) por haber sido paciente y responsable con mi persona y dar un buen ejemplo en su trayectoria tanto profesional como de vida.

Y al Dr. Zenón Jesús Alfonso Hernández Vargas por haber proseguido con la labor de ser mi padre.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a dios por darme licencia de estar aquí y cumplir con una etapa más de mi vida.

Al Centro de Biotecnología Genómica por haberme aceptado como estudiante de este centro.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, por haberme otorgado una beca que me permitió mi estancia y manutención en esta Ciudad Reynosa Tamaulipas.

Al Instituto Politécnico Nacional, por haberme otorgado la Beca Institucional y de esa forma me permitió completar mis estudios.

Al Dr. José Alberto Narváez Zapata por haber sido mi director de tesis por compartir sus conocimientos y consejos durante mi estancia en este centro.

A la Dra. Claudia Patricia Larralde Corona por el apoyo académico, de ayuda de trámite de papelerías y por su apoyo en diferentes circunstancias al realizar mi tesis de maestría en este instituto.

Al MC Cristian Lizarazo Ortega por impulsarme académicamente, por sus consejos, y por ayudarme a permanecer en este instituto.

Un agradecimiento al Laboratorio de Servicios especialmente al Maestro Víctor Moreno por facilitarme los aparatos tanto de HPLC y el Secuenciador Abi Prism, con los que se logró obtener algunos de los resultados de esta tesis.

A la comisión revisora de mi tesis, integrada por Dr. Xianwu Guo, Dr. Gaspar Manuel Parra Bracamonte, Dra. Paulina Estrada de los Santos, Dra. Claudia Patricia Larralde Corona y Dr. José Alberto Narváez Zapata. Por sus comentarios y sugerencias en apoyo a la realización de este trabajo.

Al Laboratorio de Biotecnología Industrial integrado por Dra. Claudia Patricia Larralde Corona, Dr. José Alberto Narváez Zapata, Amanda Oliva Hernández, Isabel Cristina Rodríguez Luna, Erika de la Cruz A, Leandro Paramo, Francisco de la Torre, Samanta Mariscal, Eliseo Trujillo, Salvador Castell y Manuel Arratia. Por sus consejos, sugerencias, críticas y demás vivencias compartidas, pero sobre todo por su amistad, paciencia y por brindarme una sonrisa todos los días, eso permitió que mi estancia fuera más amena.

A José Manuel Arratia Mireles por su apoyo incondicional en todos los sentidos

A la generación 2007-2009 Integrada por Freddy, Aldo, Diego, Fernanda, Víctor R, Víctor H, Nora, Rafa, Isabel, Diana, Carmen, Regulo, Mauricio, Manuel, Rey David.

También un agradecimiento grande a las personas que participaron entusiastamente en la encuesta del mezcal, ese estudio me aportó datos valiosos y permitió concluir con mi tesis.

A la generación 2008 con la cual lleve algunas clases y con los cuales hice amistad.

Y a cada una de las personas miembros de este plantel personal académico, administrativo y manual que me atendieron amablemente durante mi estancia en este plantel.

¡Sinceramente muchas gracias a todos!

Elizabeth Guadalupe Hernández Mota

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
μL	Microlitros
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNr	Ácido Desoxirribonucleico ribosomal
Pb	Pares de base
dNTPs	Mezcla de trifosfatos de desoxinucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
DGGE	Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante.
EDTA	Sal disódica de del ácido etilendiaminotetraacético.
EE	Error estándar.
g/L	Gramos por litro
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramo
mL	Mililitro
NaCl	Cloruro de Sodio
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Rpm	Revoluciones por minuto
SSCP	Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla.
TBE	Trizma/ácido bórico/sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético
TE	Trizma/ácido clorhídrico/sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético

RESUMEN

Análisis metagenómico y fisicoquímico de mostos de mezcal tamaulipeco

En Tamaulipas el mezcal es producido en once municipios que actualmente cuentan con la denominación de origen. En este estudio se analizaron tres mezcaleras con diferente grado de industrialización. Estas son mezcalera Sierra Chiquita localizada en el municipio de San Carlos, mezcalera de Emilio Lozoya en el municipio de San Nicolas y mezcalera Los Fresnos localizada en el municipio de Burgos. Como resultado de este análisis, se obtuvo la diversidad bacteriana de los mostos en diferentes etapas fermentativas de la elaboración del mezcal en las mezcaleras de estudio. El perfil microbiano se comparó a partir de la información obtenida por las técnicas metagenómicas DGGE y SSCP encontrándose diferencias importantes en las comunidades microbianas dependiendo del grado de industrialización de las mezcaleras. El análisis de los principales metabolitos presentes durante la fermentación reveló que la mezcalera más artesanal (Emilio Lozoya) posee una mayor fermentación maloláctica y una mejor fermentación alcohólica mientras que la más industrializada (Sierra Chiquita) produce menores cantidades de alcohol y de ácidos orgánicos. La mayoría de las bacterias identificadas pertenece a la familia Lactobacillaceae y se encuentran presentes durante la fermentación activa. Adicionalmente, se encontraron organismos de los géneros *Methylobacterium* sp. y *Acetobacter* sp., así como también bacterias pertenecientes al orden de las proteobacterias en las etapas iniciales y finales de la fermentación. Los mezcales producidos en estas mezcaleras fueron analizados utilizando una prueba de preferencia de consumo. Los resultados obtenidos muestran que el mezcal de Sierra Chiquita fue el más aceptado principalmente por sus bajos niveles de etanol.

ABSTRACT

In Tamaulipas, mezcal is produced in eleven districts that currently exhibit origin denomination. In this study were analyzed three mezcal factories with a differential industrialization degree, Sierra Chiquita localized in San Carlos region, Emilio Lozoya in San Nicolas and Los Fresnos localized in Burgos region were analyzed, the bacterial diversity in different must fermentative stages of the three mezcal factories was obtained. Microbial profile shown the use of metagenomic techniques as DGGE and SSCP, varies depending an industrialization degree of the mezcal factories. Main fermentative metabolites analysis revealed that lower industrialized mezcal factory (Emilio Lozoya) present a higher malolactica and alcoholic fermentation whereas that higher industrialized mezcal factory (Sierra Chiquita) produced lower alcohol and organic acids amounts. Most bacteria identified belong to Lactobacillaceae family and occur during active fermentation. In addition, at the beginning and final fermentation stages microorganisms of the genus *Methylobacterium* and *Acetobacter*, and some bacteria belonging to Proteobacteria order were found. Mezcal produced in these factories was assayed in a preference and showed that mezcal from Sierra Chiquita, the more industrialized factory, was more acceptable mainly for its lower alcohol contents.

1 INTRODUCCIÓN

El mezcal es una bebida tradicional mexicana. Cuya definición etimológica proviene del náhuatl *Melt* e *Ixcalli* que significan “agave cocido al horno” (Jacques *et al.*, 2006). Es definido científicamente por la (NOM-070-SCFI-1994) como "bebida alcohólica que se obtiene por la destilación y rectificación de los mostos (o jugos) preparados directamente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de los agaves, mismas que son previamente cocidas y sometidas a fermentación alcohólica". El aroma y el sabor característicos del mezcal están influenciados por la mezcla de compuestos producidos durante la fermentación y por los proporcionados por el tipo particular de agave utilizado (Escalante *et al.*, 2008). El proceso de fermentación en el mezcal se produce de manera natural por diversos microorganismos, entre los que destacan las levaduras y las bacterias. Sin embargo, a diferencia de otros procesos fermentativos como lo que ocurren en los vinos, la microflora que interviene en la fermentación alcohólica del mezcal no ha sido completamente identificada y caracterizada aun cuando este es un producto de fuerte arraigo cultural y gran importancia económica (Durán *et al.*, 2007). El proceso de fermentación en el Mezcal es más bien artesanal; sin embargo, se sabe que la especie de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es fundamental al igual que en otros procesos fermentativos (Escalante *et al.*, 2008). La originalidad del proyecto reside en que, hasta la fecha, no se conoce en detalle la microflora que interviene en el proceso de conversión del mosto del agave, así como tampoco se ha caracterizado cinética y molecularmente el aprovechamiento de azúcares, que son la materia prima fundamental en la obtención del alcohol.

Recientemente, se han desarrollado metodologías de análisis genómico ambiental, donde es posible conocer a la microflora presente en muestras ambientales, incluyendo aquellos organismos no cultivables, mediante la secuenciación y análisis filogenético de las regiones del ADN ribosomal. Por lo tanto, en este proyecto se propuso; realizar la caracterización del perfil microbiano metagenómico durante la fermentación activa de mostos en diferentes fabricas de mezcal, establecer sus características fisicoquímicas particulares y conocer la preferencia de consumo de los destilados en los mostos

seleccionados, para así finalmente relacionar los diferentes indicadores microbiológicos, fisicoquímicos y de consumo en diferentes mostos de mezcal en el estado de Tamaulipas.

2 ANTECEDENTES

2.1 Características del mezcal

El mezcal es obtenido a partir de plantas de agaves pertenecientes a la familia *Agavaceae*. En México este género es muy diverso y está representado por 136 especies de agave (Flores, *et al.*, 2005), sin embargo, el mezcal se obtiene únicamente a partir de unas cuantas especies. La bebida es producida en diferentes estados de la república mexicana (Figura 1). La mayor producción se da en el estado de Oaxaca a partir de las especies de mostos destilados del agave espadín (*A. angustifolia* haw) y/o del agave silvestre (*A. potatorum* zucc.) (Colunga *et al.*, 2006) y como detalle de su característica artesanal, esta bebida es conocida por un gusano que hay al fondo de la botella, éste es la larva de una especie que vive en las plantas de agave. En el estado de Tamaulipas esta bebida es obtenida en diferentes regiones, siendo el municipio de San Carlos el mayor productor (Figura 2). En esta entidad se emplean Agaves silvestres cuyos nombres comunes son, mezcal o maguey, lechuguilla o amole y jarcia (Jacques *et al.*, 2004). La fuente de azúcar característica de los mostos de agave es la fructosa. Esta se obtiene por hidrólisis de un tipo especial de polisacárido, la inulina, durante el proceso de cocción (Durán *et al.*, 2007). Los principales minerales que se encuentran en estos mostos son el calcio, el magnesio y el fosfato (Granados, 1993)



Figura 1. Estados de la república Mexicana donde producen mezcal son: 1) Oaxaca, 2) Guerrero, 3) San Luis Potosí, 4) Zacatecas, 5) Durango, 6) Guanajuato, 7) Jalisco y 8) Tamaulipas

2.2 Historia del Mezcal

En México antes de la conquista de forma tradicional se consumía el pulque, el cual es una bebida fermentada que se obtenía a partir de plantas de agave. En el año de 1519, a la llegada de los españoles se introdujo en México el proceso de destilación. Esta técnica fue rápidamente adoptada en la preparación de las bebidas fermentadas tradicionales y así nació para el año de 1750 en la región de Amatitán, hoy el estado de Jalisco, diferentes fermentados obtenidos de la piña de maguey. De esta forma se obtuvo el vino de agave o vino del mezcal y en la población de Tequila, Jalisco se obtuvo el tequila a partir del destilado en alambiques de la variedad de agave azul (Sanchez *et al.*, 1953).

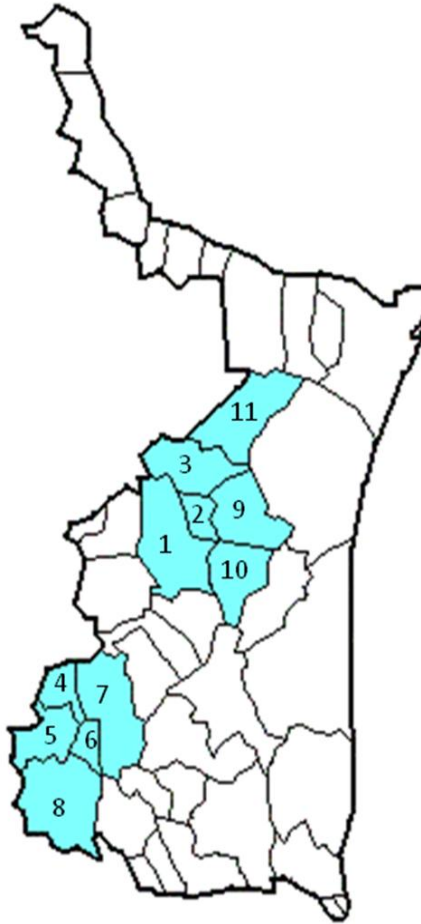


Figura 2. Municipios productores del mezcal en Tamaulipas. 1) San Carlos, 2) San Nicolás, 3) Burgos, 4) Miquihuana, 5) Bustamante, 6) Palmillas, 7) Jaumave, 8) Tula, 9) Cruillas, 10) Jiménez y 11) Méndez (Jacques, *et al.*, 2003)

2.3 Clasificación del mezcal

Para su clasificación el mezcal puede ser catalogado como sigue:

Tipo I Mezcal 100 % de agave: Este mezcal es elaborado de los mostos que contienen únicamente los azúcares que proviene de los agaves.

Tipo II Mezcal con otros azúcares: Es un mezcal elaborado a partir de un 80% de mosto de agave y un 20 % de otros azúcares.

- El plateado o blanco: Son claros y no tienen casi nada de reposo. Puede ser 100 por ciento agave o mixto.
- El dorado es Mezcal sin reposo que ha sido mezclado con caramelo. Usualmente es un mixto.

- El reposado es añejado en barriles de madera por un mínimo de 2 meses. Puede ser 100 por ciento agave o mixto.
- El Añejo se madura en barriles de madera por un mínimo de 1 año. Los mejores mixtos son madurados de 18 meses a 3 años. Los que son 100 por ciento agave maduran hasta los 4 años. Muchos productores aseguran que después de los 4 años el Mezcal pierde su sabor vegetal (Durán, *et al.*, 2007).
- El mezcal de pechuga: Es el mezcal al cual en la etapa de fermentación, se adicionan frutas: ciruela pasa, piña, chabacano y manzana; el mosto resultante, después de la destilación confiere un sabor dulce y afrutado (Ramales, *et al.*, 2002).

Finalmente, por sus diferentes propiedades, el Mezcal ha alcanzado la denominación de origen por la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI) con sede en Ginebra, Suiza.

2.4 Elaboración del mezcal

Los pasos que se siguen durante la elaboración del mezcal se detallan a continuación (Figura 3)

Selección. Se cortan las hojas del agave exponiendo la piña. Posteriormente, se parte la piña por la mitad.

Cocción. Se trasladan las piñas cortadas a un pozo que ha sido cavado previamente en la tierra que semeja un horno con brazas, dichas piñas son cocidas junto con el bagazo. La cocción se lleva a cabo para hidrolizar o transformar los fructanos en fructosa. Durante la cocción, el pozo junto con las piñas y el bagazo es tapado con lonas y tierra.

Molienda. Esta etapa tiene como finalidad hacer que los monosacáridos obtenidos en la cocción sean más disponibles a la acción microbiana, así como a la captación de microorganismos del medio para favorecer la fermentación. La molienda se lleva a cabo generalmente utilizando un molino conocido como “molino egipcio”. Este se conforma de una rueda de aproximadamente 500 kg de peso unida a un eje y que es tirada por un caballo.

Fermentación. Es el proceso en el que las levaduras transforman los monosacáridos del Agave en etanol por medio de la fermentación alcohólica. Esta operación se lleva a

cabo en tinas de madera durante un tiempo aproximado de ocho a diez días, tomando en consideración la temperatura ambiente.

Destilación. En esta operación se efectúa la separación del alcohol del agua aprovechando para ello sus diferentes puntos de ebullición. El dispositivo utilizado para la destilación es el alambique. Este equipo está conformado por cuatro elementos fabricados en cobre debido a su alta conductividad térmica, de tal forma que facilita la transferencia de calor calentándose y enfriándose fácilmente alcanzando así la temperatura apropiada de separación (Durán *et al.*, 2007).

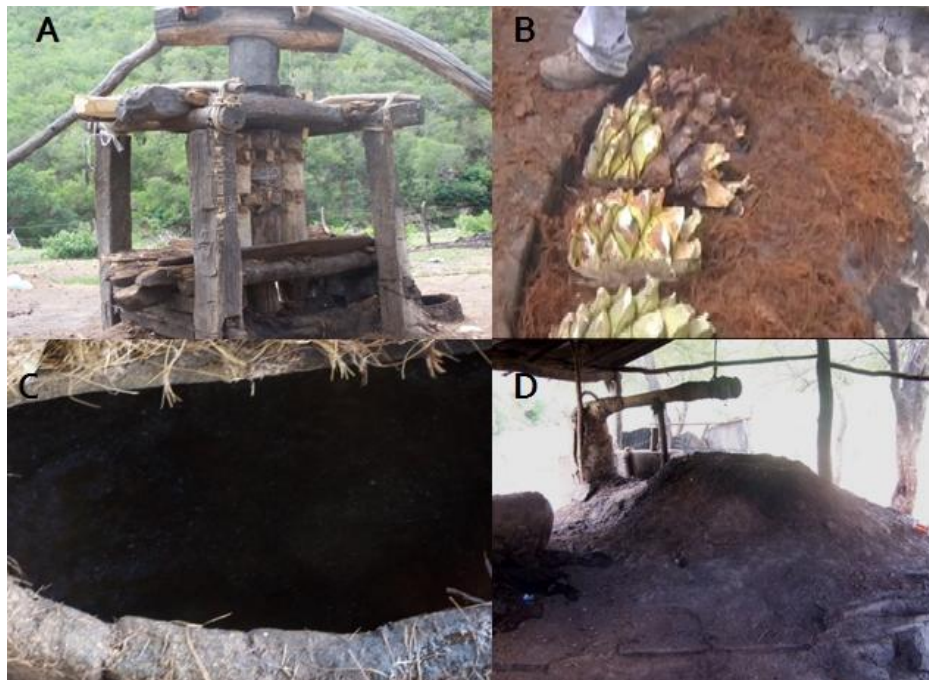


Figura 3. Etapas más importantes de la fermentación del mezcal. A). Molienda (donde se observa un trapiche artesanal a base de madera con un tornillo), B) Cocción de las piñas en un pozo artesanal, C) Fermentación de las piñas en un tanque a base de madera el cual ha sido cubierto con Cuadros y paja. D) Destilación en alambiques metálicos que han sido introducidos en un pozo cubierto por tierra

2.5 Fermentación en las bebidas alcohólicas

2.5.1 Fermentación alcohólica

Podemos definir a este tipo de fermentación como el proceso bioquímico por el cual las levaduras transforman los azúcares del mosto en etanol y CO₂ (Zambonelli, 1988; Navarre, 1994). Para que la fermentación alcohólica tenga lugar, el mosto debe hallarse en condiciones de limitación de oxígeno. Bajo estas condiciones las levaduras realizan la degradación de los azúcares de forma incompleta generando etanol, CO₂ y energía. El rendimiento en biomasa de estas levaduras es de tan sólo 1 g por cada 100 g de azúcares consumidos (Mesas y Alegre, 1999). La secuencia de reacciones enzimáticas por las que las levaduras transforman los azúcares en etanol y CO₂ se detalla en la figura 4 (Peynaud, 1989; Navarre, 1994).

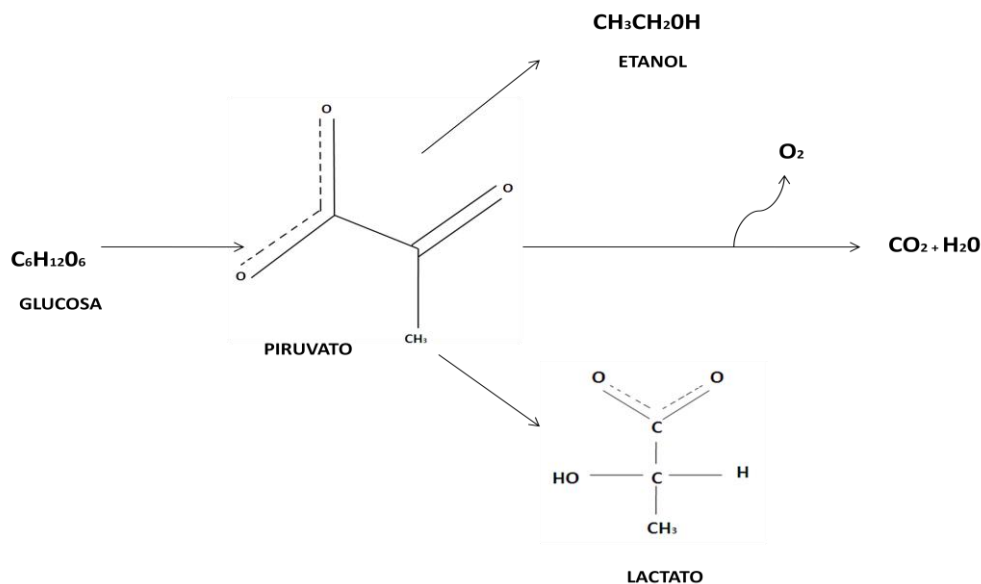


Figura 4. Ruta bioquímica resumida de la fermentación alcohólica y láctica (Bravo *et al.*, 1995)

2.5.2 Fermentación maloláctica

Es un proceso llevado a cabo por las bacterias lácticas y consiste en la transformación del ácido málico del vino a ácido láctico más CO₂, de ahí el nombre de maloláctica (Mesas y Alegre, 1999). El ciclo bacteriano de este tipo de fermentación está

dado por tres fases; la fase de multiplicación en la cual las bacterias se multiplican en paralelo con las levaduras. La producción de etanol y el consumo de nutrientes por parte de las levaduras paralizan el crecimiento bacteriano. Posteriormente, sigue una fase de latencia donde las bacterias se adaptan al medio esperando mejores condiciones de desarrollo. Finalmente, prosigue otra fase de multiplicación bacteriana que es influenciada por la temperatura y caracterizada por alcanzar hasta 1×10^6 bacterias/ml y por la disminución y/o eliminación de las levaduras. En este punto inicia la fermentación láctica que termina hasta el agotamiento del ácido málico (Mesas y Alegre, 1999).

2.5.3 Otros productos de la fermentación

La mayoría de estos productos se han caracterizado en el vino y a continuación se describen los más importantes (Mesas y Alegre., 1999).

Glicerol. Cuantitativamente es el segundo componente mayoritario del vino después del etanol. Se encuentra en cantidades de 6 a 10 g/L y se le atribuyen los caracteres de suavidad y aterciopelado. Se genera a partir de la fosfodihidroxiacetona por reducción y defosforilación de la misma.

Acetaldehído. Aparece durante la fermentación alcohólica por descarboxilación del ácido pirúvico, aunque también puede proceder de la oxidación del etanol. En exceso provoca el fenómeno de maderización o gusto oxidado.

Ácido acético. Componente mayoritario de la acidez volátil, se produce por la condensación de dos moléculas de acetaldehído, aunque puede tener otros orígenes no relacionados con la fermentación alcohólica. En exceso transmite al vino gusto a picado.

Ácido succínico. Presente siempre en el vino transmite a éste el típico sabor entre salado y amargo que caracteriza a las bebidas fermentadas. Procede de la carboxilación del ácido pirúvico y posteriores reacciones redox.

Acido láctico. Procede de la hidrogenación del pirúvico. Se produce en la fermentación láctica por causa de bacterias lácticas.

Acetoína, diacetilo y 2-3 butanodiol. Son los metabolitos del ciclo diacetil-acetoínico. Siempre presentes en el vino, en exceso transmiten sabores lácteos y amargos

no deseables. Tienen su origen en la condensación y descarboxilación de dos moléculas de ácido pirúvico.

Otros compuestos. Con origen en los azúcares se forman diversos ácidos cuantitativamente minoritarios como cítrico, propiónico, fumárico y fórmico. Con origen en las sustancias nitrogenadas se forman alcoholes superiores como isoamílico e isopropílico que proceden de la desaminación y descarboxilación de los aminoácidos. Por combinación entre ácidos y alcoholes se generan ésteres con fuerte repercusión en el buqué final del vino, siendo el acetato de etilo el que tiene una repercusión mayor.

2.5.4 Factores que influyen en la fermentación alcohólica

Temperatura. Se conoce que a mayor temperatura la fermentación alcohólica transcurre de forma más rápida, sin embargo el proceso es menos puro. Se produce menos etanol y más cantidad de compuestos secundarios que a menudo no conllevan a mejorar la calidad de la bebida fermentada. Por otro lado las levaduras se desarrollan óptimamente a los 30° C. Por arriba de esta temperatura la actividad decrece rápidamente y en torno a los 45° C mueren. Por debajo de 10° C la mayor parte de las levaduras silvestres son inactivas (Navarre, 1994).

Oxígeno. Aunque la fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico las levaduras mantienen una leve respiración utilizando para ello el oxígeno combinado en las moléculas del mosto. En caso de carencia de este oxígeno pueden requerirse remontados de mosto con aireación para evitar la parada de la fermentación alcohólica (Navarre, 1994).

Nutrientes. Por un lado están los azúcares, que son fuente de carbono y de energía para las levaduras y que deben encontrarse en concentración superior a 20 g/L para que la fermentación alcohólica transcurra a su velocidad máxima. Por otro están las sustancias nitrogenadas, las sales y los factores de crecimiento (vitaminas) que normalmente se hallan en el mosto en concentración suficiente para el desarrollo de las levaduras (Navarre, 1994).

Compuestos químicos de acción negativa. Se conoce que la acumulación de los propios productos de la fermentación alcohólica pueden ralentizarla. Por otro lado, esos mismos compuestos junto a otros presentes en el mosto de forma natural (taninos) o

artificial (pesticidas, SO₂) pueden actuar como inhibidores del crecimiento de las levaduras (Navarre, 1994).

2.6 Compuestos volátiles presentes en bebidas mexicanas

Benn y Peppard (1996) analizaron por medio de cromatografía de gases y espectrofotometría de masas (GC-MS) los compuestos del tequila en los cuales se encontraron más de 175 componentes que se clasificaron en acetales, ácidos, alcoholes, aldehídos, ésteres, furanos, fenoles, pirazinas, compuestos sulfurados y terpenos, entre otros. La composición de orgánicos volátiles en tequilas blancos, reposados y añejos como descriptores de aromas fue estudiada por López y Dufor (2001). Otros autores realizaron un seguimiento de los compuestos volátiles durante el cocimiento del *Agave tequilana* encontrándose que el tequila presenta menor variabilidad en comparación con otras bebidas alcohólicas como el mezcal y el sotol (Lachenmeier *et al.*, 2006). De León Rodríguez y colaboradores (2006) identificaron 37 componentes en 16 mezcaleras del estado de San Luis Potosí siendo 9 de ellos componentes mayoritarios a los alcoholes saturados. Entre estos podemos mencionar al acetato de etilo, el 2 hidroxipropanoato de etilo y el ácido acético. Finalmente, se identificaron 85 componentes en extractos orgánicos por medio de la técnica de Cromatografía de gases de las diversas mezcaleras, así mismo se encontraron como compuestos mayoritarios los alcoholes, los esterés y los ácidos orgánicos.

2.7 Principales modelos de estudio en bebidas fermentadas

En la literatura si nos referimos a bebidas alcohólicas se pueden encontrar en mayor medida estudios enfocados a la caracterización microbiana en mostos de uva, a través de técnicas taxonómicas-morfológicas, bioquímicas, además del empleo de técnicas moleculares, tales como PCR, DGGE y análisis de compuestos volátiles por medio de cromatografía de gases y HPLC para la obtención de metabolitos presentes en el proceso de fermentación. (Fleet, 2003). Por lo que se puede decir que es uno de los modelos de estudio más completos que se tiene en bebidas.

A continuación se presentan los principales modelos de estudio que se han llevado a cabo en bebidas fermentadas, tales como vino, vinagre balsámico tradicional, pulque, mezcal, y pozol.

2.7.1 Diversidad microbiana en vinos

La mayoría de los estudios se han realizado en vinos, por lo que ya se ha descrito la diversidad microbiana presente en esta bebida. Entre los organismos que se conocen destacan levaduras de los generos *Saccharomyces* y *Pichia*, en el caso de las bacterias destacan microorganismos del genero *Lactobacillus* (Cuadro 1).

Cuadro 1. **Microorganismos presentes en los mostos del vino (Fleet *et al.*, 1984)**

Levaduras	Bacterias ácido lácticas
<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>Leuconostoc oenos</i>
<i>Pichia terricola</i>	<i>Pediococcus cerevisiae</i>
<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.
<i>Pichia kluyveri</i>	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	
<i>Rodotorula</i> spp.	
<i>Rodotorula glutinis</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<i>Saccharomyces fermentati</i>	
<i>Saccharomyces bayanus</i>	
<i>Torulopsis stellata</i>	

Los mostos empleados en la fermentación del vino se caracterizan por su elevado contenido inicial de glucosa. Entre los productos más importantes presentes destacan el etanol, el acetato, lactato, diacetil acetoina y 2, 3 butanodiol (Fleet *et al* 1984).

2.7.2 Diversidad microbiana en el Vinagre Balsámico Tradicional

El vinagre balsámico tradicional se caracteriza por su elevada cantidad de solutos solubles (75 %), bajos niveles de fermentación alcohólica y altos niveles de fermentación maloláctica (Solieri, 2007). La mayoría de las levaduras presentes cae dentro del género de las *Zygosaccharomyces* aunque también se han identificado microorganismos del género *Saccharomyces* (Cuadro 2):

Cuadro 2. Microorganismos reportados en el Vinagre Balsámico Tradicional (Solieri, *et al.*, 2007)

Levaduras	
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<i>Hanseniaspora osmophila</i>
<i>Z. rouxii</i>	<i>Candida lactis</i>
<i>Z. pseudorouxii</i>	<i>C. Stellata</i>
<i>Z. mellis</i>	<i>Saccharomyces ludwigii</i>
<i>Z. bisposus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Z. lentus</i>	

2.7.3 Diversidad microbiana en el pozol

En el pozol, una bebida fermentada tradicional mexicana, los mostos se caracterizan por su elevada viscosidad producida por la acumulación de exopolisacáridos. Esta bebida posee tres tipos de fermentación: Alcohólica, maloláctica y la viscosa, y se ha logrado aislar bacterias ácido lácticas del tipo amilolíticas como las reportadas en el Cuadro 3.

Cuadro 3 Microorganismos reportados en los mostos de pozol (Díaz et al., 2003)

Bacterias
<i>Streptococcus bovis</i> ,
<i>Streptococcus infantarius</i> ,
<i>Streptococcus macedonicus</i> ,
<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Enterococcus sulfureus</i> .

2.7.4 Diversidad microbiana en el pulque

De esta forma la diversidad microbiana en el pulque se caracteriza por contener microorganismos con un elevado potencial de viscosidad ya que sobreacumulan exopolisacaridos (EPS). Durante la fabricación de esta bebida existen tres tipos de fermentación; la fermentación alcohólica, fermentación maloláctica y fermentación viscosa. De igual forma durante la fermentación se han reportado los siguientes microorganismos (Cuadro 4).

Cuadro 4 Microorganismos reportados en el pulque (Escalante, et al., 2004)

Bacterias	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Microbacterium arborescens</i>
<i>L. acetotolerans</i>	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>
<i>L. hilgardii</i>	<i>Acetobacter pomorium</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	<i>Hafnia alvei</i>

2.7.5 Diversidad microbiana en el Mezcal

La microdiversidad en el mezcal ha sido pobremente caracterizada. De esta forma se conocen solo algunas especies de levaduras como las reportadas en la Cuadro 5 (Jackes et al., 2003) y algunas especies de bacterias principalmente del genero *Lactobacillus* sp. (Escalante et al., 2008).

Cuadro 5. Levaduras aisladas de mostos de mezcal tamaulipeco (Jackes *et al.*, 2006)

Levaduras del mezcal	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
<i>C. guillermondii</i>	<i>C. santamariae</i>
<i>Rodotorula glutinis</i>	<i>Pichia norvegensis</i>
<i>C. colliculosa</i>	<i>Galactomyces reessi</i>
<i>C. crusei</i>	<i>Clavispora lucitaniae</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>C. conglobata</i>
<i>C. norvegensis</i>	<i>Pichia mexicana</i>
<i>Geotrichum penicillatum</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>
<i>C. inconspicua</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>C. lucifaniae</i>	<i>Ustilago alcomii</i>
<i>C. magnoliae</i>	<i>Galactomyces geotrichum</i>
<i>Pichia guillermondii</i>	<i>Pichia membranaefaciens</i>

En un estudio realizado por Durán *et al.*, (2004) se describió en mostos de mezcal del estado de Oaxaca, la identificación convencional de diferentes especies de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, y abundantes especies del género *Candida* sp., además de especies de *Cryptococcus* sp, *Rhodotorula* sp y *Kloeckera* sp. Dichos autores discuten que la gran diversidad encontrada influye en la calidad organoléptica final del producto. No obstante a lo anterior, un análisis más detallado de los microorganismos presentes en los mostos de mezcal incluyendo a las bacterias permanece por ser investigado. Otros autores confirman la presencia de una mezcla compleja de compuestos volátiles, como ácidos, alcoholes, ésteres y terpenos, los cuales son componentes importantes para el espíritu y aroma de esta bebida fermentada (De Leon *et al.*, 2008; Lachenmeier *et al.*, 2006). Uno de los últimos estudios realizados en mezcal es el de la fermentación del mezcal de *Agave salmiana*, en el cual pudieron identificarse y caracterizarse genéticamente 11 microorganismos por métodos cultivables. (Escalante *et al.*, 2008)

Cuadro 6. Microorganismos aislados de mostos de mezcal de agave salmiana

Levaduras	Bacterias
	<i>Zymomonas mobilis subsp.</i>
<i>Clavispora lusitaniae</i> ,	<i>Zymomonas mobilis subsp. pomaceae</i>
<i>Pichia fermentans</i>	<i>Weissella cibaria</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Weissella paramesenteroides</i>
	<i>Lactobacillus pontis</i>
	<i>Lactobacillus kefir</i>
	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	<i>Lactobacillus farraginis.</i>

2.8 Metagenomas y análisis de diversidad

Se estima que aproximadamente el 1 % de los microorganismos existentes son cultivables con las metodologías y medios disponibles, lo cual significa que apenas estamos comenzando la verdadera exploración de la diversidad biológica. Para ello, se requiere utilizar herramientas moleculares, que sean capaces de obtener el material genético de todos los organismos presentes en un nicho determinado (mejor conocido como metagenoma), clonarlos y diferenciarlos individualmente. Este enfoque no solamente permite conocer la diversidad biológica, sino también explorar la existencia de actividades bioquímicas novedosas o incrementadas (Handelsman *et al.*, 2002).

El análisis del metagenoma se ha centrado comúnmente en muestras de suelo (Berry *et al.*, 2003), sin embargo, han sido reportadas metodologías para ambientes marinos (Narváez-Zapata *et al.*, 2005), y para alimentos fermentados como el pulque (Escalante *et al.*, 2004). Es por ello que, con el desarrollo en los últimos años de metodologías de análisis genómico ambiental, es posible conocer a la microflora presente en muestras ambientales, incluyendo aquellos organismos no cultivables, mediante la secuenciación y análisis filogenético de la región 16S del ADNr (en el caso de arqueos y eubacterias) y del 18S ADNr en el caso de la microflora eucariótica.

2.8.1 Métodos de estudio de los metagenomas

El estudio de las comunidades microbianas se ha realizado tradicionalmente a través del empleo de los llamados “métodos cultivables”, los cuales involucran el aislamiento y cultivo de las diferentes especies de microorganismos presentes (Weidner *et al.*, 1995). Sin embargo, diversos trabajos indican que el empleo de este tipo de métodos solo garantiza hasta un 10% del total de los microorganismos presentes en las comunidades de estudio (Amman *et al.*, 1995). Lo anterior ha ocasionado que se implementen métodos que no involucren el aislamiento de los microorganismos de la comunidad, los llamados “métodos no cultivables”. Entre estos últimos, destacan los métodos que involucran técnicas bioquímicas y moleculares, estas últimas han facilitado el estudio de comunidades naturales de bacterias y la identificación de funciones importantes entre ellos (Lovell *et al.*, 2000).

Dentro de los métodos bioquímicos “no cultivables” utilizados para identificación de microorganismos se encuentra el análisis de ácidos grasos fosfolipídicos (PLFA, por sus siglas en inglés) el cual ha sido usado para monitorear cambios en comunidades microbianas, para detectar grupos específicos de microorganismos, y para correlacionar biogeoquímicamente procesos fisiológicos con poblaciones específicas (Küsel *et al.*, 1999).

Dentro de las técnicas moleculares “no cultivables” utilizadas destaca el uso de las secuencias de rADN, las cuales además tienen la ventaja de caracterizar con una mayor resolución a los microorganismos presentes en las comunidades, por lo cual se han podido establecer relaciones filogenéticas entre las diferentes clases de especies. Además, utilizando la información de la secuencia de rADN es posible diseñar pruebas específicas contra grupos particulares de microorganismos, lo que permite estudiar con mayor eficiencia los cambios de las comunidades bajo condiciones naturales (Hurt *et al.*, 2001).

El uso de las técnicas que involucran al rADN se ha visto favorecido por la implementación de la “Reacción en Cadena de la Polimerasa” (PCR). El acoplamiento del PCR con el rADN ha dado lugar a una gran variedad de métodos para estudiar microorganismos en comunidades naturales, entre los que destacan la electroforesis en gel de gradiente desnaturante o DGGE por sus siglas en inglés y la técnica de SSCP (Muyzer *et al.*, 1992).

2.8.2 Pasos críticos en el establecimiento de las técnicas metagenómicas

Dentro de las técnicas moleculares no cultivables, existen tres pasos críticos para realizar el análisis: la extracción de ADN, la reacción en cadena de la polimerasa y la separación de las subunidades de 16S rADN por electroforesis en un gel de acrilamida no desnaturalizante.

2.8.3 Extracción del ADN metagenómico

La aplicación de las técnicas de biología molecular para el análisis de genomas complejos depende de la habilidad para manipular el ADN, lo que requiere de su aislamiento y purificación. Se han establecido gran variedad de protocolos para la extracción de ADN, sin embargo la mayoría de estos tienen etapas en común, consistiendo generalmente en dos partes: una técnica para romper las paredes celulares y solubilizar el ADN, seguido por un método enzimático o químico para remover la contaminación por proteínas y otras macromoléculas (Ausubel *et al.*, 2002).

El análisis del ADN derivado de microorganismos en suelos está basado en la lisis *in situ* de células o por la extracción de ADN de células previamente aisladas del suelo. La última estrategia mencionada es específica para ADN procariote, y provee largos fragmentos de ADN con alto grado de pureza. La lisis directa *in situ* tiene el potencial para evitar problemas de representatividad, permitiendo que las células de todos los grupos de microorganismos sean disueltas en igual proporción. Un problema que se presenta durante la extracción de ADN de bacterias asociadas a sedimentos es que los ácidos húmicos y otros contaminantes del suelo son co-extraídos con el ADN. Puesto que estas sustancias pueden afectar severamente los análisis moleculares subsecuentes, es crucial que la etapa de purificación sea eficiente (Tebbe y Vahjen, 1993). Experimentos preliminares usando un rango de diferentes tipos de suelos, han demostrado que los protocolos de extracción y purificación tienen que ser cuidadosamente ajustados al tipo de suelo ó sedimento (Frostegård *et al.* 1999).

2.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es un rápido procedimiento usado para amplificar un segmento específico de ADN, técnica análoga al proceso de replicación del ADN que tiene lugar en las células. Este método es la técnica en biología molecular que más se ha utilizado en esta área en los últimos años. Una de las razones de su éxito es la simplicidad de la reacción y la facilidad para realizar cada una de las etapas, por lo que es usada en análisis de ADN y en los análisis de los procesos celulares y moleculares (Walker y Rapley, 2000).

Las aplicaciones de esta técnica son muy diversas, estas incluyen la clonación directa del ADN genómico o ADN complementario, mutagénesis *in vitro* e ingeniería del ADN, ensayos para detectar la presencia de agentes infecciosos, diagnósticos prenatales o enfermedades genéticas, análisis de la variación de secuencias alélicas y la secuenciación directa del ADN genómico y complementario (Ausubel *et al.*, 2002). Para su implementación es necesario conocer las secuencias del ADN que flanquean el fragmento que se desea amplificar, y a partir de esta información, se pueden sintetizar químicamente los oligonucleótidos oligonucleotidos o “oligonucleotidos” complementarios a cada una de las hebras de la doble hélice de ADN. Los reactivos requeridos para la PCR incluyen la enzima *Taq ADNpolimerasa*, los eslabones de las hebras de ADN ó deoxiribonucleósidos trifosfatos (dNTP's) y al amortiguador apropiado para la enzima, el cual es generalmente optimizado con diferentes concentraciones de magnesio, un cofactor de la reacción de polimerización. Este último elemento es uno de los componentes críticos de la PCR, ya que no solo afecta a la enzima, sino también al ensamblaje de los oligonucleótidos (Walker y Rapley, 2000).

La técnica de PCR incluye tres etapas críticas definidas por tiempos y temperaturas específicas: 1) desnaturalización 2) alineación y 3) extensión (Figura. 5). Cada una de estas etapas es repetida 30-40 veces en ciclos térmicos. En el primer ciclo la doble hebra template ó molde es desnaturalizada por calor a una temperatura de 90° C, al separarse las dos hebras de ADN, la región de interés por ser amplificada se vuelve más accesible. La mezcla de reacción es enfriada a una temperatura entre 40 y 60° C permitiendo que el grueso de las hebras se mantenga separadas, pero a la vez, permitiendo la hibridación de las secuencias pequeñas más homologas presentes, en este caso los oligonucleótidos

adicionados, los cuales se encuentran presentes en exceso. Durante la última etapa caracterizada por la temperatura a 72° C, se lleva a cabo la extensión del nuevo ADN, mediante la acción de una ADNpolimerasa termoestable, la Taq ADNpolimerasa (Walker y Rapley 2000).

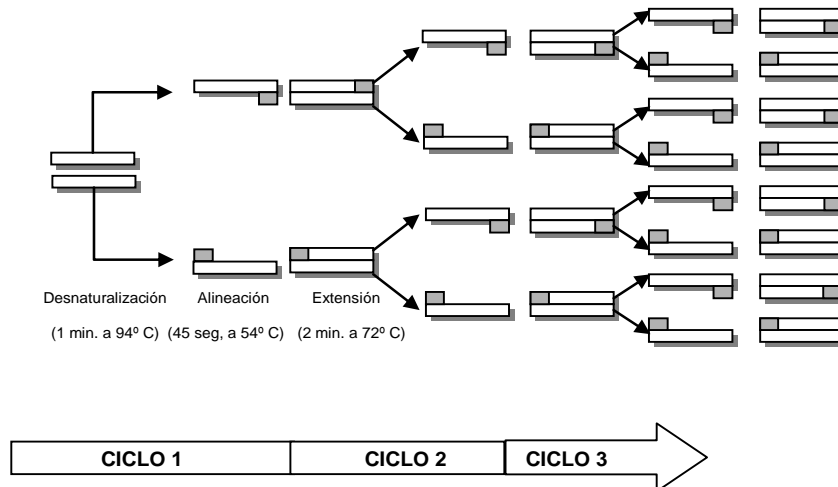


Figura 5. Etapas básicas de la reacción en cadena de la polimerasa

2.9.1 Utilización de oligonucleótidos universales para el estudio metagenómico

A partir de la información contenida en el banco mundial de genes (GenBank) que actualmente posee 38,989,342,565 bases es posible localizar regiones conservadas (altamente homologas) entre los diferentes tipos de organismos. Dentro de estas regiones destacan para su estudio, a través de filogenia molecular, las subunidades pequeñas ribosomales de los diferentes organismos. Tal es el caso de las regiones V4 y V5 que contienen secuencias cortas presentes en la mayoría (80%) de los organismos reportados en el GenBank (Schmalenberger *et al.*, 2001). La secuencia de ADNr que constituye esta región posee secuencias con diversos grados de conservación que van desde ligeramente conservadas a altamente conservadas. Sin embargo, la secuencia de ADNr entre ambas regiones (V4 y V5) es muy divergente. De acuerdo a lo anterior se han desarrollado diversos juegos de oligonucleótidos “universales” de la región altamente conservada para amplificar por PCR la región interna divergente. Dicha amplificación puede ser llevada a cabo en condiciones altamente específicas, para asegurar la amplificación exclusiva de la secuencia V4 y V5 de la subunidad pequeña ribosomal, y los productos de PCR resultantes

pueden ser analizados con técnicas de electroforesis especiales para detectar los pequeños cambios resultantes de la región interna divergente en los diferentes organismos analizados (Schmalenberger *et al.*, 2001).

2.10 Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE)

La PCR-DGGE ha emergido como uno de los métodos moleculares de cultivos independientes más prometedores para estudiar el perfil de la ecología microbiana de los hábitats y esto ha sido aplicado en alimentos y bebidas, incluyendo el vino. (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004). Esta técnica forma parte del grupo de técnicas metagenómicas conocidas como métodos de rastreo molecular, debido a que permite discernir diferencias entre moléculas. Esta técnica permite separar mezclas de productos de PCR que son de la misma longitud pero que difieren en su secuencia. El poder de separación de este tipo de electroforesis se basa en que el comportamiento de desnaturalización del ADN está determinado de manera importante por la secuencia de nucleótidos que posee. Al correr el ADN en el gel, la molécula se mantiene como doble cadena hasta que alcanza la concentración o temperatura óptima desnaturalizante, reduciendo consecuentemente su movilidad en el gel (Hill *et al.*, 2000). En teoría, cualquier gen de ADN_r que se encuentre en la mezcla de ADN total de la comunidad puede ser amplificado por PCR y resuelto en un gel de DGGE, ya que este tipo de análisis considera cada producto de PCR como una especie distinta y su intensidad en el gel es tomada como un reflejo probable de la abundancia de esta especie en la comunidad (Muyzer *et al.*, 1993).

2.10.1 Polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP)

Esta técnica se basa fundamentalmente en el plegamiento molecular de la cadena de ADN sencilla, lo que altera la velocidad de migración de las moléculas. El análisis de SSCP requiere de una temperatura baja, y una electroforesis no desnaturalizante para mantener una sola cadena de ADN. La capacidad discriminadora y reproducibilidad de SSCP, que generalmente es más eficaz para fragmentos de hasta 400 pb en tamaño, depende de la posición de la variación de la secuencia del gen estudiado (Lessa y Applebaum, 1993; Vaneechoutte, 1996). La técnica de SSCP se ha utilizado para analizar

la toma de huellas genéticas de comunidades microbianas y la identificación de microorganismos no cultivables de diversos ecosistemas. (Peters *et al.*, 2000; Stach *et al.*, 2001). Por ejemplo, ha sido utilizado con éxito para analizar la secuencia de ADN microbiano de suelos de la rizosfera (Stach *et al.*, 2001).

Las técnicas de DGGE y SSCP han permitido la identificación de bacterias ácido lácticas en productos fermentados (Pérez *et al.*, 2005). A través de esta técnica se ha podido distinguir entre diferentes cepas de un grupo de *Saccharomyces spp*, en uvas y mostos de vino. De esta forma se han identificado numerosas cepas aisladas, tales como *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus* y *S. cerevisiae* (Manzano *et al.*, 2003).

3 JUSTIFICACIÓN

El Mezcal ha alcanzado, al igual que otras importantes bebidas como el Cognac, el Champagne y el Porto, la denominación de origen, ya que sólo es posible obtenerlo en una determinada región. Su registro se hizo efectivo a partir del 9 de Marzo de 1995 por la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI) con sede en Ginebra Suiza. No obstante a lo anterior, es muy poco lo que se conoce a cerca de sus propiedades y particularmente de los microorganismos involucrados en su proceso de elaboración.

El conocimiento de la microdiversidad en este proceso fermentativo puede ayudar a mejorar las características organolépticas y de producción del mezcal. Lo anterior puede apoyar al posicionamiento de esta bebida en el mercado internacional en forma similar al status que tiene el Tequila.

4 HIPOTESIS

El establecimiento del perfil microbiano metagenómico de la fermentación activa del mezcal así como el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de los mostos en relación a las propiedades organolépticas y de consumo de los destilados en mezcales de diferentes fabricas del estado de Tamaulipas puede contribuir a un mejor conocimiento de la diversidad del mezcal en relación a su denominación de origen y también en el mejoramiento de las propiedades organolépticas de esta bebida.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Relacionar el perfil microbiano, las propiedades fisicoquímicas con las preferencias de consumo de los destilados en diferentes mezcales obtenidos del estado de Tamaulipas.

5.2 Objetivos específicos

1. Analizar fisicoquímicamente por medio de la técnica de HPLC y espectrofotometría, los diferentes mostos de mezcal obtenidos en diferentes mezcaleras del estado de Tamaulipas.
2. Obtener el ADN metagenómico en los diferentes mostos seleccionados para su la caracterización del perfil microbiano.
3. Analizar el perfil de microorganismos mediante la técnica de DGGE y SSCP en los diferentes mostos seleccionados.
4. Analizar las secuencia de la región 16S del ADN ribosomal obtenida de los perfiles metagenómicos bacterianos.
5. Comparar la diversidad microbiana obtenida durante la fermentación activa entre las mezcaleras con diferente grado de industrialización.
6. Evaluar el nivel de preferencias de consumo de los destilados obtenidos a partir de las mezcaleras con diferente grado de industrialización.

6 METODOLOGÍA

6.1 Área de estudio

Se seleccionaron tres lotes de producción de mezcal a partir de los diferentes sitios de producción ubicados en estado de Tamaulipas. Las localidades potenciales son: Los Fresnos (MFRE) y Sierra Chiquita (MSCH, municipio de San Carlos), Emilio Lozoya (MELZ, Ejido el Palmar municipio de San Nicolás). La selección final de los lotes a muestrear dependió de los tiempos de producción en dichas fábricas.

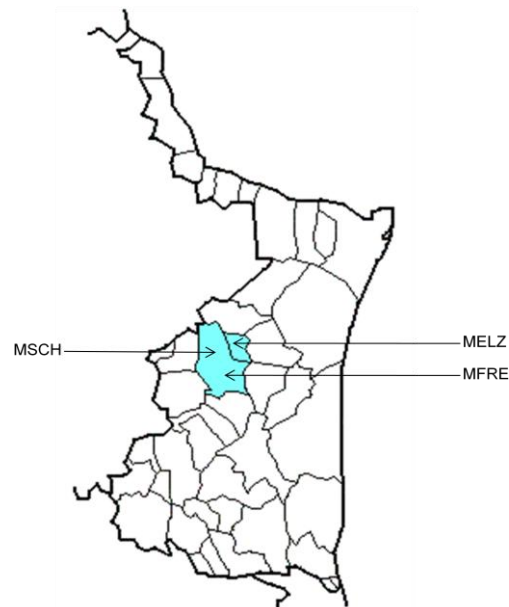


Figura 6. Sitios de muestreo de los mostos de mezcal

Se realizó una encuesta de campo detallando las características de producción más evidentes en cada mezcalera y se registro fotográficamente el proceso de elaboración del mezcal en las mezcaleras seleccionadas.

6.2 Colecta del mosto

Los mostos se colectaron durante la fermentación activa en las diferentes localidades seleccionadas. Se tomaron 3 muestras de 50 ml por mezcalera a través de una sonda colocada en la salida de espuma de la tina para impedir el paro de la fermentación. Las muestras se transportaron en frío e inmediatamente fueron almacenadas a -70°C en un ultracongelador.

Cuadro 7 Claves de los mostos colectados en las tres mezcaleras de estudio

Claves de estudio	Tipo de elaboración	Significado	Coordenadas (GPS)
MSCH	Industrial	Mezcalera Sierra Chiquita	Altitud 436m N24° 34.990', W098°56.277'
MELZ	Artesanal	Mezcalera Emilio Lozoya/ Ejido el Palmar	Altitud 437m N24° 43.189', W098°52.954'
MFRE	Artesanal	Mezcalera Los Fresnos	Altitud 348m N24° 28.671' W098°53.476'

6.3 Análisis de la diversidad microbiana

Se extrajo el ADN metagenómico presente en los mostos de mezcal, empleando el protocolo propuesto por Rojas-Herrera (2008), el cual fue desarrollado para la extracción de ADN a partir de comunidades bacterianas con altas cantidades de polisacáridos. El método fue inicialmente desarrollado a partir de dióxido de silicio y se basa en que el ADN pueden unirse a este compuesto en presencia de altas concentraciones de sales caotrópicas como el ioduro de sodio. Dichas sales tienen la capacidad de desnaturalizar proteínas interfiriendo con su estructura terciaria (Ausubel *et al.*, 2002).

Para la aplicación de este protocolo se procedió primero a enriquecer la muestra de mostos con ADN bacteriano, ya que dicha muestra presenta material genómico de la planta, las levaduras y las bacterias presentes. Para realizar este enriquecimiento, primero se fracciono el ADN como sigue: A partir de 1 ml de mosto (Fase T1) se realizó una pequeña centrifugación preparativa donde el sobrenadante (T2), la pastilla de esta centrifugación fue

T3 y el sobrenadante T2 filtrado con una membrana de 45µm fue T4. Las centrifugación y filtrados se diseñaron para separar las fracciones de material microbiano con respecto a la materia orgánica (fibrosa) de la planta. Todas estas fases se evaluaron por separado para conocer la pureza y concentración del ADN resultante, así como para conocer la carga de ADN microbiano presente a través de oligonucleótidos bacterianos universales. Los resultados preliminares permitieron establecer a la fase T2 como la más enriquecida con ADN microbiano para continuar con los análisis como se describe a continuación:

Para la extracción del ADN metagenómico se tomó una muestra de 150µl del sobrenadante (T2) y se le agregó 1 µl de lizosima dejando incubar 5 min a temperatura ambiente. En seguida se agregaron 100µl de SDS 20%, y se agitó vigorosamente por un minuto para dejarlo en incubación a temperatura ambiente por 30min (agitación cada 5 min). Pasado este tiempo se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min y el siguiente paso fue transferir el sobrenadante a un nuevo tubo, se agregaron 500µl de acetato de potasio 5M, se incubó a 65°C por 5 min; finalmente se colocó el producto en hielo por 20min. Posteriormente se realizó una centrifugación a 14, 000 rpm por 30 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, se agregaron 200µl de la suspensión de sílica (2g de SiO₂ en 50 ml de agua) y se mezcló suavemente por 3 min. Nuevamente se centrifugó a 16,000 rpm por dos minutos y se descartó el sobrenadante. El siguiente paso fue el lavado de la pastilla de ADN que se realizó con alcohol a 70% dos veces; se resuspendió en precipitación en 30µl de agua y se dejó incubar a 55°C por 5 min. Finalmente se centrifugó a 14000 rpm por dos minutos y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo, y se guardó a -20°C hasta su uso posterior.

6.4 Determinación de la integridad del ADN por electroforesis

La determinación de la calidad del ADN se realizó por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1x (40 mM Tris base, ácido acético glacial y 2 mM ácido etilenodiaminotetraacético), adicionado con bromuro de etidio en una concentración de 0.5 µg/ml. Se colocaron aproximadamente 10 µl de muestra en cada pozeta usando como colorante de corrida azul de bromofenol 6X diluido 1:10 (Sambrook y Rusell, 2001). La electroforesis se realizó a 80 V durante 45 minutos, empleando como

amortiguador de electroforesis TAE 0.5X; una vez finalizado el proceso se visualizará el gel en un transluminador UV y se documentaron los resultados fotográficamente.

6.5 Cuantificación del ADN obtenido

La estimación de la cantidad de ácidos nucleicos en las preparaciones se realizó por espectrofotometría, en la cual se realizó una estimación de la cantidad de radiación UV absorbida por las bases nitrogenadas. Para cuantificar la cantidad de ADN, se registraron las longitudes de onda a 260 nm y 280 nm. La lectura a 260 nm se utilizó para calcular la concentración de ácidos nucleicos en la muestra. En el caso de los ácidos nucleicos una densidad óptica (OD) de 1 corresponde a ~50 µg/ml de doble hebra de ADN, 40 µg/ml de hebra simple de ADN ó ARN, y a ~33 µg/ml de hebra simple de oligonucleótidos. La relación entre las lecturas de 260nm y 280nm provee una estimación de la pureza de los ácidos nucleicos, de esta forma una relación aproximada a 1.8 indica que la muestra se encuentra libre de proteínas (Sambrook y Russell, 2001). El proceso de cuantificación fue el siguiente: 10 µl de muestra fueron diluidos en un tubo de 1.5 ml de agua estéril, se realizaron las lecturas de las longitudes de onda: 260 y 280 nm, y se calcularon con la siguiente fórmula:

Concentración de ADN (µg/ml) = (A 260 x 40) x Factor de Dilución (Sambrook y Rusell, 2001). Donde 40 es el grado de corrección relativa a la naturaleza de la doble hebra de ADN.

6.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR se empleó para amplificar las comunidades microbianas asociadas a los mostos, utilizando conjuntos de oligonucleótidos reportados previamente para la hibridación con las regiones filogenéticas conservadas de la subunidad 18S ribosomal de eubacterias y 16S ribosomal de arqueobacterias. En la Cuadro 10 se muestran los oligonucleotidos que fueron empleados en este trabajo.

Las concentraciones y condiciones de los ciclos de la PCR finales que se utilizaron fueron establecidas en el laboratorio y se muestran en la Cuadro 8.

Cuadro 8 Reactivos empleados en la PCR y condiciones finales de amplificación

Reactivos	Oligonucleotidos (Reacción al 1X)			
	COM1 y COM2	341F y 907R	LbF y LbR	16SF y 16SR
Amortiguador 10X	2.5	2.5	2.5	2.5
MgCl ₂ 50mM	0.5	0.75	3	3
PF5μM	1	1	1	1
PR5μM	1	1	1	1
dNTP's 10mM	0.5	0.2	0.25	0.25
Taq 5U/μL	0.5	0.2	0.2	0.2
H ₂ O	17.5	17.85	15.55	15.55
BSA	0.5	0.5	0.5	0.5
DNA (50ng/μL)	1	1	1	1
Vo.Fo.	25	25	25	25

Cuadro 9 Oligonucleotidos empleados para la amplificación 16S de ADN ribosomal

Cebador		Medida (pb)	Cita
16SF	F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y	1000	Edwards <i>et al.</i> (1989); Strom <i>et al.</i> , (2002)
16SR	R 5'-CGGGAACGTATTCACCG-3'		
341 F	F 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'	500	Muyzer <i>et al.</i> ,1995
907 R	R 5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3'		
COM 1	5'-CAGCAGCCGCGGTAA-3'	350	Schwieger y Tebbe (1998)
COM2	5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3'		
LB1	5' GAWTTATTGGGCGTAAAGVGA3'	500	No publicado LBI
LB2	5'-TAGCCCARSTCATAAGGGGCATG3'		

6.7 Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE)

Las muestras amplificadas fueron directamente aplicadas en un gel de poliacrilamida al 8% (w/v) con Amortiguador TAE como amortiguador de corrida al 1% (TAE; 40 mM Tris-acetato, 2mM Na₂EDTA-H₂O, pH 8.5). El gel fue preparado en un

gradiente desnaturizante de 30 a 60% de urea y formamida. El ratio de poliacrilamida y bis-acrilamida fue de 37.5:1 ó 19:1, dependiendo de una estandarización previa en el laboratorio. La electroforesis fue realizada con un voltaje constante de 120 V por 12 h, con una temperatura constante de 60° C. Posteriormente, el gel fue teñido con Syber Gold (TAE 1 X) de acuerdo a Prakitchaiwattana *et al.*, (2004).

6.8 Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP)

El protocolo que se utilizó para el análisis de la comunidad microbiana mediante SSCP fue estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Industrial en el cual se aplicaron los siguientes reactivos (Cuadro 10)

Cuadro 10 Reactivos empleados para la elaboración del gel de acrilamida al 10X

Reactivo	Gel al 10 %
40% Acrilamida/Bis	10mL
10X TBE	4mL
Glicerol 100%	2.4mL
TEMED	40µL
Persulfato de Amonio	400µL
Agua desionizada (dH2O)	40mL

Adicionalmente al protocolo de montaje del gel de acrilamida, el tratamiento que se le dio a los productos de PCR fueron agregar a cada producto de PCR el volumen equivalente de Amortiguador de carga previamente a la aplicación del gel de SSCP. El cual contenía Azul de Bromofenol, Xylen cianol, Formamida y EDTA. Posteriormente las muestras mezcladas con el Amortiguador de Carga fueron llevadas a desnaturizar al Termociclador con un ciclo de 95°C por 10 min, las muestras son inmediatamente colocadas en hielo para conservarlas desnaturizadas y así ser resueltas en el gel de poliacrilamida. Se empleó Amortiguador TBE al .05X como amortiguador de corrida. Las condiciones de corrida fueron 223 Volts por 20 horas.

6.9 Montaje de gel de SSCP y DGGE

El protocolo que se empleó para montaje de gel de acrilamida fue aplicable para las dos técnicas (DGGE y SSCP) descrito por Tebbe *et al.*, 2001, a continuación se puntualizan brevemente las siete etapas principales para realizar esta técnica.

Paso 1: Preparación de los vidrios. Los vidrios donde se realizó la electroforesis tienen dos diferentes tamaños, un vidrio de 38 x 30 cm. (vidrio pequeño) y otro de 38 x 50 cm. (vidrio grande), ambos se lavaron con detergentes neutros y se colocaron en hidróxido de sodio al 10 % la noche anterior a su utilización. Posteriormente se lavaron con agua destilada, se dejaron secar y se les adicionó etanol al 70 %, se secaron con papel absorbente y se volvieron a incubar en etanol al 70 % dejándolos secar a temperatura ambiente.

Paso 2. Preparación y aplicación del silicón de unión al vidrio pequeño. En una campana de extracción se colocó en uno de los vidrios un recubrimiento de silicón de unión “bind silane” (SIGMA, CA), el cual ayudó a que la acrilamida quedara adherida para su posterior tinción, y en el otro un repelente sigmacote (SIGMA, CA), que permitió la separación de la acrilamida adherida al otro vidrio. Se prepararon dos alícuotas de “bind silane”, agregándole 5 µl de bind silane a 1 ml de agua destilada mezclando por inversión. Posteriormente, se tomaron una de las alícuotas y se distribuyeron sobre un extremo del vidrio, y la otra en el centro con la ayuda de un pañuelo desechable. Se dejó secar el vidrio en la campana durante aproximadamente 30 min. Para la aplicación del repelente “sigmacote” se aplicaron directamente 2 ml de la misma forma que se aplicó el “bind silane” y se dejaron secar los vidrios durante 30 minutos.

Paso 3. Montaje de los vidrios. Se colocaron los separadores encima de la cara expuesta al gel del vidrio grande y se colocó el vidrio pequeño con la cara de interés hacia adentro. Una vez alineados los vidrios, se colocó cinta teflón en todas las orillas de los vidrios para evitar el derramamiento de la acrilamida mientras polimeriza. Posteriormente, se colocó el marco de hule para ajustar los vidrios.

Paso 4. Vaciado del gel de acrilamida y polimerización. Se colocaron los vidrios emparejados en forma inclinada y se viertió la solución de acrilamida al (10% para el SSCP y al 8% al DGGE) colocándola en el centro con ayuda de una punta metálica procurando que no quedaran burbujas. Una vez aplicada la acrilamida, se colocaron cuidadosamente los

peines evitando generar alguna burbuja adicional. La polimerización duró aproximadamente de 1 a 2 horas. Una vez realizada se retiraron de los vidrios el sujetador de hule, la cinta y se lavó el exceso de acrilamida con agua destilada. En el caso del DGGE la aplicación ocurre con ayuda de una rueda generando un impulso mecánico en el cual fueron conectadas dos jeringas con manguera las cuales contenían una solución de urea y formamida por cada lado generando un gradiente desnaturante con un radio de poliacrilamida y bis-acrilamida que fue de 37.5:1 ó 19:1.

Paso 5 Preparación de la cámara de electroforesis vertical y colocación de los vidrios. Se colocaron los vidrios en la cámara de electroforesis con el vidrio grande viendo hacia el frente. Se llenó la parte de arriba de la cámara con medio litro de amortiguador TBE (para el caso del SSCP y TAE para DGGE) y se enjuagaron los pozos en el gel generados por el peine para eliminar cualquier exceso de acrilamida. Se conectó la cámara a la fuente de poder y se realiza una pre-corrída del gel, aplicando azul de bromofenol, durante aproximadamente 1 hora en las condiciones deseadas.

Paso 6 Colocación de las muestras y condiciones de corrida. Para el caso de la elaboración del DGGE las muestras se aplican directamente al gel, para el caso del SSCP se le da el siguiente tratamiento. Las muestras de ADN se prepararon para su aplicación tomando el tubo de PCR y adicionando una cantidad de Amortiguador de corrida equivalente al volumen de PCR, posteriormente, se desnaturizaron las muestras colocando los tubos de 5 a 6 minutos a 95 ° C y posteriormente en hielo durante 5 minutos. La muestra se aplicó en el gel usando una punta de pipeta especial. Se ajustaron las condiciones de corrida correspondientes para cada gel.

Paso 7. Proceso del fijado-teñido-revelado del gel Se quitaron los separadores de los vidrios y se separaron los vidrios usando un cuchillo o una espátula. El gel se colocó en un recipiente que contenía 200 ml de amortiguador (TBE para geles de SSCP o TAE para geles de DGGE) se adicionó 20µl de Syber Gold para su tinción. Después de 30 min el gel se retiró y se enjuagó con solución de amortiguador. Se procedió a observar el gel de acrilamida en el transiluminador, se detectaron las bandas de interés las cuales fueron cortadas con una espátula y se procedió al tratamiento de purificación de bandas para posteriormente extraer el ADN que fue amplificado con diversos juegos de oligonucleotidos.

6.10 Clonación

Se realizó la clonación de los fragmentos obtenidos, de acuerdo al protocolo del estuche comercial M13 Vector - Promega®. Se llevó a cabo la transformación en las células calcio competentes de *E. coli* JM109. Se realizó una “caja maestra” en medio LB-Agar/ampicilina, con las colonias blancas (5 a 10 clonas por muestra) de las cuales se estriaron en la caja y se incubaron por 18 horas a 37 °C, y después se llevó a cabo el tamizaje por PCR.

6.11 Tamizaje por PCR

La presencia del inserto de interés se analizó en las clonas blancas mediante la técnica de PCR directo. Se resuspendió una muestra de la colonia bacteriana en 20 µl de Agua miliQ estéril y una alícuota de 5 µl fue utilizada para la amplificación por PCR con el termociclador Gene Amp. PCR system 9700 Perkin Elmer los componentes de la reacción son descritos en la Cuadro 11.

Cuadro 11 **Componentes de la reacción de la PCR de tamizaje**

Reactivos	µl
Amortiguador 10X	2.5
MgCl ₂ (50mM)	0.75
Oligonucleótido sentido	1.0
Oligonucleótido antisentido	1.0
dNTP (10 mM)	0.2
Taq ADN polimerasa	0.2
H ₂ O	14.35
ADNg (50ng/ µl)	5.0
Volumen final	25

Después de completado el programa de PCR, se visualizaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1 % a 90 volts por una hora.

6.12 Proceso de secuenciación

La secuenciación de las bandas correspondientes a cada microorganismo fue realizada en un secuenciador automático ABI Prism (Marca Applied Biosistem Modelo 3130) para secuenciación en capilar. Las condiciones de secuenciación se describen a continuación Cuadro 12.

Cuadro 12 Condiciones de Secuenciación

Componentes	1X
Amortiguador Big dye v 3.15X	4 µl
H2O	8 µl
Oligonucleótido F	1 µl
Big dye v 3.1 ready mix	4 µl
Templado	3 µl
Vol. total	20 µl

6.13 Análisis de las Secuencias

El análisis de la secuencias se realizó utilizando el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990) y el análisis de distancias filogenéticas con un dendrograma basado en UPGMA con un bootstrap de 1000 repeticiones en el programa MEGA4 (Tamura, *et al.* 2007).

6.14 Análisis estadístico del patrón de bandas resultantes del DGGE y SSCP

La matriz de datos se construyó utilizando el criterio de presencia ó ausencia (1 y 0, respectivamente) de las bandas bien definidas encontradas a diferentes distancias en el gel de acrilamida y por lo tanto con diferentes pesos moleculares y estructura secundaria. El cálculo de la matriz de similitud se realizó empleando el índice de Sorensen (1948). Se

llevó a cabo un análisis de las matrices binarias por medio de dendrogramas de Distancias Euclidianas por medio del programa STATISTIC ver 5.5.

6.15 Análisis físicoquímico

6.15.1 Análisis de metabolitos principales por medio de la técnica HPLC

Los principales productos de la fermentación alcohólica (alcohol, azúcares residuales, glicerol y ácido cítrico) y los principales productos de la fermentación maloláctica (ácido málico, ácido láctico, ácido succínico y ácido acético) se monitorearon empleando un equipo de HPLC acoplado a una columna Aminex HPX 87C (300 ml x 7.8 ml) con detector de índice de refracción, a una temperatura de 56 ° C, usando como fase móvil a 5 mM de H₂SO₄. El tiempo de retención del etanol bajo estas condiciones fue de 24.2 min. Para los demás metabolitos analizados se siguieron similares condiciones de corrida, siendo los tiempos de retención para el glicerol de 14.7 a 15.0 min, para la glucosa de 10.30 min, para la fructosa de 11.85 min, para el ácido acético de 9.23 min, para el ácido láctico de 14.38 min, para el ácido málico de 11.02 min, para el ácido succínico de 13.28 min y para el ácido cítrico de 9.23 min. Las ecuaciones lineales y el coeficiente de correlación de Person (r²) con respecto a las curvas de calibración para cada uno de los metabolitos de estudio se presentan en el Anexo 14.6

6.15.2 Determinación de proteínas

Se realizó la determinación de estas moléculas como un indicador indirecto de la cantidad de material biológico en los mostos. El material biológico en los mostos es la suma de los residuos de agave, levaduras y bacterias. Se empleó el método de Bradford (1976) para esta determinación. La ecuación lineal se presenta en el Anexo 14.7.

6.16 Análisis estadístico de comunidades microbianas

A partir de las bandas comunes obtenidas en los diferentes tipos de geles del estudio fue posible relacionar los perfiles microbianos presentes en las diferentes mezcaleras de

este trabajo. La determinación de las bandas comunes se realizó por su migración a la misma distancia en el gel. A partir del perfil de bandas se construyó una matriz numérica binaria de ausencia o presencia de cada gel analizado. A partir de esta matriz se calculó el índice de similitud cuya fórmula es:

Índice de similitud

$$Cs = 2j(a+b)$$

Donde:

a es el número de bandas en la muestra A

b es el número de bandas en la muestra B

j es el número de bandas comunes a A y B

Este índice fue usado para hacer el análisis de los microorganismos compartidos entre las diferentes mezcaleras de estudio (Sorensen *et al* 2005).

6.17 Análisis estadístico de los parámetros fisicoquímicos

Se aplicó el Análisis de Varianza de una Vía (ANDEVA) con 95 % de confianza a los valores obtenidos de los diferentes parámetros fisicoquímicos determinados en los mostos para determinar si existían diferencias entre las diferentes mezcaleras de este estudio (Zar, 1996). En los parámetros fisicoquímicos donde se demostraron diferencias significativas se aplicó el método de Dunn, el cual está basado en la distribución *t* de Student y en la desigualdad de Bonferroni (Dunn, 1961), y compara todas las medias de los diferentes tratamientos entre sí para determinar cual aporta las mayores diferencias y por lo tanto contribuye más a generar las diferencias significativas encontradas en el ANDEVA.

6.18 Análisis de las propiedades organolépticas de los destilados producidos por los mostos

Se aplicó una prueba de preferencia de consumo para identificar las características sensoriales más contrastantes entre los diferentes mezcales obtenidos a partir de los mostos de estudio. Este análisis es una prueba sensorial diseñada para analizar e interpretar las reacciones a aquellas características de los alimentos y de los materiales cuando son percibidos por los sentidos de la vista, oído, gusto y tacto (División de Pruebas Sensoriales del “Institute of Food Technologists”, 1975). La prueba proporciona una medida de la probabilidad de que una o varias muestras difieran de las restantes pero, sin embargo, no mide la magnitud de la diferencia. La prueba consistió en presentar de manera aleatoria pequeñas muestras de mezcal y se pide a los degustadores que las ordenen según alguna característica particular y posteriormente, las califiquen con un valor numérico que va del 2.5 al 10 (Cuadro 13).

Cuadro 13 Características evaluadas por los encuestados así como para cada una se le aplicó un valor que corresponde al grado de aceptación por preferencia de consumo (División de Pruebas Sensoriales del “Institute of Food Technologists”, 1975)

Variables	Grado de aceptación	Calificaciones
Color	Me gusta mucho	10
Olor	Es aceptable	7.5
Sabor	Es poco aceptable	5
Acidez	Me disgusta mucho	2.5
Fortaleza alcohólica		
Muestra preferente		

7 RESULTADOS

7.1 Características generales de las fabricas de mezcal de estudio

Se aplicó una encuesta (Cuadro 14) y una documentación fotográfica (Figura 7) para conocer las características principales de cada una de las mezcaleras de estudio. La figura 7 permite apreciar claramente los instrumentos que se emplean en la elaboración de mezcal, así como sus cualidades ambientales y físicas que las hace distintivas a nivel de bouquet y que contribuyen en gran medida en el proceso fermentativo, y en grado de preferencia por el consumidor. Las características más notorias y diferenciales entre las mezcaleras son las siguientes; Las mezcaleras del Ejido el Palmar y Los Fresnos, presentan una molienda similar a base de trapiche, la fermentación en estas dos mezcaleras es de forma rustica. Sobre todo la mezcalera del Ejido el Palmar, cuya fermentación se lleva a cabo en un tanque de madera (Figura 7.2A) mientras que en la mezcalera Los Fresnos la fermentación se lleva a cabo en tanques rotoplas (Figura 7.2B), en el caso de la destilación, en la mezcalera del Ejido el Palmar emplean un alambique compuesto por un tanque metálico sumergido en un pozo cubierto con tierra donde se induce el calentamiento, el etanol es pasado a un segundo tanque donde sucede una segunda destilación. Posteriormente, el etanol es pasado a una pileta donde es atemperado para finalmente ser recuperado a través de una llave de cobre en tinas metálicas (Figura 7.3A) para mantener su temperatura. En el caso de la mezcalera Los Fresnos se emplea un alambique sin enterrar (Figura 7.3B). Las tres mezcaleras emplean leña para la obtención del destilado.

La mezcalera Sierra Chiquita fue la más industrializada ya que emplea molinos mecánicos (Figura 7.1C), así como la fermentación se lleva a cabo en tanques de acero inoxidable (Figura 7.2C) y la destilación es por medio de alambiques de cobre (Figura 7.3C) además de que tienen una mejor higiene.



Figura 7 Proceso de elaboración de mezcal principales diferencias en las tres mezcaleras de estudio: 1A) trapiche artesanal, 2A) barril de fermentación, 3A) Alambique de destilación, 1B) tornillo de molienda, 2B) tanque de fermentación, 3B) alambique de destilación, 1C) molino mecánico, 2C) tanques de fermentación, 3C) alambique de destilación

Cuadro 14 Variables descriptivas que intervienen en el proceso de elaboración de mezcal en los tres lugares de estudio

Variab les	MELZ	MFRE	MSCH
Agave empleado	<i>Agave univitatta</i> (lechuguilla) <i>Agave angustifolia</i> <i>Agave americana</i> (maguey) <i>Agave montium</i> (jarcia) <i>Agave Sancticaroli</i> (jarcia)	<i>Agave univitatta</i> (lechuguilla) <i>Agave angustifolia</i> <i>Agave americana</i> (maguey) <i>Agave montium</i> (jarcia) <i>Agave sancticaroli</i> (jarcia)	<i>Agave univitatta</i> (lechuguilla) <i>Agave angustifolia</i> <i>Agave Americana</i> (maguey)
Molienda	Trapiche de madera artesanal	Trapiche metálico y madera con engranes	Molino de tornillo mecánico.
Horno de cocción de las piñas	Pozo en tierra artesanal	Horno de piedra	Pozo en tierra artesanal
Inoculo	Inoculo endémico de los tanques de fermentación	Tanques expuestos al medio ambiente	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Tanque de fermentación	Tanque de madera sumergido en un pozo de tierra y cubierto con paja	Tanques de tinaco marca rotoplas	Tanques de fermentación de acero inoxidable
Tanque de destilación	Alambique sumergido en un pozo cubierto con tierra	Tanques metálicos sin enterrar	alambiques de cobre
Grado de industrialización	Muy Artesanal	Artesanal	Industrializado
Tipo de calentamiento aplicado al proceso de destilación	Calentamiento por medio de leña	Calentamiento por medio de leña	Calentamiento por medio de leña
Temperatura ambiental	26°C	22°C	26°C

7.2 Extracción de ADN metagenómico con el método de silica de acuerdo a Rojas Herrera *et al.*, (2008)

Se extrajo ADN metagenómico en diferentes tiempos de la fermentación. En la etapa inmediatamente posterior a la molienda (1 a 3 días; código: MOL), la etapa de fermentación activa inicial (3 a 4 días, código: AI), la etapa de fermentación activa final (5

a 6 días, código: AII) y la etapa de fermentación final (7 a 8 días, código: FI). La integridad del ADN extraído de las diferentes etapas de la fermentación fue analizado en un gel de agarosa al 1.5% (Figura 8).

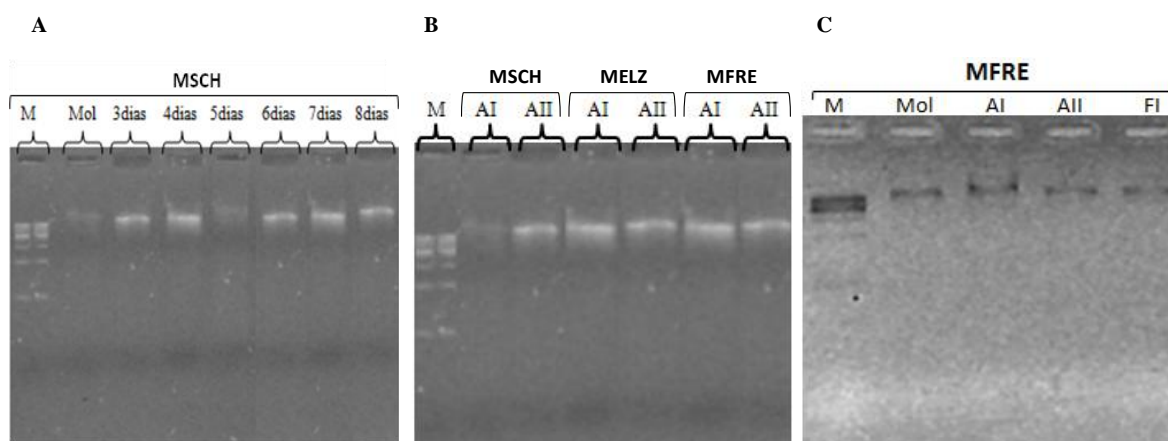


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de la extracción de ADN metagenómico de los mostos de estudio. A) Cinética fermentativa de la mezcalera Sierra Chiquita (MSCH). B) Cinética fermentativa de la mezcalera Los Fresnos (MFRE). C) ADN metagenómico de las etapas Activa I (AI) y Activa II (AII) de las tres mezcaleras MSCH, MELZ (Ejido el Palmar) y MFRE.

7.3 Determinación de la cantidad de ADN obtenido

La cantidad del ADN obtenido se determinó por absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrómetro GBC (Cintra 10e). Los resultados obtenidos mostraron que el ADN tiene una pureza aceptable para el seguimiento de análisis moleculares. La Cuadro 15 presenta los resultados obtenidos para muestras en etapa de fermentación activa (AI).

Cuadro 15 Resultados de la cuantificación de ADN por espectrofotometría a 260 y 280 nm

Muestra de ADN	Abs 260	Abs280	Abs 260/280	ADN µg/ml
MFRE	0.0780	0.0434	1.7972	78
MELZ	0.0670	0.0390	1.7179	67
MSCH	0.0690	0.0388	1.7783	69

El ADN obtenido resultó de buena calidad para los análisis posteriores con una pureza entre el 70 y el 80% por lo que se prosiguió a la realización de los análisis subsecuentes.

7.4 Amplificación por PCR de la región 16S de ADN ribosomal

A partir del ADN metagenómico obtenido se amplificó la región ribosomal de los microorganismos presentes a través de utilizar diferentes conjuntos de oligonucleótidos universales como se describe en la sección anterior (Cuadro 10).

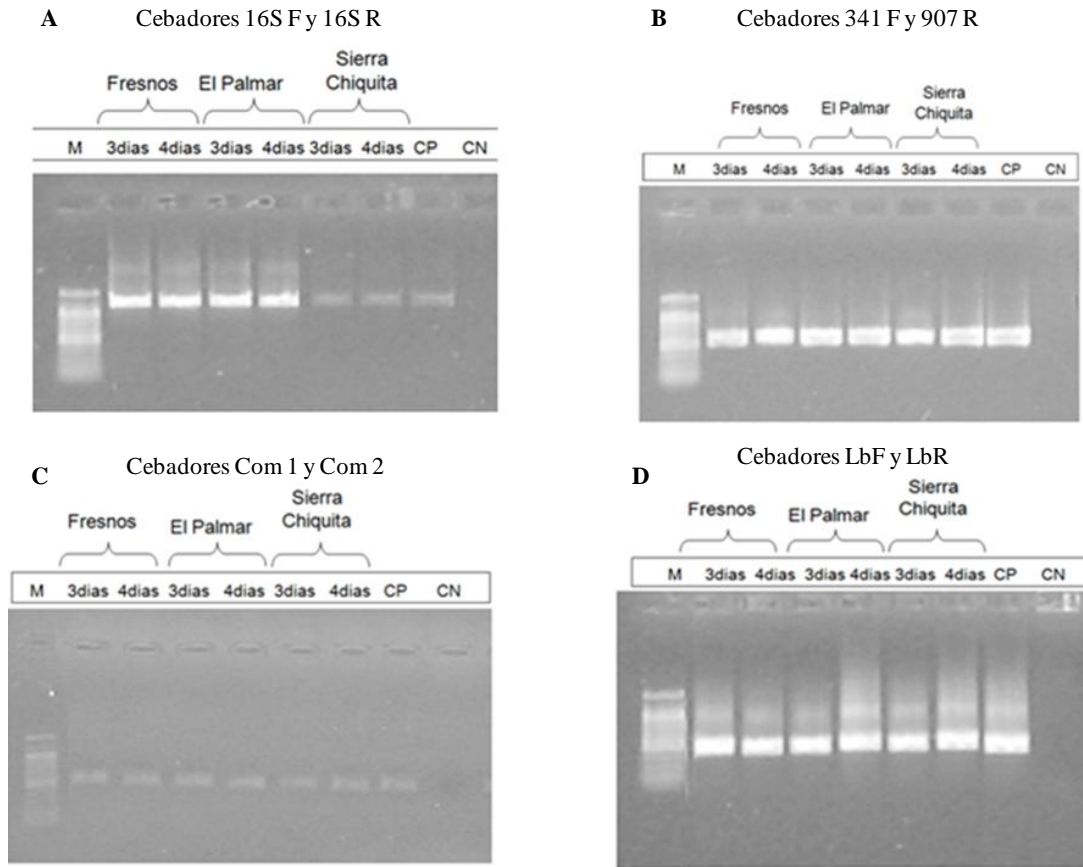


Figura 9. Amplificación de la región 16S de ADN ribosomal empleando diversos juegos de oligonucleótidos. A) Oligonucleótidos 16S universales, B) Oligonucleótidos 341F y 907R, C) Oligonucleótidos COM, D) Oligonucleótidos Lb.

Las condiciones de amplificación se describen en la sección de métodos, finalmente se emplearon los oligonucleótidos universales para la región 16S ribosomal (aproximadamente 1100 pb) para realizar el análisis de la microcomunidad por DGGE. Se utilizaron los oligonucleótidos 341F y 907R (aproximadamente 550 pb), los oligonucleótidos COM (aproximadamente 500 pb) y los oligonucleótidos Lb (aproximadamente 500 pb) para el análisis de la microdiversidad por medio de la técnica SSCP (Figura 9).

7.5 Análisis del Perfil Microbiano en la etapa activa de la fermentación de los mostos de mezcal

Los perfiles microbianos de los mostos de estudio se obtuvieron a partir de los geles de acrilamida producidos por las técnicas de SSCP y DGGE. La diversidad bacteriana de los mostos se evaluó en las etapas de fermentación activa inicial (3 a 4 días; código en los geles: I) y de fermentación activa final (5 a 6 días; código en los geles: II) (Figura 10). A partir de los geles obtenidos se obtuvieron matrices numéricas que fueron luego utilizadas para construir arboles de distancia por el método de UPGMA y el índice de similitud de Sorensen (1948), ambas técnicas para comparar el perfil microbiano presente entre los mostos de estudio (Anexo 14.1-14.4).

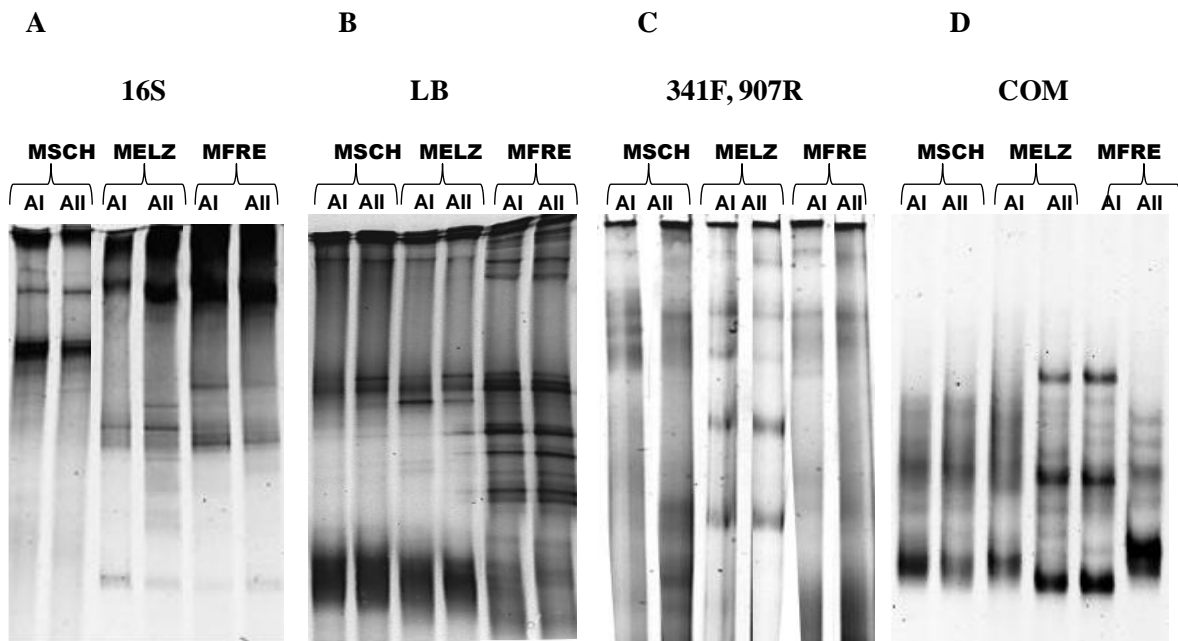


Figura 10. Análisis del perfil bacteriano por medio de la técnica DGGE empleando los oligonucleotidos 16S A), B). Análisis del perfil bacteriano empleando oligonucleotidos LB por medio de la técnica SSCP. Fig. C). Perfil bacteriano empleando oligonucleotidos (341F y 901R) por medio de la técnica SSCP. D). perfil bacteriano empleando oligonucleotidos COM por medio de la técnica SSCP.

7.6 Análisis de patrones de bandas obtenidos de los geles de acrilamida

A partir del análisis de los dendrogramas resultantes es posible distinguir claras diferencias entre los análisis microbianos obtenidos de acuerdo al tipo de cebador, y a la fase de fermentación.

7.6.1 Análisis de los dendrogramas de distancias

De esta forma, los oligonucleótidos COM (Figura 11 A y B) mostraron una gran diferencia entre la mezcalera MFRE y las mezcaldas MELZ y MSCH en la etapa de fermentación activa inicial (figura 11A). Utilizando estos oligonucleótidos también fue posible observar cambios durante la cinética de fermentación, ya que durante la etapa de fermentación activa final (Figura 11B) la mezcalera MELZ fue la que presentó el perfil microbiano más diferente en relación a las otras mezcaldas. A partir del análisis de los oligonucleótidos 341F y 907R se observa que durante la fermentación activa inicial (Figura 11 C), las mezcaldas MFRE y MSCH son similares entre sí y diferentes a la mezcalera artesanal MELZ (figura 11D), mientras que en la fermentación activa final, las tres mezcaldas comparten un perfil microbiano similar.

Utilizando los oligonucleótidos LB es posible notar que las tres mezcaldas comparten perfiles microbianos similares durante la fermentación activa inicial (Figura 11 E). Sin embargo, a nivel de la fermentación activa final fue posible observar claras diferencias entre las mezcaldas MSCH y MELZ con respecto a la mezcalera MFRE (Figura 11 F). Finalmente, al utilizar los oligonucleótidos 16S fue posible observar claras diferencias entre los perfiles microbianos tanto en su etapa activa inicial como activa final de las dos mezcaldas artesanales (MFRE y MELZ) con respecto a la mezcalera industrializada (MSCH) con distancias superiores a los 3 puntos porcentuales de distancias euclidianas (Figura 11 G y H).

Por lo anterior, es posible sugerir que las dos mezcaldas artesanales (MFRE y MELZ) están siempre agrupadas entre sí, y que presentan un perfil microbiano diferencial a la mezcalera industrializada MSCH.

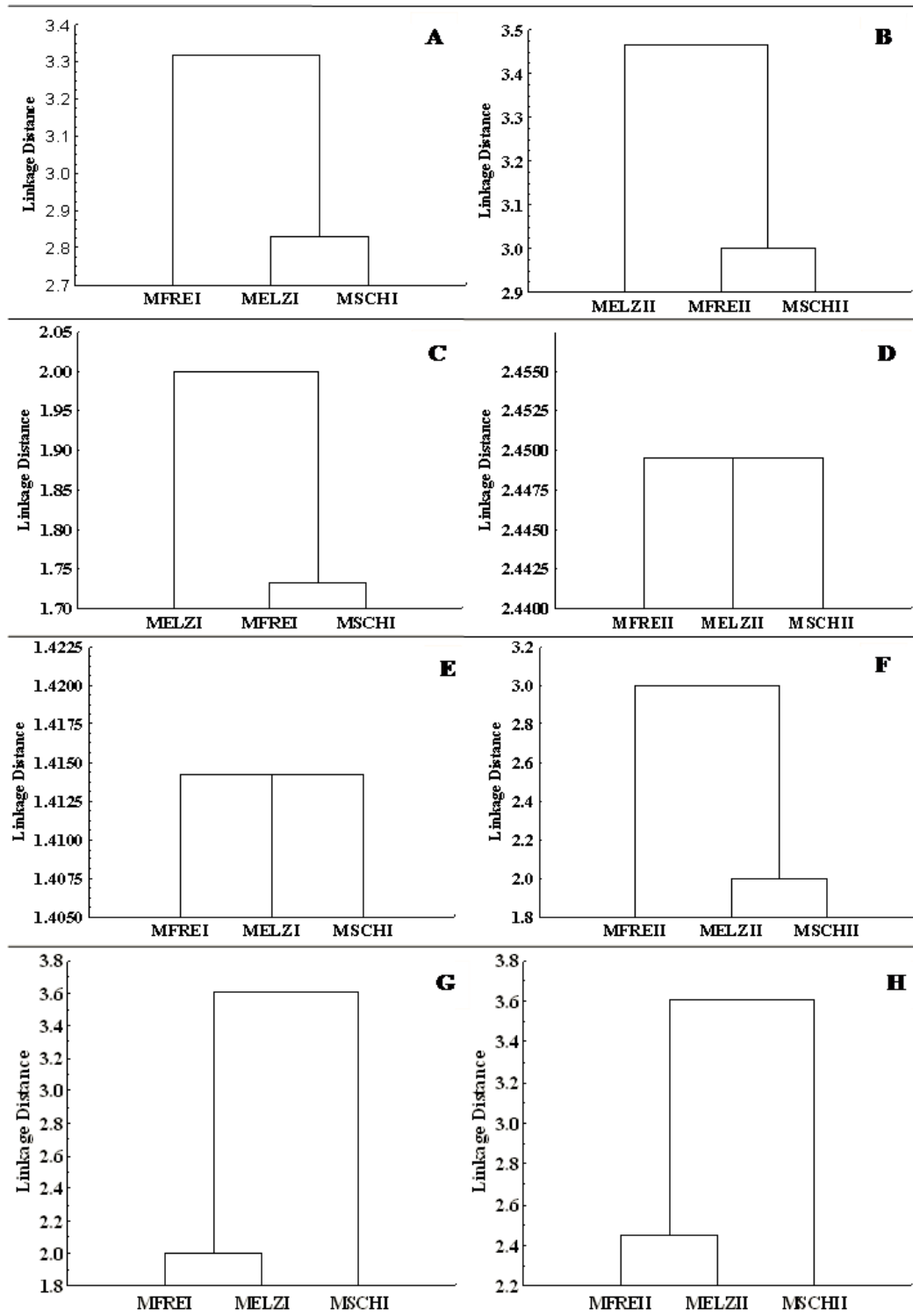


Figura 11. Dendrogramas de distancias euclidianas con tres variables elaborados en el programa STATISTICA 7 donde se evaluó el perfil bacteriano resultante del juego de oligonucleótidos Com1 y Com2 (A y B), 341F y 907R (C y D) LbF y LbR (E y F) y 16S (G y H)

7.6.2 Índice de similitud de Sorensen

A partir de la información contenida en las matrices binarias (Anexo 14.1-14.4) obtenidas de los diferentes análisis metagenómicos con los diferentes conjuntos de oligonucleotidos utilizados fue posible construir el índice de similitud de Sorensen, el cual refleja el grado de similitud entre las poblaciones microbianas presentes entre los mostos de estudio. Los resultados se presentan en la Cuadro 16.

Cuadro 16 Comparación de la etapa de fermentación activa entre las tres mezcaleras obtenida a través del índice de similaridad de Sorensen empleando matrices binarias

Fermentación activa inicial				
Oligonucleotidos		MSCH	MELZ	MFRE
COM	MSCH	1		
	MELZ	0.33	1	
	MFRE	0.4	0.23	1
341F 907R	MSCH	1		
	MELZ	0.75	1	
	MFRE	0.82	0.7	1
LB	MSCH	1		
	MELZ	0.8	1	
	MFRE	0.66	0.85	1
16S	MSCH	1		
	MELZ	0.12	1	
	MFRE	0.1	0.7	1
Fermentación activa final				
COM	MSCH	1		
	MELZ	0.33	1	
	MFRE	0.4	0.23	1
341F 907R	MSCH	1		
	MELZ	0.7	1	
	MFRE	0.57	0.55	1
LB	MSCH	1		
	MELZ	0.75	1	
	MFRE	0.64	0.56	1
16S	MSCH	1		
	MELZ	0.12	1	
	MFRE	0.23	0.69	1

*Valores arriba de >0.70 se considera que hay similitud entre los perfiles microbianos.

Durante la fase de fermentación activa inicial los oligonucleotidos COM permitieron distinguir claramente todas las mezclas entre sí, con porcentajes más bajos

que el 42%. Contrastantemente, al utilizar los oligonucleotidos 341F y 907R en esta etapa de fermentación no se observaron diferencias grandes entre los mostos de las diferentes mezcaleras. Al emplear los oligonucleotidos LB en esta fase de fermentación tampoco pudieron distinguirse grandes diferencias entre las mezcaleras de estudio. Finalmente, al utilizarse los oligonucleotidos 16S fue posible distinguir grandes diferencias entre la mezcalera industrializada (MSCH) y la mezcalera artesanales de MELZ y MFRE con solo 11 y 10% de similitud, respectivamente. Estas dos últimas mezcaleras artesanales presentaron un 70% de similitud entre ellas en esta etapa fermentativa. Los resultados obtenidos hasta esta parte del análisis sugieren que en la etapa de fermentación activa inicial aun no existen grandes diferencias entre los perfiles microbianos de los diferentes mostos de estudio, y que solo los oligonucleotidos universales 16S y en menor medida los COM permitieron observar estas diferencias.

Cuando se analiza la etapa de fermentación activa final empleando los oligonucleotidos COM no fue posible observar gran similitud (>40%) entre las diferentes micro comunidades de los mostos de estudio. Al utilizar los oligonucleotidos 341F y 907R se obtuvo un resultado diferente ya que fue posible observar similitudes superiores al 50% entre todas las mezcaleras de estudio. El empleo de los oligonucleotidos LB en esta etapa de fermentación también permitió observar similitud entre todas las mezcaleras (de 56 a 75%). Finalmente, al emplear los oligonucleotidos 16S fue posible distinguir claras diferencias entre la mezcalera industrializada (MSCH) y las mezcaleras artesanales de MELZ y MFRE con solo 11% y 23% de similitud mientras que los resultados del perfil microbiano entre estas dos últimas mezcaleras están altamente relacionados ya que comparten una similitud de 66%.

7.7 Análisis filogenético

A partir de los geles de acrilamida obtenidos del análisis metagenómico se seleccionaron bandas discretas de ADN ribosomal bien definidas para cortarlas y purificarlas tal como se describió en la sección de metodología. Estas bandas fueron re amplificadas (Figura 12) y secuenciadas utilizando el mismo conjunto de oligonucleotidos utilizados para su amplificación inicial.

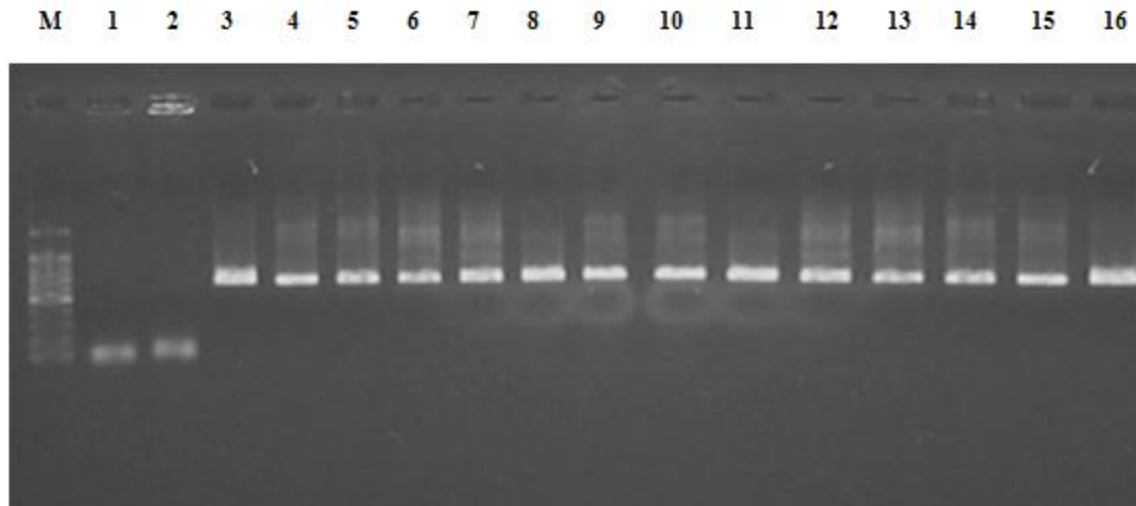


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa, PCR de tamizaje, correspondiente a la región 16S de ADN ribosomal. Carriles 1 al 7 clonas de la fermentación de MSCH, Carriles 8-11 clonas de la fermentación de MELZ, Carriles 12 al 16 clonas correspondientes a la fermentación de MFRE

Los productos de PCR mayores a 300 pb obtenidos fueron clonados y secuenciados. Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando el programa BLAST en la base de datos del NCBI, utilizando la aplicación *blastn*. Los resultados se presentan en la Cuadro 17. Las bandas obtenidas presentan altas identidades con especies bacterianas de los filum firmicutes, proteobacterias y del tipo de las bacterias no cultivables, así como una cianobacteria.

ANÁLISIS METAGENÓMICO Y FÍSICOQUÍMICO DE MOSTOS DE MEZCAL TAMAULIPECO

Cuadro 17 Identidades obtenidas de los productos de PCR del 16S en la base de datos del NCBI

CLAVE*	ACCESIÓN	ESPECIE RELACIONADA (NCBI)	IDENTIDAD %	DIVERSIDAD BACTERIANA DURANTE LA FERMENTACIÓN DEL MEZCAL			
				FI	FII	FIII	FIV
OLIGONUCLEOTIDOS COM							
1.COM.MELZ	EF102890	<i>Lactobacillus buchneri</i>	92%			X	
2.COM.MSCH	EU080985	<i>Lactobacillus sakei</i>	88%		X	X	X
3.COM.MELZ	EF210103	<i>Lactobacillus parabrevis</i>	87%			X	
4.COM.MSCH	FJ861115	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	99%		X	X	X
5.COM.MFRE	AB429373	<i>Lactobacillus parakefiri</i>	97%	X	X	X	
6.COM.MELZ	AB304089	<i>Tanticharoenia sakaeratensis</i>	89%			X	
7.COM.MFRE	AB282889	<i>Lactobacillus similis</i>	98%			X	
8.COM.MELZ	EU635155	<i>Uncultured Methylobacterium sp.</i>	89%	X		X	
9.COM.MSCH	FJ749561	<i>Lactococcus lactis subsp.</i>	80%		X		X
10.COM.MELZ	NR025445	<i>Isobaculum melis</i>	98%			X	
11.COM.MFRE.MSCH	AY278620	<i>Lactobacillus genomos</i>	94%			X	
12.COM.MFRE.MSCH	EU117220	<i>Streptococcus phocae</i>	96%			X	X
13.COM.MFRE	FM211703	<i>Alpha proteobacterium</i>	83%		X		
14.COM.MELZ	EU626745	<i>Enterococcaceae bacterium</i>	96%		X	X	
15.COM.MFRE	EU717955	<i>Enterococcus faecium</i>	88%	X	X	X	
16.COM.MSCH.MELZ	FJ609223	<i>Lactobacillus pentosus</i>	97%	X	X	X	
17.COM.MSCH.MFRE	FJ538520	<i>Lactobacillus plantarum</i>	89%		X	X	X
18.COM.MELZ	AB218800	<i>Lactobacillus vaccinostercus</i>	98%			X	
19.COM.MSCH	AM905388	<i>Lactobacillus fabifermentans</i>	81%			X	X
20.COM.MFRE	AB382424	<i>Uncultured bacterium</i>	80%			X	X
21.COM.MELZ	AB429369	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	94%		X	X	
22.COM.MELZ	DQ248009	<i>Synechococcus sp.</i>	91%		X		
23.COM.MFRE.MSCH	AB429370	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	99%		X	X	
OLIGONUCLEOTIDOS 341F y 907R							
1K.MELZ	AB176282	<i>Uncultured bacterium</i>	87%			X	
2K.MFRE	FN421635	<i>Uncultured bacterium</i>	82%		X		
3K.MSCH	AF467694	<i>Rhizobium sp.</i>	83%	X		X	
4K.MELZ	EU522077	<i>Enterococcus sp.</i>	94%	X			X
5K.MFRE	GQ281076	<i>Methylobacterium lusitanum</i>	90%		X		X
6K.MELZ	AJ964950	<i>Uncultured alpha proteobacterium</i>	81%	X			
7K.MSCH	AJ400914	<i>Methylobacterium extorquens</i>	85%	X			X
8K.MSCH.MELZ.MFRE	GQ461595	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	95%		X	X	

ANÁLISIS METAGENÓMICO Y FÍSICOQUÍMICO DE MOSTOS DE MEZCAL TAMAULIPECO

Cuadro 17. Continuación. **Identidades obtenidas de los productos de PCR del 16S en la base de datos del NCBI**

CLAVE*	ACCESIÓN	ESPECIE RELACIONADA (NCBI)	IDENTIDAD %	DIVERSIDAD BACTERIANA DURANTE LA FERMENTACIÓN DEL MEZCAL			
				FI	FII	FIII	FIV
				9K.MFRE.MSCH	FJ915702	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	94%
OLIGONUCLEOTIDOS LB							
1.LB.MELZ.MFRE	Z84587	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98%	X			
2.LB.MFRE.MSCH	AB366399	<i>Lactobacillus rapi</i>	93%		X	X	
3.LB.MELZ.MSCH	AB429371	<i>Lactobacillus kefir</i>	96%		X	X	
4.LB.MFRE	AB366385	<i>Lactobacillus sunkii</i>	100%		X		X
5.LB.MFRE	AY830397	<i>Uncultured Enterococcus</i>	98%		X		X
6.LB.MELZ	AB481101	<i>Enterococcus durans</i>	98%	X		X	
7.LB.MSCH	FJ542294	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	95%		X	X	X
OLIGONUCLEOTIDOS 16S							
1.16S.MFRE.MSCH	FJ915646	<i>Lactobacillus helveticus</i>	97%	X		X	
2.16S.MELZ.MFRE	AB268119	<i>Lactobacillus composti</i>	91%	X		X	X
3.16S.MELZ	X68418	<i>S.thermophilus</i>	100%			X	
4.16S.MFRE	FN297955	<i>Uncultured Methylobacterium sp</i>	81%		X		X
5.16S.MELZ	GQ337035	<i>Enterococcus raffinosus</i>	89%	X			
6.16S.MELZ	AM411916	<i>Phenylobacterium sp.</i>	95%			X	
7.16S.MFRE	GQ114759	<i>Uncultured bacterium</i>	98%		X		
8.16S.MELZ	EF018527	<i>Uncultured Gemmatimonadetes</i>	82%			X	

^a La clave de la secuencia obtenida comprende el número de identificación, el cebador empleado y la mezcalera de la cual fue recuperado el microorganismo.

^b Donde FI corresponde al mosto recién molido, FII es la fermentación de 3 y 4 días, FIII es la fermentación de 5 y 6 días FIV corresponde a la fermentación de 7 y 8 días.

La información de las secuencias obtenida se utilizó para construir dendrogramas de distancias filogenéticas para los oligonucleotidos COM (Figura 13), los oligonucleotidos 341F y 907R (Figura 14), los oligonucleotidos LB (Figura 15) y los oligonucleotidos 16S (Figura 16).

En términos generales los resultados nos permiten concluir que la mayoría de los microorganismos se encuentran presentes en la fermentación activa final, que el género de la especie más dominante es *Lactobacillus* sp, y que los oligonucleotidos que permitieron obtener el mayor grado de diversidad fueron los COM.

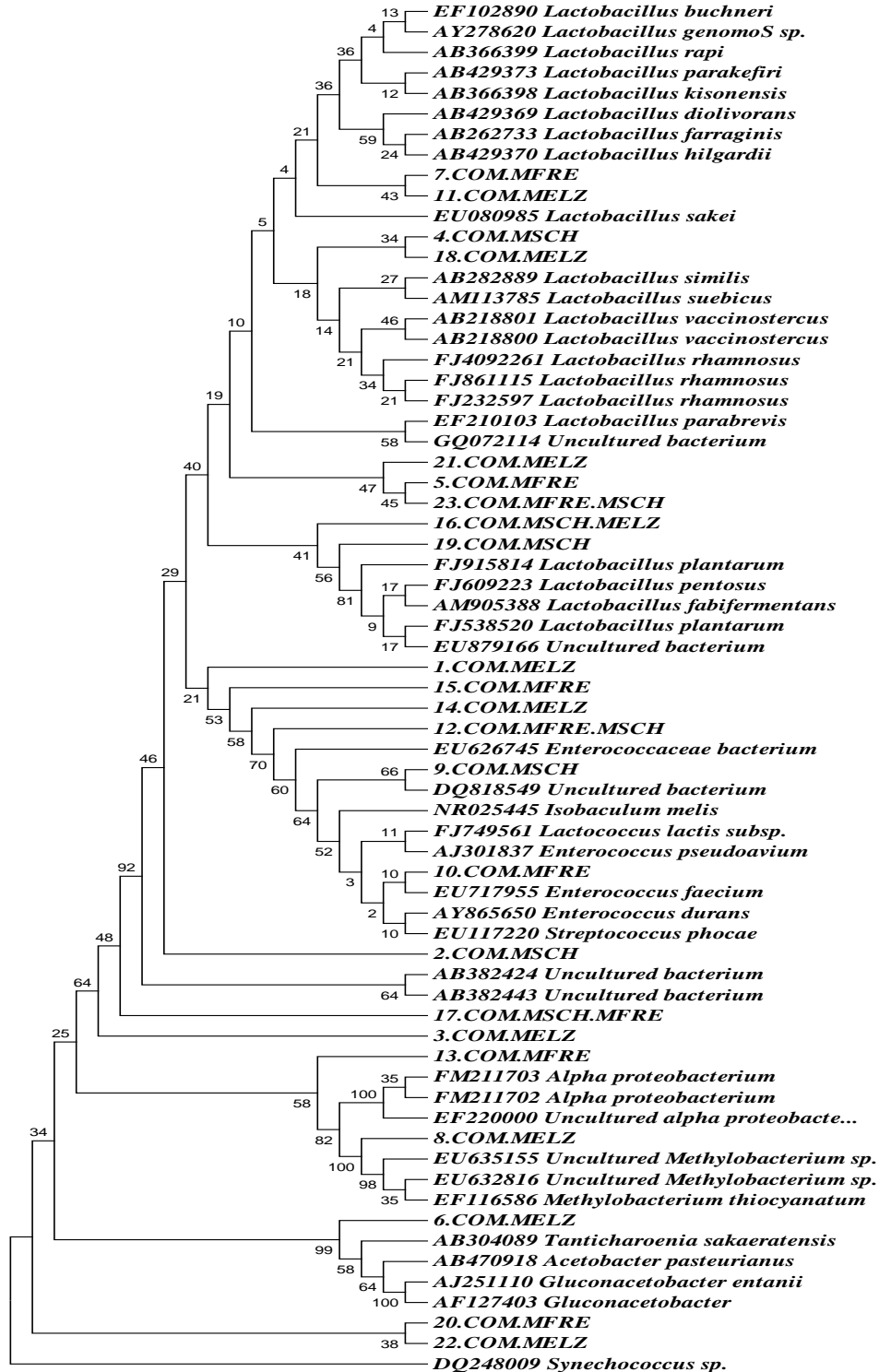


Figura 13. Dendrograma empleando secuencias obtenidas por medio de los oligonucleótidos COM en el cual se realizó un análisis de distancias filogenéticas utilizando el programa MEGA 4. (Tamura *et al.* 2007). El análisis fue inferido por el Método de UPGMA con un Bootstrap de 1000 replicones. Secuencia DQ248009 de *Synechococcus sp.* utilizada como grupo de salida.

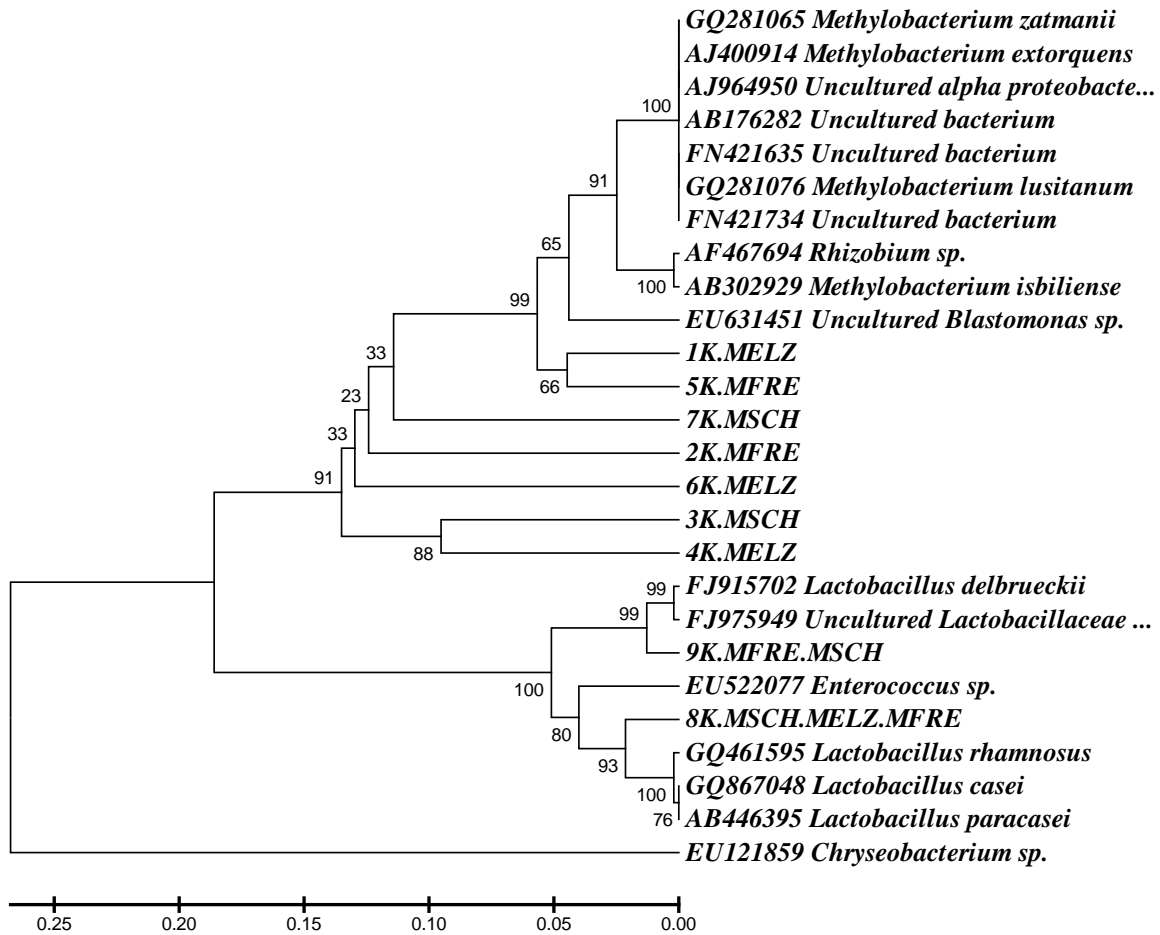


Figura 14. Dendrograma empleando secuencias obtenidas por medio de los oligonucleótidos 341F Y 907R. En el cual se realizó un análisis de distancias filogenéticas utilizando el programa MEGA 4. (Tamura *et al.* 2007). El análisis fue inferido por el Método de UPGMA con un Bootstrap de 1000 replicones. Secuencia EU121859 de *Chryseobacterium* sp. Utilizada como grupo de salida. (Las claves con letra inicial K pertenecen a los productos de los oligonucleótidos 341F y 907R).

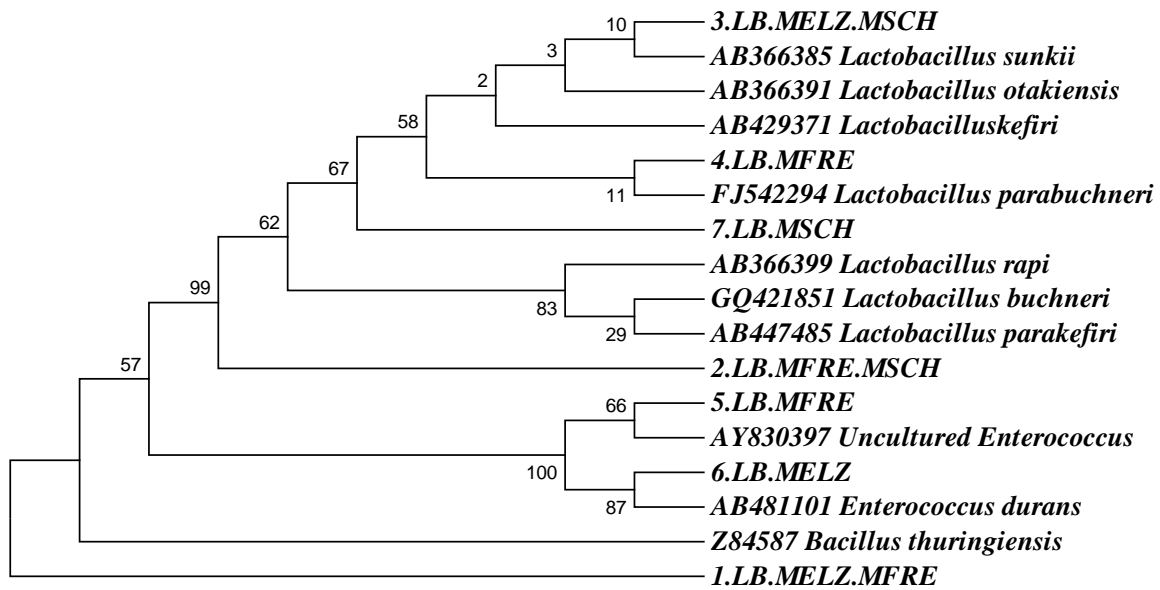


Figura 15. Dendrograma empleando secuencias obtenidas por medio de los oligonucleotidos Lb En el cual se realizó un análisis de distancias filogenéticas utilizando el programa MEGA 4. (Tamura, *et al.* 2007). El análisis fue inferido por el Método de UPGMA con un Bootstrap de 1000 replicones. Secuencia Z84587 de *Bacillus thuringiensis* utilizada como grupo de salida.

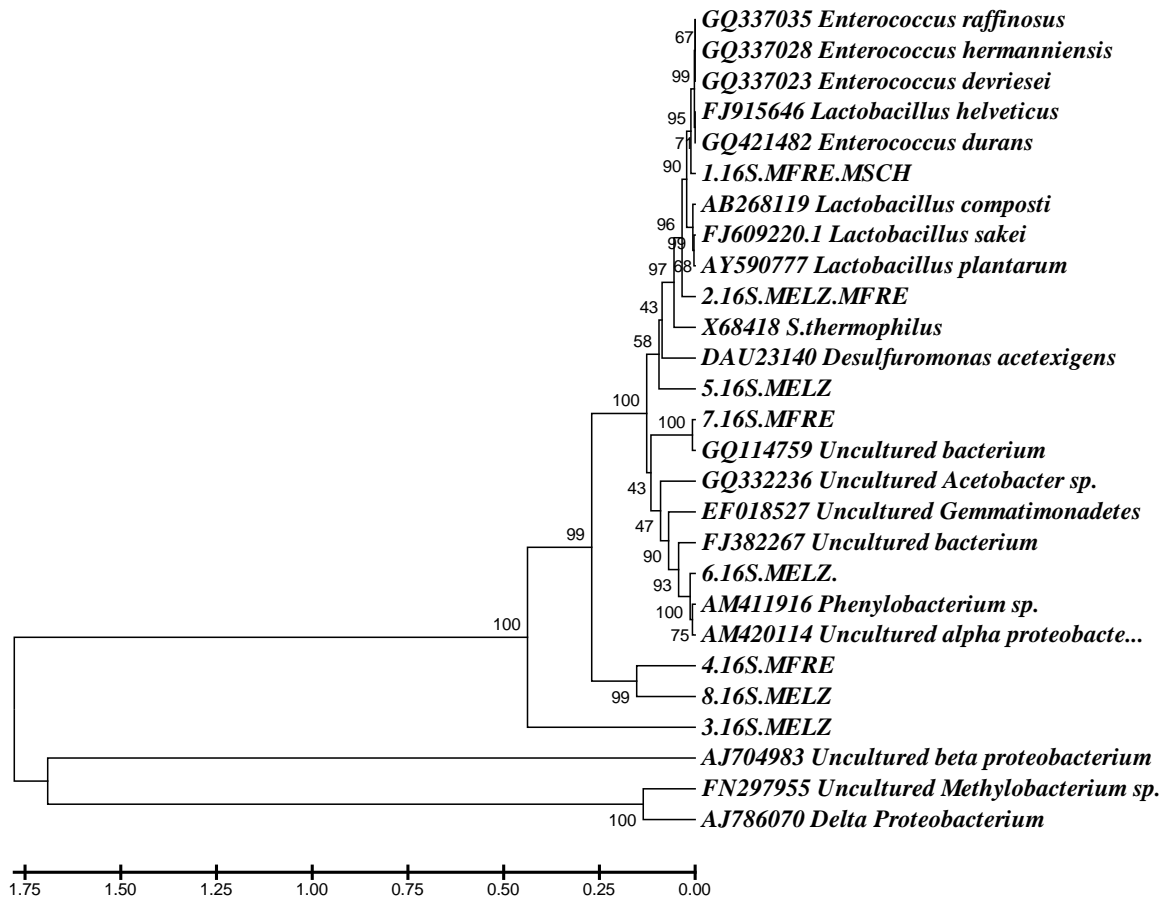


Figura 16. Dendrograma empleando secuencias obtenidas por medio de los oligonucleótidos 16S En el cual se realizó un análisis de distancias filogenéticas utilizando el programa MEGA 4. (Tamura *et al.* 2007). El análisis fue inferido por el Método de UPGMA con un Bootstrap de 1000 replicones. Secuencia AJ786070 de Delta Proteobacterium utilizada como grupo de salida

A partir de los resultados obtenidos por medio del análisis filogenético podemos decir que los oligonucleótidos COM, fueron los que mostraron mayores variedades de bacterias, el grupo mayoritario encontrado fue el orden de las lactobacillales y del filum de las proteobacterias se encontraron Methilobacterias, alfaproteobacterias, así como bacterias de la familia acetobacteriaceae. Además se encontró una cianobacteria del género *Synechococcus* sp.

De acuerdo al dendrograma en base a secuencias amplificadas por medio de los oligonucleótidos 341F, 907R se pudieron observar dos grupos de bacterias, proteobacterias y Lactobacillales.

El dendrograma elaborado con secuencias obtenidas a partir de los oligonucleótidos Lb dió buenos resultados para el orden Lactobacillales así como además se obtuvo una bacteria del género *Bacillus thuringensis*.

Finalmente por medio del dendrograma empleando secuencias obtenidas de los cebadores 16S se pudieron obtener un grupo mayoritario de proteobacterias y un grupo interesante de bacterias pertenecientes al orden Lactobacillales.

7.8 Análisis fisicoquímico de los mostos de estudio

7.8.1 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada como un indicador indirecto de la biomasa presente en los mostos. El anexo 3 presenta la curva de calibración obtenida para realizar la cuantificación. Se seleccionaron las mezcaleras de Sierra Chiquita y Los Fresnos para cuantificar sus cinéticas de acumulación de proteínas ya que en ambas mezcaleras se contaba con una mayor cantidad de puntos de muestreo. Los resultados indican para la mezcalera de Sierra Chiquita que en la etapa de molienda se presenta la mayor cantidad de biomasa, lo anterior es una consecuencia de la acumulación de material vegetal (agaves) y de microorganismos. Posteriormente, se observa una cinética de acumulación de microorganismos durante la fermentación de los mostos. El pico de acumulación de proteínas se presenta en la etapa de fermentación activa final. En el caso de la cinética de la mezcalera Los Fresnos, presenta un aumento de proteínas conforme avanzan los días de fermentación.

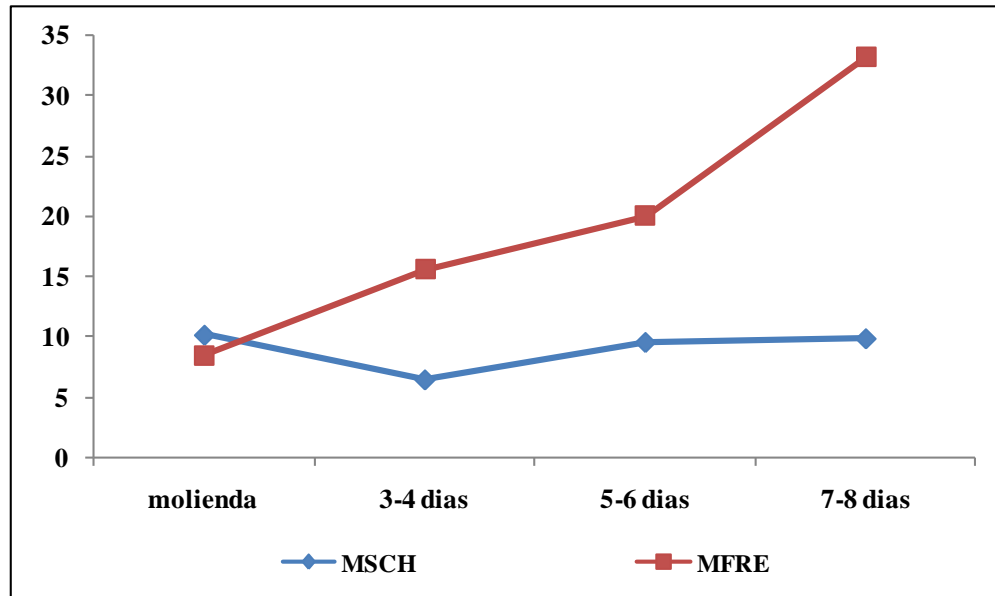


Figura 17. Concentración de proteínas en la cinética fermentativa de la mezcalera Sierra Chiquita (MSCH) y Los Fresnos (MFRE).

Por lo anterior, se seleccionó la etapa de fermentación activa para comparar el perfil de proteínas en los diferentes mostos de estudio.

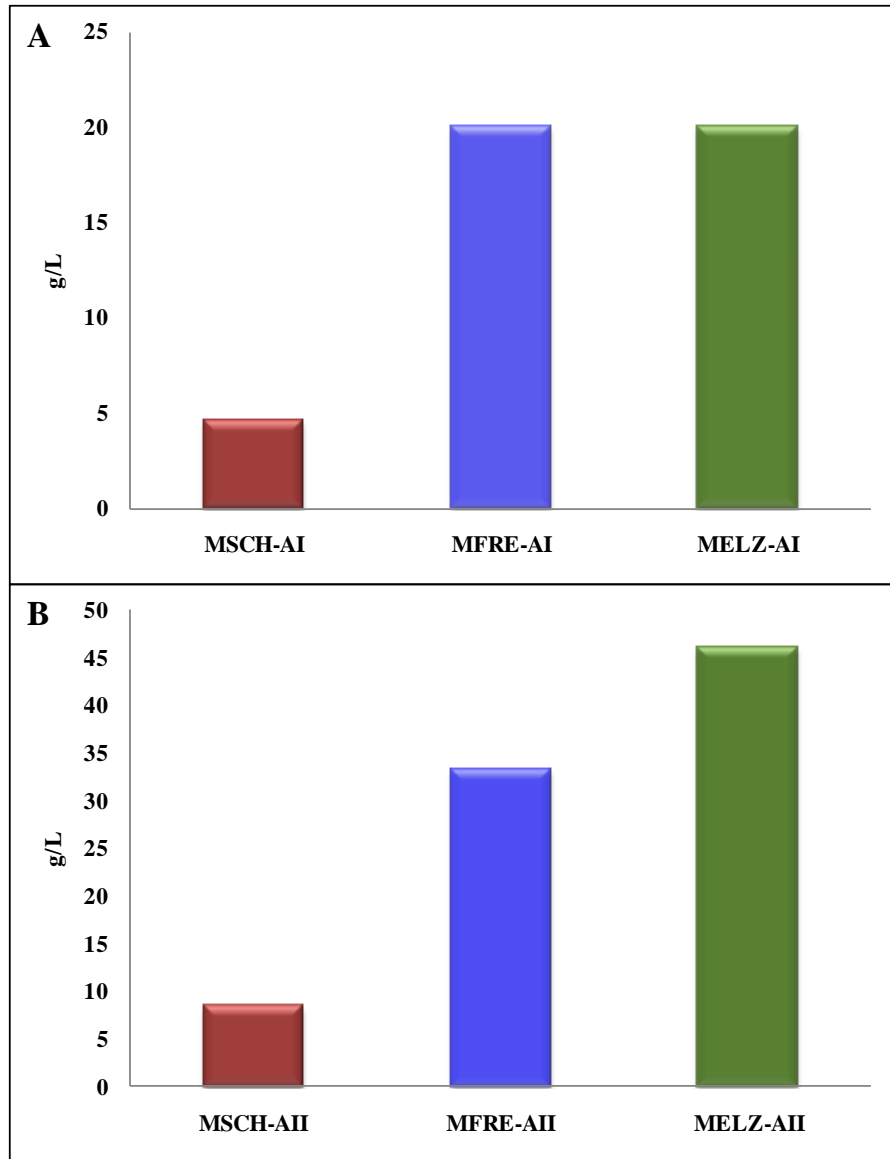


Figura 18. Concentración de proteínas presentes en la fermentación del mezcal en la fase activa inicial A) y activa final B)

La figura 18 presenta la acumulación de proteínas durante esta etapa de fermentación. Los resultados indican que las fábricas de mezcal más artesanales como Los Fresnos y la fábrica Emilio Lozoya son las que presentan los volúmenes mayores de proteínas y de biomasa durante la fermentación activa

7.8.2 Cinética de la fermentación en la mezcalera más industrializada de Sierra Chiquita.

A nivel de las principales moléculas involucradas con las fermentación alcohólica (Figura 19A) se observa una tendencia general a la disminución de azúcares y acumulación de etanol durante la fermentación como es de esperarse en este tipo de sistemas. Cabe mencionar que el nivel de los azúcares iniciales varía ampliamente, siendo en todos los casos un elevado nivel de fructosa con respecto al de glucosa, tal como está reportado en este tipo de mostos. Los niveles de alcohol rápidamente incrementan y mantienen una tendencia constante de alrededor de 75 g/L. La cinética de fermentación es incompleta ya que al final aun quedan presencia de azúcar en estos mostos.

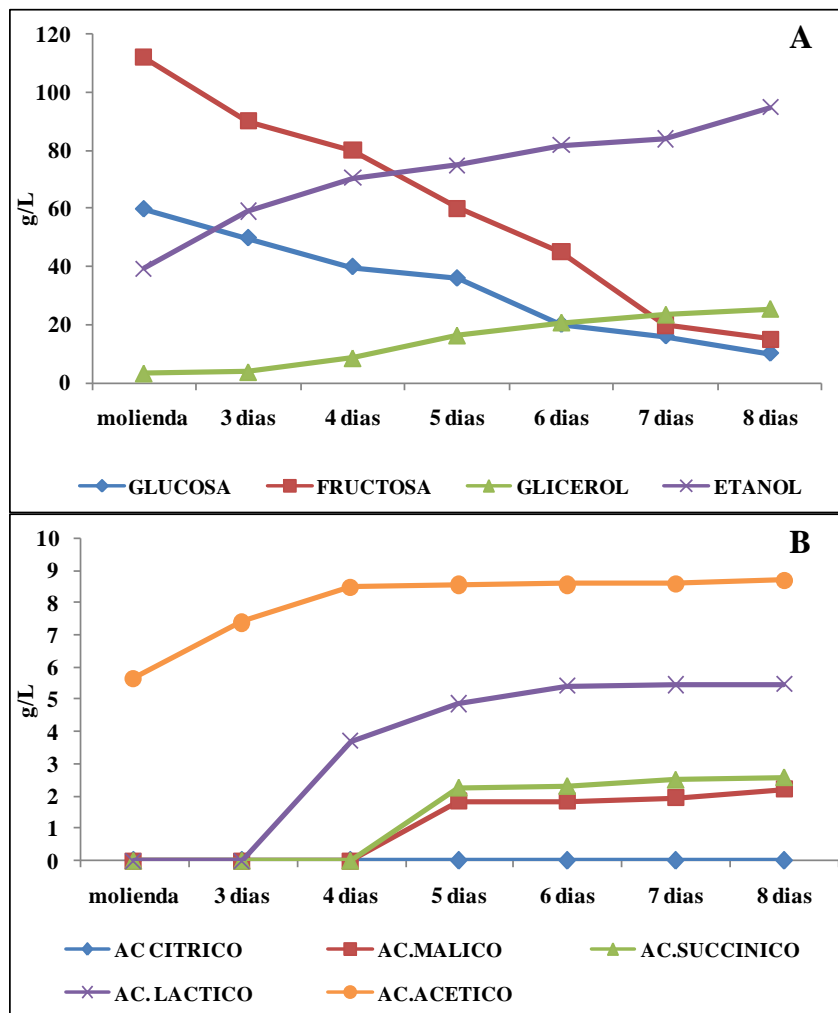


Figura 19. Evaluación de los principales metabolitos y azúcares presentes en la fermentación de los mostos en la mezcalera de Sierra Chiquita.. A) Principales metabolitos involucrados con la fermentación alcohólica. B) Ácidos orgánicos presentes

Para realizar este estudio se tomaron muestras del mismo mosto desde la etapa de molienda, y los días 3, 4, 5, 6, 7 y 8. Cabe mencionar que al día 8 este mosto es destilado para la producción del mezcal. Los resultados obtenidos en esta mezcalera industrializada permiten demostrar como desde un inicio se presentan altos niveles de ácido acético indicando la presencia de ambos tipos de fermentación, tanto alcohólica como maloláctica, (Figura 19B). También es posible observar una mayor acumulación de los ácidos orgánicos pertenecientes a la fermentación maloláctica a través de la cinética de fermentación alcanzando sus mayores niveles de acumulación a partir del día 6 y manteniendo hasta el final de la fermentación.

7.8.3 Cinética de la fermentación en la mezcalera Los Fresnos.

A partir de los resultados obtenidos del análisis por HPLC en la mezcalera Los Fresnos es posible apreciar claramente que los niveles de azúcares iniciales fueron de alrededor de 97.3 g/L y de 140 g/L para la glucosa y fructosa, respectivamente. Estos azúcares disminuyeron notablemente según avanza la fermentación hasta alcanzar un valor de 20 g/L para la glucosa y de 35 g/L para la fructosa indicando un elevado potencial fermentativo en este mosto. Consecuentemente, los valores de etanol aumentaron considerablemente hasta obtener un valor por arriba de 100 g/L (Figura 20A).

En cuanto a los ácidos orgánicos encontrados en estos mostos, los resultados fueron muy variados en comparación a los mostos de Sierra Chiquita. Sin embargo, los valores obtenidos en estos mostos durante la fermentación activa estuvieron muy relacionados con los valores obtenidos en la mezcalera Emilio Lozoya (Figura 20B), con rangos similares en cuanto, a los ácidos láctico, málico y succínico. El ácido láctico es el metabolito que más aumenta durante la cinética de fermentación en esta mezcalera, alcanzando valores de hasta 15 g/L (Figura 20B) e indicando una elevada fermentación maloláctica así mismo el ácido cítrico únicamente se encontró en esta mezcalera artesanal.

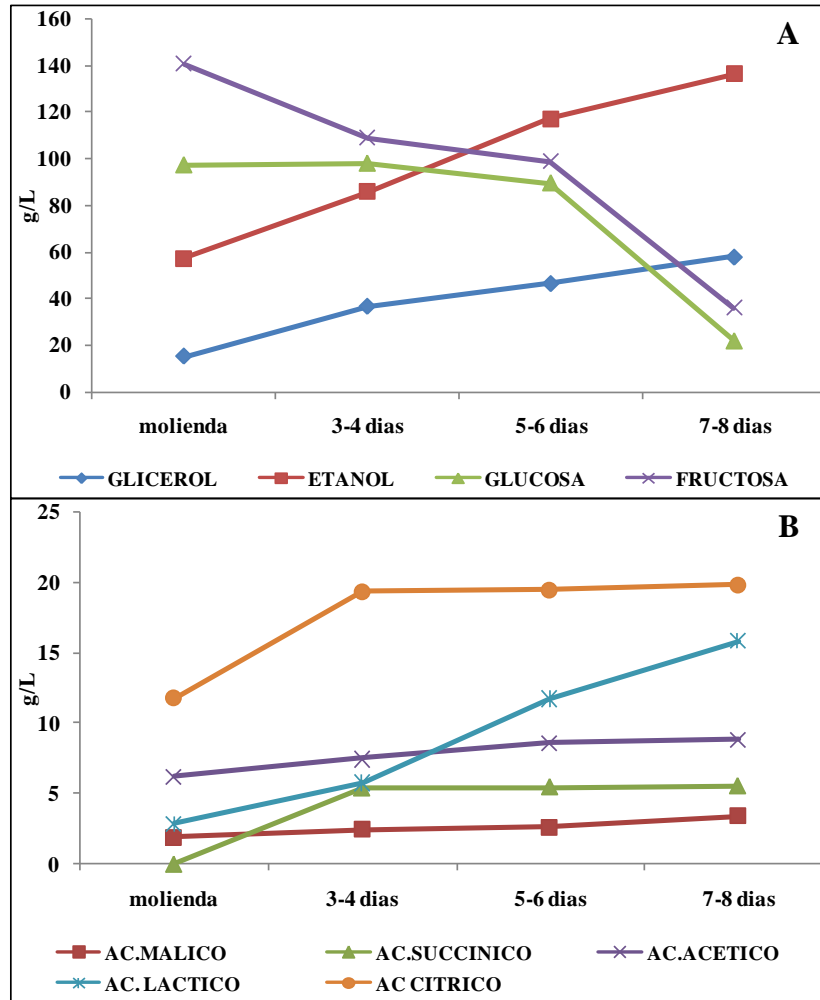


Figura 20. Azúcares residuales y metabolitos principales A), ácidos orgánicos, presentes en los mostos B) de la mezcalera Los Fresnos.

7.8.4 Análisis de los principales metabolitos de la fermentación

Paralelamente, a la cuantificación de los ácidos orgánicos se determinó también la acumulación de los principales metabolitos y sustratos de la fermentación alcohólica en los diferentes mostos de estudio.

Estos metabolitos abarcan los principales azúcares presentes (glucosa y fructosa) y los principales productos del metabolismo de las levaduras, el alcohol y el glicerol. Los resultados son presentados en la figura 21 donde se muestra claramente que la fábrica más industrializada con los niveles más bajos de producción de etanol es la fábrica más industrializada de Sierra Chiquita. Los contenidos de azúcares remanentes durante las

diferentes fases de fermentación activa (Inicial o A, y final o B) indican un consumo progresivo tanto de la glucosa como de la fructosa en las diferentes mezcaleras. Cabe hacer notar que el consumo de glucosa parece ser mayor al inicio de este tipo de fermentación en la mezcalera de Sierra Chiquita, aunque al final se homogeniza con las otras mezcaleras y sus producciones de alcohol se mantienen bajas. El contenido de glicerol se mantiene constante durante las dos fases principales de fermentación aunque la mezcalera de Sierra Chiquita presenta los niveles más bajos. Probablemente como consecuencia del menor estrés al cual se ven sometidos los microorganismos presentes en esta mezcalera como consecuencia de los menores niveles de alcohol reportados.

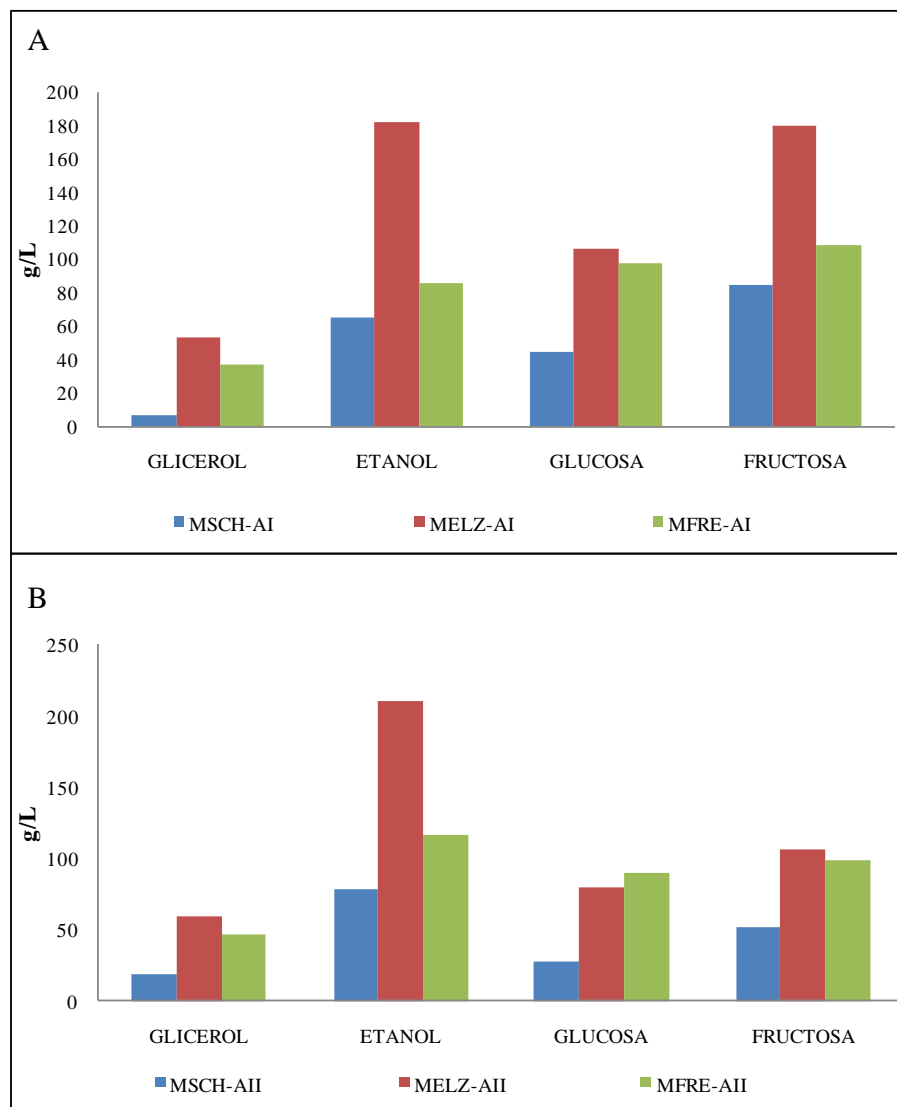


Figura 21. Evaluación de los sustratos y metabolitos principales de la fermentación alcohólica, presentes en la fermentación activa inicial A), y en la fermentación activa final B) de las diferentes mezcaleras de estudio.

7.8.5 Análisis de los ácidos orgánicos durante la fermentación

Se determinó la acumulación de los principales metabolitos resultantes de la fermentación en los diferentes mostos de estudio a través de la técnica de HPLC como se describió en la sección de metodología. Los principales metabolitos que se determinaron fueron los ácidos orgánicos, particularmente, el ácido láctico y el ácido málico, productos del metabolito maloláctico de las bacterias presentes en los mostos. Así mismo, también se determinaron los niveles de ácido succínico, ácido acético y ácido cítrico, compuestos provenientes tanto del metabolismo bacteriano como de las levaduras presentes en los mostos.

La figura 22 presenta la acumulación de los ácidos orgánicos seleccionados durante la fermentación activa inicial (A) y final (B) entre los mostos de estudio. Los resultados indican que durante la fermentación activa inicial los niveles de ácido láctico, succínico y acético se mantienen constantes entre los mostos de estudio. Sin embargo, los niveles de ácido málico se encuentran muy reducidos en la mezcalera mas artesanal (Emilio Lozoya), este ácido es un producto de la fermentación maloláctica. El ácido orgánico que presentó las mayores diferencias fue el ácido cítrico, un metabolito producido fundamentalmente por las levaduras, son significativamente elevados en la mezcalera Los Fresnos, indicando una mayor presencia metabólica de las levaduras presentes en estos mostos.

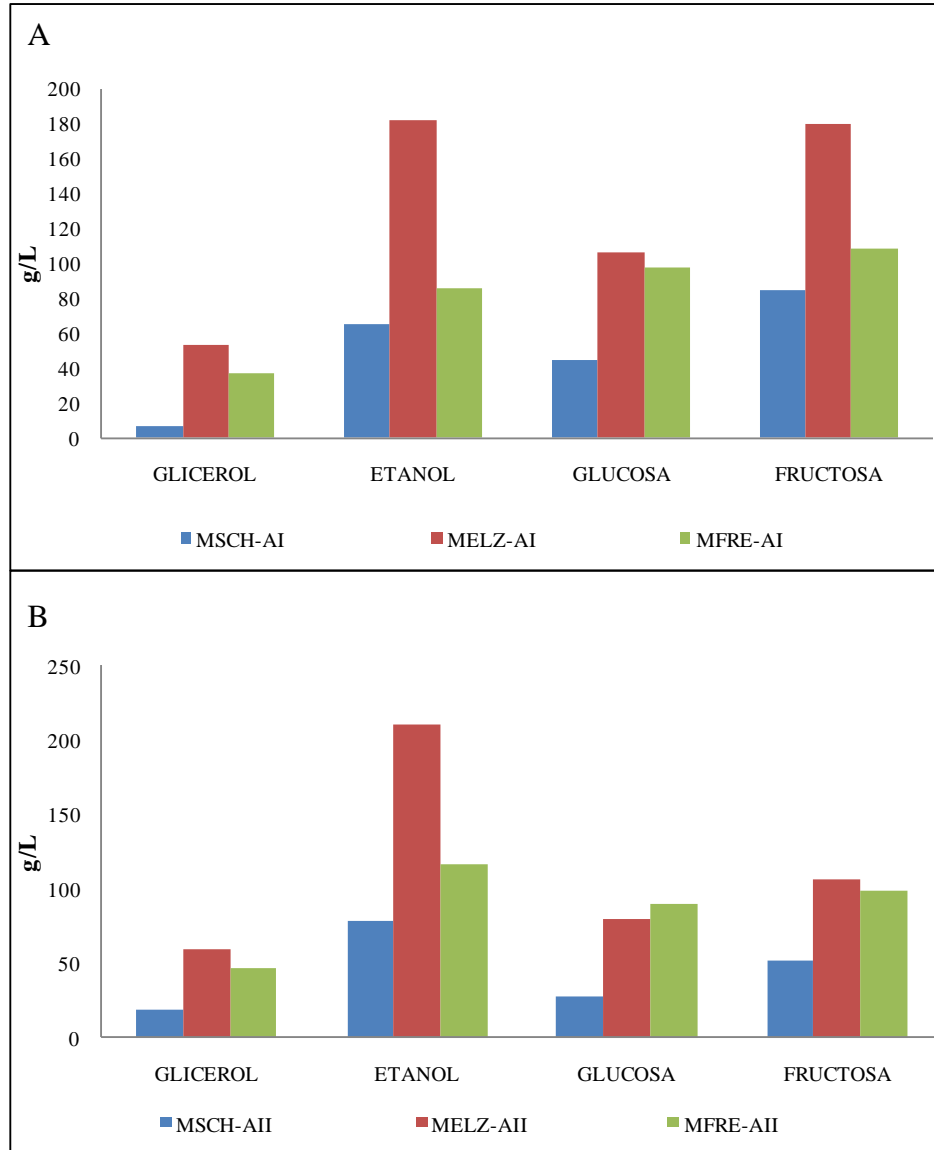


Figura 22. Evaluación de los ácidos orgánicos presentes en la fermentación activa inicial A), y activa final B) de las tres mezcaleras de estudio.

A medida que transcurre la fermentación se presentan cambios en el perfil de ácidos orgánicos. Los niveles de ácidos orgánicos aumentan en mayor medida en las mezcaleras de Emilio Lozoya y Los Fresnos sugiriendo una elevada fermentación maloláctica tardía en estas fabricas. Los niveles de los otros ácidos orgánicos se mantienen constantes de forma similar a la fermentación activa inicial con excepción nuevamente del ácido cítrico, el cual mantiene niveles muy abundantes en la mezcalera de Los Fresnos.

7.8.6 Análisis estadístico de los parámetros fisicoquímicos

A partir de la información obtenida del análisis de la micro diversidad metagenómica y del perfil general de metabolitos durante las cinéticas de fermentación se pudo definir a la etapa de fermentación activa final como la más contrastante entre los diferentes mostos de estudio. Por lo anterior, se seleccionó esta etapa para realizar un análisis estadístico más detallado de la acumulación de los metabolitos de interés involucrados en las fermentaciones de estos mostos. Para esto se realizó una prueba de ANDEVA con 95 % de confianza, para comprobar la existencia de diferencias significativas entre los mostos (Zar, 1996). En aquellas variables que demostraron ser estadísticamente diferentes se realizó adicionalmente una comparación de medias mediante el prueba de Dunn para conocer que fabrica de mezcal aportaba las mayores diferencias (Cuadro 18).

Cuadro 18 Análisis estadístico de los parámetros fisicoquímicos

Metabolito	P	p<0.05	Prueba of Dunn	Relaciones
Etanol	0.00357	≠	MELZ vs MSCH	Si
			MELZ vs MFRE	No
			MFRE vs MSCH	No
Glucosa	0.00357	≠	MELZ vs MSCH	Si
			MELZ vs MFRE	No
			MFRE vs MSCH	No
Fructosa	0.0107	≠	MELZ vs MSCH	Si
			MELZ vs MFRE	No
			MFRE vs MSCH	No
Glicerol	0.00357	≠	MELZ vs MSCH	Si
			MELZ vs MFRE	No
			MFRE vs MSCH	No
Acido Málico	0.00357	≠	MELZ vs MSCH	Si
			MELZ vs MFRE	No
			MFRE vs MSCH	No
Ácido Succínico	0.1000	=	No aplica	No aplica
Ácido Láctico	0.00357	≠	MELZ vs MSCH	Si
			MELZ vs MFRE	No
			MFRE vs MSCH	No
Ácido Acético	0.00357	≠	MELZ vs MSCH	Si
			MELZ vs MFRE	No
			MFRE vs MSCH	No

Los resultados de este análisis permiten sugerir que la mezcalera más industrializada de Sierra Chiquita (MSCH) es la más diferente a nivel de su perfil metabólico presentando diferencias significativas en casi todos los metabolitos analizados. De igual forma, es posible concluir que las mezcaleras más artesanales de MFRE y MELZ son más parecidas entre sí para la mayoría de los metabolitos analizados.

7.9 Análisis de preferencia de consumo de los destilados de las mezcaleras de estudio

Los resultados obtenidos del análisis de preferencia de consumo permiten establecer claras diferencias entre los destilados obtenidos de las diferentes mezcaleras de estudio. Los resultados más contrastantes se obtuvieron para el grado de fortaleza alcohólica, donde la mezcalera de Sierra Chiquita fue la más aceptada (Figura 23). Cabe mencionar que esta mezcalera presentó los niveles más bajos de alcohol (Figura 21) y es la más industrializada.

Los resultados obtenidos de las preferencias de consumo sobre la fortaleza alcohólica de las diferentes mezcaleras estuvieron directamente relacionados con la percepción de sabor de los mezcales. De esta forma, el mezcal producido en la fábrica de Sierra Chiquita presentó los niveles más altos de aceptación por su sabor. Otras variables que influenciaron también en la percepción del sabor fueron la acidez y el olor, las cuales fueron más aceptadas en la fábrica de Sierra Chiquita. Estas variables están altamente influenciadas por la carga microbiana bacteriana, particularmente de bacterias ácido lácticas. Los resultados obtenidos para las fábricas de mezcal de Los Fresnos y de Emilio Lozoya también coincidieron en un elevado número de estas bacterias y coincidieron también a nivel de los perfiles microbianos presentes (Figura 10, Cuadro 17). Las elevadas cargas microbianas detectadas en estas dos últimas fábricas, aunadas a su olor y sabor penetrante son producto de su proceso de elaboración más artesanal y en este estudio disminuyeron notablemente su aceptación (sabor) entre el público general. Sin embargo, el olor y el sabor penetrante fueron muy apreciados entre el público más acostumbrado a altos niveles de alcohol y que declararon consumir mezcal más frecuentemente.

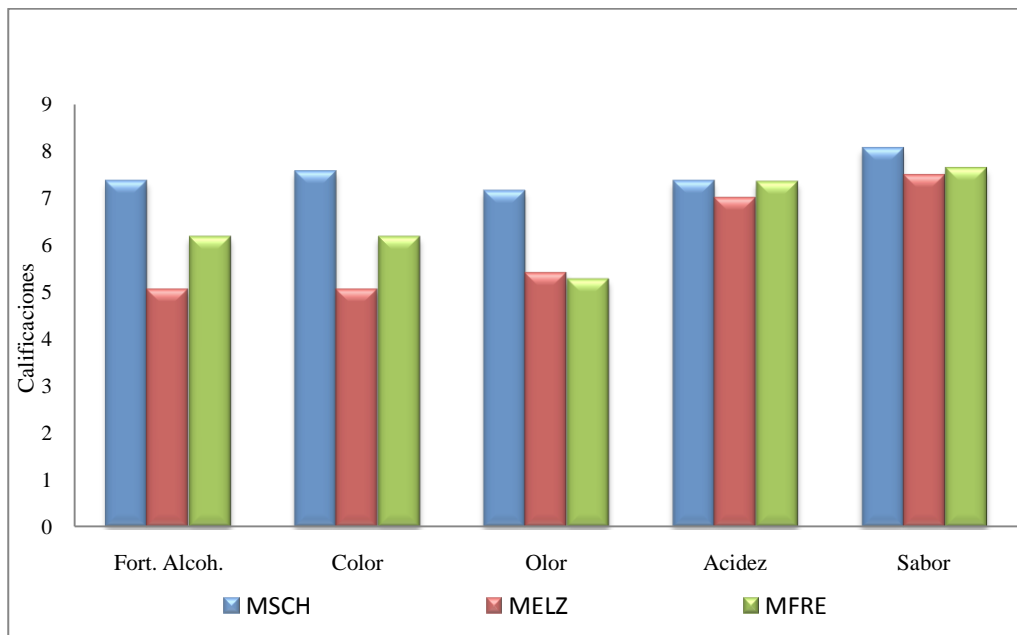


Figura 23. Preferencia de consumo evaluando promedios generales de las mezcaleras Sierra Chiquita, Emilio Lozoya y Los Fresnos.

La figura 23 presenta los niveles de preferencia de consumo ajustados por consumidores que prefirieron algún mezcal en particular. Los consumidores que prefirieron al mezcal producido por la fábrica más industrializada, el mezcal de Sierra Chiquita, siempre marcaron a la variable de fortaleza alcohólica como la más contrastante entre los destilados de las diferentes mezcaleras y reflejaron su importancia en las preferencias finales de sabor. Cabe mencionar, que de forma general estos consumidores declararon no consumir mezcal frecuentemente y que corresponden a la mayoría de la muestras con 60%.

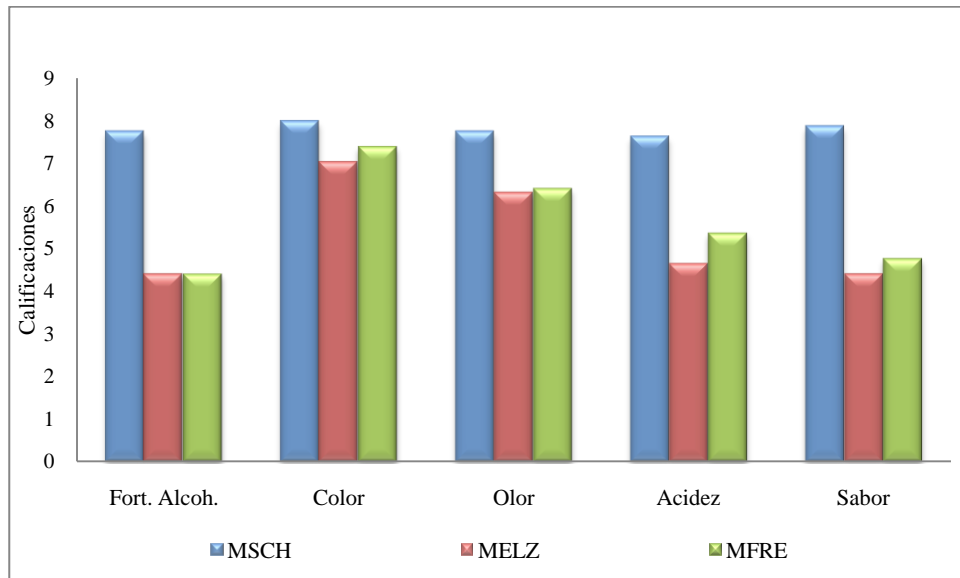


Figura 24 Consumidores que prefirieron el mezcal destilado de Sierra Chiquita.

Los resultados cambian notablemente cuando se analizan por separado los consumidores que prefirieron algunos de los destilados producidos por las mezcaleras más artesanales. De esta forma cuando se analiza por separado las preferencias de los consumidores que prefirieron el mezcal más artesanal (Mezcalera de Emilio Lozoya). Los resultados indican que el elevado grado alcohólico fue muy aceptado (Figura 25). Cabe mencionar que esta mezcalera produce los mayores niveles de alcohol con cerca de 180 a 200 g/L al final de la fermentación (Figura 20). De igual forma, por su mismo proceso de elaboración más artesanal presentó un perfil microbiano muy diferente a los mostos de la mezcalera de Sierra Chiquita. Este perfil microbiano fue particularmente caracterizado por bacterias ácido lácticas y le confirieron a este mezcal una acidez y sabor penetrante. Para los consumidores acostumbrados a consumir destilados con un elevado grado alcohólico (Figura 25), estas últimas variables fueron muy aceptadas con valores, inclusive mayores a los resultados obtenidos para los destilados de Sierra Chiquita.

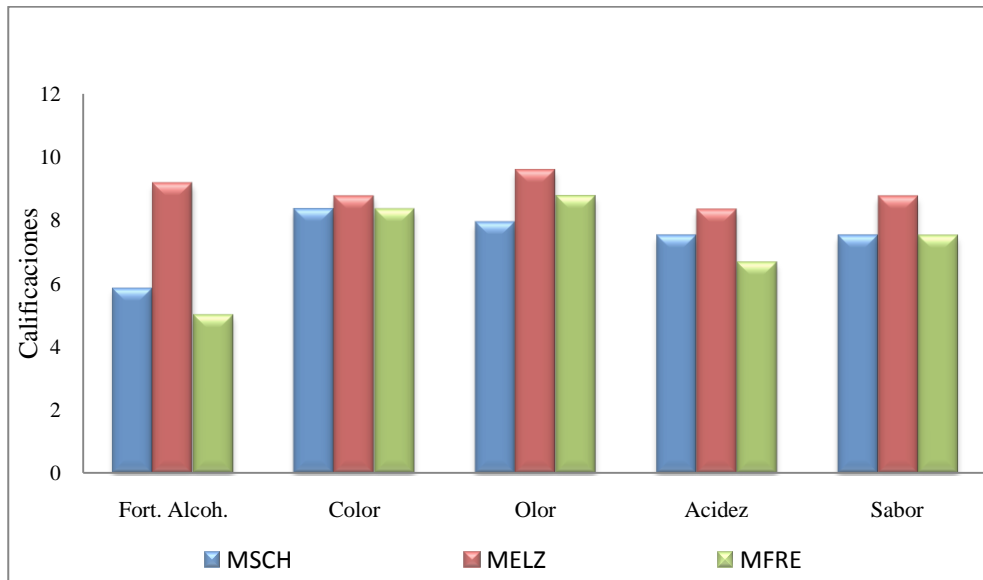


Figura 25 Consumidores que prefirieron el mezcal destilado de Emilio Lozoya

El grupo minoritario de los consumidores que prefirieron el mezcal de Emilio Lozoya, pudieron confirmar en su mayoría que este tenía el grado alcohólico más elevado, así como de mayor acidez en comparación a los otros dos mezcales y fue elegido porque su sabor y aroma era más penetrante y para gustos exclusivos, sin embargo los otros grupos que eligieron tanto el mezcal de Sierra Chiquita como el de Los Fresnos, le otorgaron calificaciones altas a este mezcal en cuanto a color, olor y sabor.

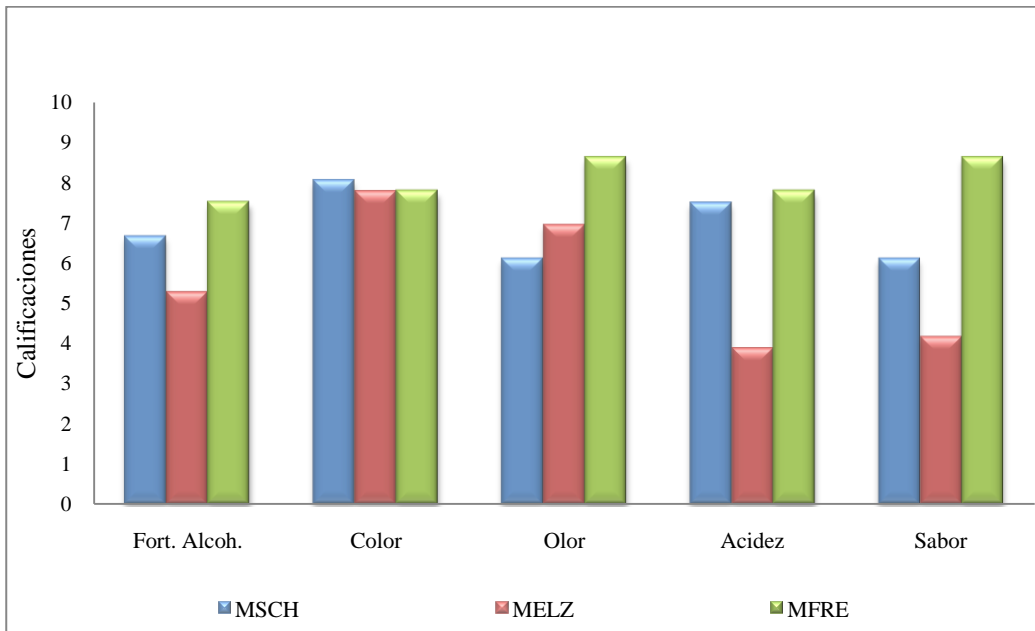


Figura 26 Consumidores que prefirieron el mezcal destilado de Los Fresnos.

En el caso de los consumidores que prefirieron el mezcal de Los Fresnos lo declararon a nivel intermedio de fortaleza alcohólica. Y con sabor más afrutado que ácido. Como se mencionó en la sección anterior, mediante el análisis fisicoquímico, se pudo comprobar que este mezcal tiene la peculiaridad de presentar altos niveles de ácido cítrico entre 9 y 11 g/L (Figura 22B). Así como el valor más alto de alcohol en su etapa final de fermentación que oscila en 117 g/L (Figura 22A) mismo que le hace ser el segundo mezcal después del de Emilio Lozoya en Fortaleza alcohólica y en grado artesanal.

8 DISCUSIÓN

Influencia del grado de industrialización de las mezcaleras en las propiedades del mezcal

Las mezcaleras seleccionadas para este estudio presentan características contrastantes en lo referente a su grado de industrialización. Los instrumentos empleados para la elaboración de mezcal, así como sus características ambientales y físicas influyeron notablemente en las diferencias observadas en el proceso fermentativo y en el grado de preferencia por el consumidor. A nivel general, las diferencias de producción más notorias entre las mezcaleras son la forma de la molienda, el contenedor de la fermentación y el tipo de alambique empleado para la destilación (Figura 7 y Cuadro 14). Un detalle importante a considerar en el proceso de elaboración del mezcal es el grado de higiene donde la mezcalera de sierra chiquita es la que presentó los controles de calidad más altos. En general, existen pocos estudios enfocados a conocer el proceso de elaboración del mezcal (Narváez y Sánchez., 2009). La mayoría de los reportes se concretan en describir el proceso de elaboración, pero no incluyen descripciones cualitativas ni cuantitativas de las diferencias entre las mezcaleras. En este sentido la mayoría de los estudios han sido principalmente enfocados con la composición de los destilados (De León *et al.*, 2006). Este último trabajo, demuestra la presencia de alcoholes saturados, acetato de etilo y ácido acético como componentes principales de los destilados.

Los resultados del presente estudio confirman la abundancia de estos compuestos en los mostos, además de la presencia de diversos tipos de ácidos orgánicos relacionados con la fermentación maloláctica. Son precisamente las diferencias significativas ($p > 0.005$) encontradas en la mayoría de los metabolitos acumulados entre las diferentes mezcaleras las que cambian drásticamente las preferencias de consumo en los destilados resultantes, siendo los valores detectados más importantes, el grado alcohólico y la acidez de los mezcales. Estas variables están estrechamente relacionadas con las diferencias encontradas en el contenido de alcoholes saturados y de ácidos orgánicos de los mostos ya mencionados (Figura 27).

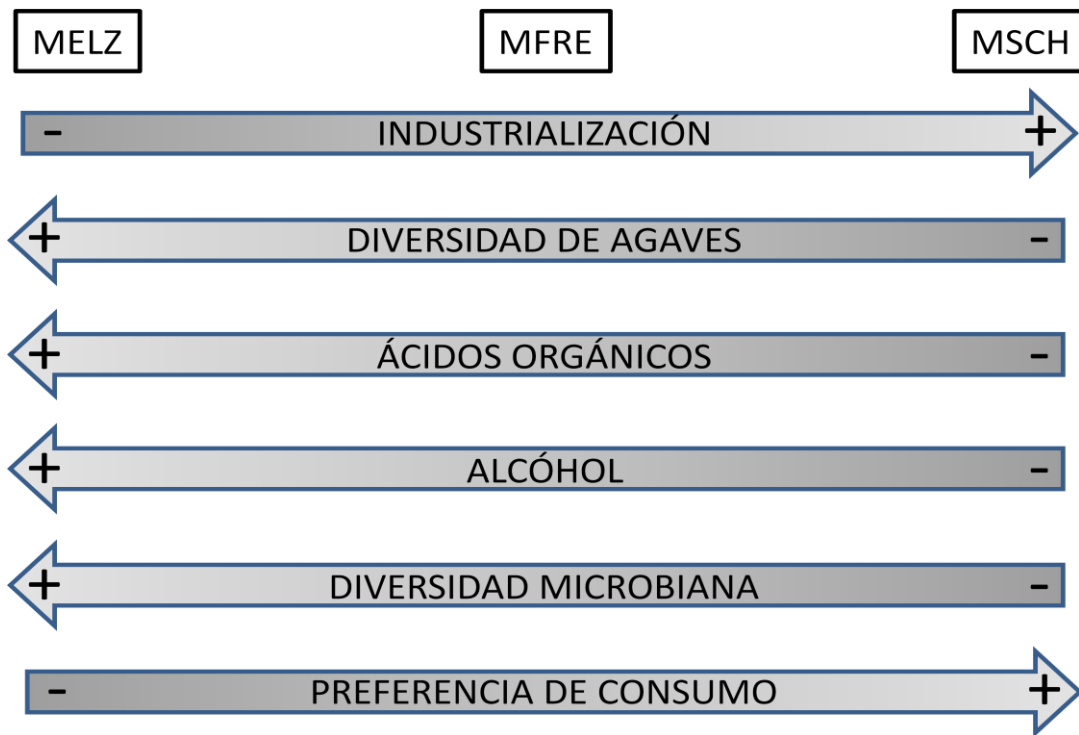


Figura 27. Relación de los principales descriptores comparativos entre las mezcaleras de estudio del estado de Tamaulipas. La dirección de las flechas y el símbolo indican mayor ó menor nivel en la característica señalada. MELZ: Mezcalera Emilio Lozoya, MFRE: Mezcalera los Fresnos, MSCH: Mezcalera Sierra Chiquita.

En términos generales la mezcalera más industrializada; la mezcalera de Sierra Chiquita fue la que presentó las mayores preferencias de consumo, y los niveles de acumulación de metabolitos (alcoholes y ácidos orgánicos) más controlados. El proceso de industrialización aplicado a la elaboración de este mezcal esta ajustado a las preferencias de consumo de la mayoría de la gente y por lo tanto posee menores cantidades de ácidos orgánicos (lo que implica una menor fermentación maloláctica) y un menor grado alcohólico. No obstante a lo anterior, existe una subpoblación conocedora del mezcal (aproximadamente el 30% del público encuestado) que prefiere los mezcales con proceso de elaboración mas artesanal. Estos como se discutió anteriormente son más ácidos, con un sabor y un olor más penetrante, y en términos generales acumulan más alcohol como producto de una fermentación alcohólica más eficiente por efecto de microorganismos endógenos que se adaptan mejor a las condiciones artesanales de elaboración. La literatura solo presenta un estudio enfocado a incrementar el grado de industrialización de la

fermentación en el mezcal con producciones de alcohol de hasta 105 g/L (De León *et al.*, 2008). El estudio no contempla el análisis de las preferencias de consumo de estos destilados, aunque se asume que estos niveles de alcohol tan altos pueden afectar la preferencia de estos mezcales. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que los mostos artesanales son menos eficientes a nivel de la producción de alcohol, pero estos poseen también una gran cantidad de otras biomoléculas de importancia organoléptica, como el glicerol (textura) y el ácido cítrico (acidez). En términos generales y en términos del análisis realizado para un público no entrenado previamente, los mezcales más artesanales son menos preferidos que el industrializado (Figura 27).

Comparación de la fermentación del mezcal Tamaulipeco con otras bebidas fermentadas

Los altos niveles de fructosa y glucosa (con valores cercanos a 200g/L en sus etapas iniciales) encontrados en los mostos de estudio permitieron el desarrollo de una compleja comunidad microbiana, caracterizada principalmente por bacterias ácido lácticas, las cuales probablemente contribuyeron al incremento de los niveles de los diferentes ácidos orgánicos (valores de 0.5g a 20g/L) en las etapas finales de la fermentación. Lo anterior fue más notorio en las mezcaleras artesanales. La literatura presenta varios ejemplos de fermentaciones malolácticas al final del proceso fermentativo en diferentes bebidas de gran arraigo cultural. De esta forma, Fleet *et al.*, (1984) estudiando mostos de uva observó también un alto contenido inicial de glucosa y una elevada concentración final de acetato, lactato y alcoholes. Estos autores también caracterizaron algunos microorganismos del género *Lactobacillus sp.* en estos mostos. En otro estudio más reciente realizado por Escalante *et al.*, (2004) en el pulque, se encontró una elevada fermentación maloláctica y viscosa al final del proceso productivo de esta bebida. Estos autores también encontraron la presencia de bacterias ácido lácticas de las especies *L. acidophilus*, *L. acetotolerans*, *L. plantarum*, *L. hilgardii* y *Leuconostoc pseudomesenteroides*.

La fermentación maloláctica y la presencia de bacterias ácido lácticas también ha sido demostrada en otras bebidas no alcohólicas. Por ejemplo, en el vinagre balsámico tradicional, una bebida caracterizada por su elevada cantidad de solutos solubles, se observó una elevada fermentación maloláctica (Soleri *et al.*, 2007). Resultados similares al

mezcal tamaulipeco también fueron encontrados en otra bebida tradicional mexicana, el pozol, donde se encontró la presencia de bacterias ácido lácticas durante su fermentación maloláctica (Díaz *et al.*, 2003).

Comparación de las comunidades microbianas de mostos de mezcal con otras bebidas

Los estudios de diversidad microbiana en bebidas mexicanas son escasos ya que la mayoría han sido enfocados a la industrialización y producción de etanol principalmente en tequila. Los estudios que se han realizado en el mezcal son pocos y están dirigidos a la caracterización de los compuestos volátiles presentes en esta bebida.

A nivel de los microorganismos presentes en el mezcal, la literatura solo presenta un estudio muy reciente a través de tecnología estándar de microbiología (Escalante *et al.*, 2009). Este estudio permitió aislar e identificar algunas especies de bacterias a partir de mostos obtenidos de *A. salmiana*, un agave diferente a los utilizados para la elaboración del mezcal en los mostos de este estudio (cuadro 14). Las bacterias identificadas en los mostos de *A. salmiana* incluyen algunas bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus ponti*, *L. kefir*, *L. plantarum* y *L. farraginis*. Este estudio no hace referencia acerca de la ocurrencia de estos microorganismos en alguna fase específica de la fermentación.

Paralelamente, nuestro grupo de trabajo ha identificado a nivel metagenómico y utilizando cebadores específicos una elevada población de bacterias ácido lácticas durante la fermentación de una Mezcalera artesanal en estado de Tamaulipas (Narváez *et al.*, sometido). Este estudio permitió confirmar la presencia de las especies previamente reportadas por Escalante *et al.*, (2009), así como la presencia de otras bacterias ácido lácticas relacionadas con procesos fermentativos en alimentos como son: *Pediococcus parvulus*, *L. brevis*, *L. composti* y *L. parabuchneri*. Finalmente, este estudio permitió identificar algunos géneros típicos en procesos fermentativos como *Weissella sp* y *Bacillus sp*, microorganismos también reportados en este estudio, y una elevada acumulación de metabolitos asociados a la fermentación maloláctica. Interesantemente, Narváez *et al.*, (sometido) no encontró bacterias acéticas relacionadas a este tipo de fermentación, probablemente por el empleo de cebadores específicos al grupo de las bacterias ácido lácticas. Contrastantemente, el presente reporte demuestra una población de bacterias

acéticas como *Acetobacter pasteurianus*, *Tanticharoenia sakaeratensis* y varias *Acetobacter sp.* no cultivables, obtenidas empleando los cebadores COM y 16S de las regiones 5S y 16S del ADN ribosomal, respectivamente. La presencia de bacterias acéticas han sido reportadas ampliamente en otros procesos fermentativos como los mostos de vino (Joyeux *et al.*, 1984). Cabe mencionar, que con el empleo de los cebadores 16S también fue posible identificar una elevada población de bacterias asociadas al género *Methylobacterium sp.* y al género *Enterococcus sp.*, microorganismos muy abundantes en el suelo y en las hojas de las plantas, y probablemente presentes por las características artesanales de fermentación de los mostos de algunas de las mezcaleras de estudio. Finalmente, es importante mencionar, que el empleo combinado de diferentes cebadores para PCR en el análisis metagenómico permitió expandir el número de microorganismos identificados y abarcar grupos de microorganismos diferentes a las más abundantes bacterias ácido lácticas ya reportadas en trabajos previos (Narváez *et al.*, sometido; Escalante *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo con diferentes conjuntos de cebadores permitieron identificar una elevada población microbiana (47 especies de bacterias) caracterizada principalmente por la presencia de bacterias ácido lácticas en los mostos seleccionados. Entre las especies más abundantes podemos mencionar a *L. buchneri* involucrada con la producción de ácido láctico y acético durante la fermentación (Sul *et al.*, 2007; Pasteris y Strasser, 2009), algunas bacterias con potencial probiótico como *L. sakei*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* y *L. parakefiri* (Gupta y Garg, 2009) (Figura 13).

Adicionalmente, fueron identificadas bacterias que ya habían sido reportadas en procesos fermentativos relacionados, como los mostos de vino donde se encontraron a *L. casei*, *L. hilgardi* y *L. plantarum* (Watanabe *et al.*, 2009) encontrada también en el mezcal (Escalante *et al.*, 2009). Los resultados de la microflora bacteriana encontrada en estos mostos esta en correspondencia con las elevadas cantidades de los ácidos láctico, málico y acético encontrados durante la fermentación de los mismos (Figura 19 a la 22) siendo ampliamente abundantes las bacterias lácticas y acéticas (Cuadro 17).

A nivel de la comparación entre los perfiles microbianos de las diferentes mezcaleras es importante hacer notar las claras diferencias encontradas entre las mezcaleras artesanales (Fresnos y Emilio Lozoya) y la mezcalera industrializada (Sierra chiquita).

Estas diferencias fueron ampliamente ratificadas a través de la comparación de los perfiles microbianos obtenidos con diferentes cebadores universales (Cuadro 9) o bien empleando diferentes métodos de análisis metagenómico (SSCP ó DGGE) (Figura 10) a través del índice de similitud de Sorensen (1961). Los cebadores universales que generaron las mayores diferencias entre los perfiles microbianos de las diferentes mezcaleras fueron el COM y el 16S.

El análisis de la ocurrencia de especies de bacterias específicas durante la fermentación entre los diferentes mostos de estudio permitió identificar una abundante presencia de bacterias ácido lácticas durante la fermentación activa, con bacterias generales entre los mostos de estudio y específicas para las mezcaleras artesanales (Cuadro 17), apoyando los resultados obtenidos con los elevados niveles de ácidos orgánicos asociados con la fermentación maloláctica y el penetrante sabor y aroma de estos mostos analizados.

A la fecha no existen estudios comparativos a nivel de la ocurrencia de microorganismos entre diferentes mezcaleras. La literatura no presenta ningún estudio de análisis comparativo entre procesos fermentativos de alguna bebida alcohólica, y menos aun empleando técnicas metagenómicas. Lo anterior debido a las limitaciones técnicas del aislamiento de ácidos nucleicos de mostos activos. Siendo este el primer estudio donde se estandarizó un método para realizar este tipo de análisis. No obstante la literatura presenta un trabajo de análisis metagenómico aplicado sobre la superficies de uvas que son utilizadas para la producción de diferentes tipos de vino, donde los resultados de ese estudio permitieron identificar que existen diferencias entre las poblaciones endógenas de microorganismos, particularmente de levaduras, de acuerdo al tipo de uva a utilizar (Shiraz ó Chardonnay) y que estas diferencias podrían influir directamente en el sabor y aroma final de los vinos producidos (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004). El análisis metodológico basado en técnicas metagenómicas aplicado en el presente trabajo permite ampliar el campo de análisis de otros procesos fermentativos en sistemas de interés comercial como la producción de tequila, vinos o cervezas ya que hasta la fecha este tipo de estudios solo se ha realizado por técnicas de microbiología estándar.

9 CONCLUSIONES

1. El empleo de técnicas de análisis metagenómico permitió identificar un gran número de especies bacterianas en los diferentes mostos de estudio. La mayoría de estas bacterias pertenecen al grupo de las ácido lácticas, con algunas especies dominantes en la mayoría de las etapas de la fermentación como son: *L. rhamnosus*, *L. parakefiri*, *L. sakei*, *L. pentosus* y *L. plantarum*.

2. El empleo de diversos conjuntos de cebadores universales para diferentes partes de la secuencia ribosomal amplió la diversidad de los microorganismos encontrados en las diferentes fases de la fermentación en los mostos de estudio, hasta un total de 49 microorganismos diferentes incluyendo además de las bacterias ácido lácticas, bacterias acéticas, y diferentes especies de enterobacterias.

3. El análisis de la diversidad de microorganismos calculado a partir de los perfiles metagenómicos permitió agrupar siempre los procesos fermentativos de las mezcaleras artesanales con respecto a la mezcalera industrializada, sugiriendo que el grado de industrialización en la producción del mezcal modifica el perfil microbiano implicado en la producción del mismo.

4. A nivel de preferencia de consumo el mezcal producido industrialmente se separa ampliamente de los mezcales producidos artesanalmente, generando dos tipos diferentes de consumidores, el primero y más amplio, que prefiere el mezcal producido de forma más industrializada y con un sabor menos penetrante así como también menor carga alcohólica y un segundo pequeño grupo de consumidores que prefieren el mezcal más artesanal con un sabor y olor más penetrante, y en términos generales con una carga alcohólica más fuerte.

5. El análisis fisicoquímico de los diferentes mostos de estudio permitió concluir que los microorganismos presentes en los mostos de las mezcaleras artesanales acumulan mayores cantidades de metabolitos asociados a la fermentación maloláctica y son fermentadores más eficientemente a este tipo de agaves, ya que presentan cargas alcohólicas superiores a el mosto fermentado de forma más industrializada.

6. El presente trabajo es el primer estudio metagenómico directo en un sistema alcohólico fermentativo. Siendo el mezcal la primera bebida alcohólica caracterizada en un estudio comparativo entre fábricas que incluye características fisicoquímicas, perfiles genético microbianos y de preferencias de consumo.

10 RECOMENDACIONES

A partir de los resultados del presente trabajo se sugiere continuar con este tipo de análisis metagenómico para conocer el perfil microbiano de las levaduras presentes durante la cinética de fermentación de los mostos del mezcal.

Se propone ampliar este tipo de análisis a otras mezcateras del estado de Tamaulipas y de otros estados de México, con el fin de conocer las diferencias existentes entre los diferentes mezcales de las diversas zonas con denominación de origen en México.

Se propone realizar una caracterización más detallada de las bacterias ácido lácticas presentes en estos mostos, ya que muchas de ellas están relacionadas con microorganismos con potencial probiótico.

11 GLOSARIO

ADN. Acido Desoxirribonucleico: ácido nucleicos formado por nucleótidos en los que el azúcar es desoxirribosa, y las bases nitrogenadas son adenina, timina, citosina y guanina. Excepto en los retrovirus que tienen ARN, el ADN codifica la información para la reproducción y funcionamiento de las células y para la replicación de la propia molécula de ADN. Representa la copia de seguridad o depósito de la información genética primaria, que en las células eucarióticas está confinada en la caja fuerte del núcleo.

Acido nucleico. Biomolécula formada por macropolímeros de nucleótidos, o polinucleótidos. Está presente en todas las células y constituye la base material de la herencia que se transmite de una a otra generación. Existen dos tipos, el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN).

ADNr. Ácido ribonucleico. ácido nucleico formado por nucleótidos en los que el azúcar es ribosa, y las bases nitrogenadas son adenina, uracilo, citosina y guanina. Actúa como intermediario y complemento de las instrucciones genéticas codificadas en el ADN.

Alambique. Del árabe *al - ambiq*, y este a su vez del griego *ambicos* = vaso), es el sistema de destilación más utilizado. El equipo consta de una caldera de cobre, de capacidad variable, un capacet condensador prolongado en un cuello de cisne (o trompa de elefante), un condensador refrigerante cilíndrico (bidón) provisto en su interior de un serpentín de cobre, conectable al cuello de cisne y con salida para el destilado en su parte inferior y una base para el condensador refrigerante.

Algoritmo genético. Un algoritmo genético es un método de búsqueda dirigida basada en probabilidad al aumentar el número de iteraciones, la probabilidad de tener el óptimo en la población tiende a 1 (uno).

Amortiguador. Sustancias químicas que modifican la cantidad de iones de hidrógeno.

Arbol filogenético. Muestra las relaciones de evolución entre varias especies u otras entidades que se cree que tuvieron una descendencia común. Un árbol filogenético es una forma de cladograma.

Bioedit. Es un programa informático de secuencias el cual permite la manipulación y análisis de múltiples secuencias y contiene aplicaciones que facilitan su alineamiento.

BLAST. Es un programa informático que emplea un algoritmo heurístico lleva a cabo un alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema (también denominada en la literatura secuencia *query*) contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos.

Cebador. Cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN.

Cepa. Es un grupo de aislamientos caracterizados de un microorganismo. Esencialmente esto se aplica a aislamientos del laboratorio, cultivos o selección, raza, variedad.

Dendrograma. Tipo de representación gráfica o diagrama de datos en forma de árbol (Dendro=árbol) que organiza los datos en subcategorías que se van dividiendo en otros hasta llegar al nivel de detalle deseado (asemejándose a las ramas de un árbol que se van dividiendo en otras sucesivamente).

Destilación. La destilación es el procedimiento más utilizado para la separación y purificación de líquidos, y es el que se utiliza siempre que se pretende separar un líquido de sus impurezas no volátiles.

DGGE. Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante, es un método molecular de huella genética que emplea productos de PCR, separa secuencias de diferentes longitudes y que corresponden a diversos dominios de microorganismos.

Electroforesis. Migración de partículas a través de una matriz obedeciendo a un campo eléctrico.

Electroforesis en geles de agarosa. Electroforesis que se lleva a cabo en un gel de agarosa y se emplea para separar moléculas de ADN de entre 100 y 50kb en longitud. La migración del ADN en geles de agarosa depende de su tamaño y de la forma o arreglo de las moléculas.

Electroforesis en geles de poliacrilamida. Técnica mediante la cual fragmentos de ADN se movilizan y separan gracias a una corriente aplicada a través de un gel, el cual está compuesto por una molécula de acrilamida con enlaces transversales que forman una criba molecular. Este tipo de electroforesis tiene una mejor resolución.

Espectrofotómetro. Instrumento empleado para medir la cantidad de luz de una longitud de onda específica absorbida por una solución.

Fermentación. Conversión biológica anaeróbica (sin oxígeno) de las moléculas orgánicas, generalmente hidratos de carbono, en alcohol, ácido láctico y gases, mediante la acción de ciertos enzimas que actúan bien directamente o como componentes de ciertas bacterias y levaduras. En su uso más coloquial, el término hace referencia a menudo a bioprocesos que no están estrictamente relacionados con la fermentación.

Fermentación alcohólica. Es un proceso biológico de fermentación en ausencia de aire originado por la actividad de microorganismos que procesan los hidratos de carbono para obtener como productos finales el etanol dióxido de carbono en forma de gas y ATP.

Fermentación maloláctica. Es el proceso por el cual el ácido málico presente en las frutas se transforma químicamente en ácido láctico; por medio de bacterias de origen láctico existentes de forma natural en el entorno, o en el interior de la fruta misma.

HPLC. Cromatografía líquida de alta eficiencia emplea una fase móvil que es un líquido que fluye a través de una columna que contiene una fase líquida

Mega 4. Es una herramienta para trabajar con el alineamiento de secuencias manual y automáticamente para la realización de árboles filogenéticos empleando secuencias de las bases de datos, también estima rangos de evolución molecular y examinando las hipótesis evolutivas.

Metagenoma. Es el ADN de un consorcio microbiano compuesto de varios genomas que corresponden a diversos microorganismos.

Mezcal. Del nahuatl metl e Izcalli que significa agave cocido al horno. Es una bebida alcohólica tradicional mexicana a base de agave.

Molino egipcio. Es un molidor de frutas como el agave que consta de una rueda de aproximadamente 500 kg de peso unida a un eje y que es tirada por un caballo.

Mosto. Sustrato donde se lleva a cabo la fermentación de las bebidas alcohólicas. Compuesto de azúcares tales como glucosa y fructosa, además de ácidos orgánicos, tales como ac. acético, ac. láctico, ac. málico, ac. succínico, ac. cítrico. Y alcoholes tales como etanol y metanol, la materia orgánica puede variar de acuerdo al tipo de bebida que se elabore, en el caso del mezcal se emplea el agave. Y en el caso de los vinos se emplea la uva.

Propiedades organolépticas. Son el conjunto de descripciones de las características físicas que tiene la materia en general, como por ejemplo su sabor, textura, olor, color. Todas estas sensaciones producen al comer una sensación agradable o desagradable.

Pares de base. Dos nucleótidos opuestos y complementarios en las cadenas de ADN y ARN que están conectadas por puentes de hidrógeno.

PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa. Técnica de análisis del genoma mediante la amplificación ilimitada de porciones específicas del ADN. Es un método revolucionario de amplificación exponencial del ADN por la intervención de una enzima termoestable, la *Taq* polimerasa, inventado por el americano Kary Mullis en 1985.

Proteínas. Macromoléculas formadas por unidades de aminoácidos.

Pulque. Bebida fermentada a base de jugo fermentado de agave.

Secuencia de ADN. Orden de encadenamiento de las bases nitrogenadas de los nucleótidos que constituyen el ADN y que cifra toda la información genética. Cuando es codificante (exón), define el orden de los aminoácidos que forman la proteína correspondiente.

SSCP. Es un proceso donde los productos de PCR son desnaturalizados en cadena simples de ADN, luego renaturalizados para favorecer los apareamientos intracatenarios y finalmente analizados en un gel de poliacrilamida. La estructura de ADN adoptará una conformación y permitirá la diferenciación en el gel.

Taq ADN polimerasa. Es una enzima que se extrae de la bacteria *Thermus aquaticus* para la replicación del ADN, es ampliamente utilizada por sus propiedades de termorresistencia en las reacciones de PCR.

Trapiche. Es un molino artesanal utilizado para extraer el jugo de plantas tales como el agave.

12 LITERATURA CITADA

- Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, and David J. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. *J. Molecular Biology* 215:403-10.
- Amann, R.I., Ludwig, W, Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells withoutt cultivation. *Microbiology Review* 59:143-169
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (2002). Short protocols in molecular biology. 5ta. Ed. Greene Publishing and Wiley-Interscience. New York, NY.
- Benn, M.S., Peppard, L.T. (1996). Characterization of Tequila Flavor by Instrumental and Sensory Analysis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 44:557-56.
- Berry, A.E., Chiocchini, C., Selby, T., Sosio, M., Wellington, E.M.H. (2003). Isolation of high molecular weight DNA from soil for cloning into BAC vectors. *FEMS Microbiology Letters* 223:15-20.
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Bravo, F. (1995). Del vino y otros temas. Ed. Eypasa, Madrid.
- Colunga, P., García, M., Zizumbo V.D. (2007). Tequila and other agave spirits from west-central Mexico: current germplasm diversity, conservation and origin. *Biodiversity Conservation* 16:1653–1667.
- Castañé, F. X., De la Presa, O. C., Izquierdo, L., Mateu, R. (2002). Aplicaciones industriales y control de calidad. Ponencias (CS2002). Escuela Universitaria de Ingeniería Industrial de Terrassa. 1-13.
- Davies, D.H. (1976). Carotenoids. Chemistry and Biochemistry of Algal Pigments (TW Goodwin, eds.) Vol 2. Academic Press, New York. pp: 38-165.
- De León-Rodríguez, A., González-Hernández, L., Barba de la Rosa, A.P., Escalante - Minakata, P., López, M.G. (2006). Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave salmiana*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54:1337-41

- De León, R., Escalante, M.P., Barba, R.A.P., Blaschek, H. P. (2008). Optimization of fermentation conditions for the production of the mezcal from *Agave salmiana* using response surface methodology. *Chemical Engineering and Processing*. 47:76-82
- Dean, W. (1974). Determination of carbonate and Organic Matter in calcareous sediments and sedimentary rocks by loss on ignition: Comparison with other methods. *Sedimentary Petrology*. 44:242-248
- Díaz, R.G., Guyot, J.P., Ruiz, T.F., Morlon, G.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(08):4367-4374
- Dunn, O.J. (1961). Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics* 6: 241-252.
- Durán, G.H.M., González G.E.J., Matadamas O.P. (2007). Mechanization Process in the production of mezcal. *Journal of Food Agriculture and Environment* 5:32-35
- Escalante, M. P., Blaschek, H.P., Barba, D. A., Santos, L., De León R. A. (2008) Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of *Agave salmiana*. *Letters in Applied Microbiology* 46: 626-630
- Escalante, A., Rodríguez, M. E., Martínez, A., López, M. A., Bolívar, F., Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters* 235:273-279
- Fleet, G.H., Lafon, L.S., Ribereau, G.P. (1984). Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux Wines. *Applied and Environmental Microbiology* 48:1034-1038.
- Fleet, G.H. (2003). Yeast interactions and wine flavor. *International Journal of Food Microbiology* 86, 11-22.
- Flores, B.E.P., Alba, G.J.F., Arrizon, J.P., Romano, P., Capece, A., Gschaedler M.A. (2005). The uses of AFLP for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity between yeasts isolated from Mexican agave-distilled beverages and from grape musts. *Letters in Applied Microbiology*. 41: 147-152.

- Frostegård, A., Courtois, S., Ramišse, V., Clerc, S., Bernillon, D., Gall, F., Jeannin, P., Nesme, X., Pascal, S. (1999). Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Applied and Environmental Microbiology* 65:5409-5420
- Granados S. D., Los agaves en México. Universidad Autónoma de Chapingo, México, 1993.
- Gupta V., Garg R. (2009). Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 27: 202-209
- Handelsman, J., Liles, M., Mann, D., Riesenfeld, C., Goodman, R.M. (2002). Cloning the metagenome: culture-independent access to the diversity and functions of the uncultivated microbial world. *Methods in Microbiology - Functional Microbial Genomics*. Academic Press pp.241-255
- Hill, G.T., Mitkowski, N.A., Wolfel, A., Emele, L.R., Jurkonie, D.D., Ficke, A., Maldonado, R.S., Lynch, S.T., Nelson, E.B. (2000). Methods for assessing the composition of soil Microbial Communities. *Applied soil ecology* 15:25-36
- Hurt, R., Qiu, X., Wu, L., Roh, Y., Palumbo, A., Tiedje, J., Zhou, J. (2001). Simultaneous Recovery of RNA and DNA from Soils and Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 67:4595-4503
- Jacques, H.C., López, H.A.I., Anaya, G.C.L., Sifuentes, R.A.M., Taillandier, P., Ramón, P. F. (2006). Identificación (ID) de Levaduras Aisladas de Mostos de Mezcal: ID Morfológica-Bioquímica (M-B) vs Molecular (Mol). En: Chanona, J., Ordorica, C., Mulet, A., Alamilla, L., Sosa, M.E., Parada, E., Welti, J., Gutiérrez, G. Editores. "Hacia una visión integrada de la ingeniería de alimentos" Libro de artículos en extenso del V Congreso Ibero-Americano de Ingeniería de Alimentos; Sep. 4-7
- Jacques, H.C., Herrera, P.O., De León, R.J.A. (2004). El maguey mezcalero y la agroindustria del mezcal en Tamaulipas. IV Simposium Internacional sobre *Agavaceae* y *Nolinaceae*, AMC-CICY-CONAGAVE-UNAM-Tequila Herradura, Mérida, Yuc., 3-5 de Marzo.
- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade S., Ribéreau-Gayon P. (1984). Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Applied Environmental Microbiology* 48: 153-156
- Koo, K., Foegedin, P., Swaisgood, H. (1998). Isolation of RNA and DNA fragments using diatomaceous earth. *Biotechnology Techniques*, 12:549-552
- Küsel, K., Pinkart, H.C, Drake, H.L, Devereux, R. (1999). Acetogenetic and sulfate-reducing bacteria inhabiting the rizoplane and deep cortex of sea grass *Halodule wrightii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:5117-5123

- Lachenmeier, D.W., Sohnius, E.M., Attig, R., López, M.G. (2006). Quantification of selected constituents and anions in mexican agave spirits (tequila, mezcal, sotol, bacanora). *Journal and Agricultural and Food Chemistry* 54: 3911-3915
- Lessa EP, Applebaum G (1993) Screening techniques for detecting allelic variation in DNA-sequences. *Molecular Ecology* 2:119–129
- López, M.G., Dufour, J.P. (2001). Tequilas: Charm Analysis of Blanco, Reposado and Añejo tequilas. ACS Symposium Series 2001. 782:63-72
- Lovell, C., Piceno, Y., Quattro, J., Bagwell, C. (2000). Molecular Analysis of Diazotroph diversity in the rhizosphere of the smooth cordgrass, spartina alterniflora. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:3814-3822.
- Lowry, O.H., Farr, A.L., Randall, R.J. (1955) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biology Chemistry* 193:265–275
- Manzano, M., Cocolin, L., Longo, B., Comi, G. (2004). PCR–DGGE differentiation of strains of *Saccharomyces sensu strict*. *Antonie van Leeuwenhoek* 85:23–27
- Mesas, J.M., Alegre, M.T. (1999). El Papel de los microorganismos en la elaboración del vino. *Ciencia y Tecnología de alimentos*. 2:174-183
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31:426-428
- Muyzer, G., De Wall, E., Uterlinden, A. (1992). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:695-700
- Narváez-Zapata J.A., Rojas-Herrera R.A., Rodríguez-Luna I.C. and Larralde-Corona C.P. (2009) Metagenomic analysis of lactic acid bacteria associated to mezcal fermentation. Sometido. *Current Microbiology*.
- Narváez, Z.J.A., Rodríguez, A.N., Ortega M.B.O. (2005). Method for recovery of intact DNA for community analysis of marine intertidal microbial biofilms. *Molecular Biotechnology*. 30:51-55
- Narváez, Z.J.A., Tebbe, C.C., Ortega, M.B.O. (2005). Molecular diversity and biomass of epilithic biofilms from intertidal rocky shores in the Gulf of Mexico. *Biofilms* 4:1-12.
- Navarre, C. (1994). *Loenologie*. 4ª ed. Ed. Lavoisier Tec. & Doc., París.

- NOM 1994. Bebidas Alcohólicas – Mezcal (NOM-070-SCFI-1994). Norma oficial Mexicana para la denominación de origen del Mezcal.
- Diario Oficial de la Federación, México (28 de Noviembre).
- Pasteris S.E., Strasser A.M. (2009). Sugar–glycerol cofermentations by *Lactobacillus hilgardii* Isolated from Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 3853–3858
- Pérez, P.R. Nabil, B. O., Hikmate, A., Lucas, L.R., Martínez, C. M., Gálvez A. (2005). Microbiological study of lactic acid fermentation of caper berries by molecular and culture-dependent methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:7872–7879
- Peters S, Koschinsky S, Schwieger F, Tebbe CC (2000) Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Applied Environmental Microbiology* 66:930–936
- Peynaud, E. (1989). Enología práctica. Conocimiento y elaboración del vino. 3ª ed. Ed. Mundi Prensa, Madrid.
- Prakitchaiwattana, C.J., Fleet, G.H., Heard, G.M. (2004). Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast research*. 4:865-877
- Ramales, O.M.C., Barragán, R.M.L. (2002). La industria del mezcal y la economía oaxaqueña. *Observatorio de la Economía Latinoamericana*. <http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/mx/>
- Rojas, H.R, Narvaez, Z.J, Zamudio, M.M, Mena, M.M.E. (2008). A simple silica-based method for metagenomic DNA extraction from soil and sediments. *Molecular Biotechnology* 40:13-17
- Sambrook, J., Rusell, D. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. 3era ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sánchez, M.A., Hope, P.H. (1953). Fermentation and chemical composition studies of same species. *Agriculture Food Chemistry*. 246:1-8.
- Schmalenberger, A., Schwieger, F., Tebbe, C. (2001). Effect of oligonucleotidos hibridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community and genetic profiling. *Applied and Environmental Microbiology* 67:3557-3563

- Schwieger, F., Tebbe, C. (1998). A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:4870-4876
- Sorensen, T. 1948. A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content. *Biological Microbiology*. 63:1489–1497. Skr. 4:1.
- Stach JE, Bathe S, Clapp JP, Burns RG (2001) PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiol Ecology* 36:139–151
- Sul SY, Kim HJ, Kim TW, Kim HY. Rapid identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in probiotic products using multiplex PCR. *Microbiology Biotechnology* 17: 490-495
- Solieri, L., Giudici, P. (2007). Yeast associated to traditional balsamic vinegar: ecological and technological features. *International Journal of Food Microbiology*. 125:36-45
- Sorensen, K., Canfield, D., Teske, A. and Oren, A. (2005). Community composition of a hypersaline endoevaporitic microbial mat. *Appl Environ Microbiol* 71, 7352–7365.
- Strom, K., Sjogren, J., Broberg, A., Schnurer, J. (2002). *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides Cyclo(L-Phe-L-Pro) and Cyclo(L-Phetrans- 4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Applied Environmental Microbiology* 68:4322–4327
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Tebbe, C.C., Vahjen, W. (1993). Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Applied and Environmental Microbiology* 59:2657–2665
- Tebbe CC, Schmalenberger A, Peters S, Schwieger F (2001) Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for microbial community analysis. In: *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications* (ed. Rochelle P), pp. 161–175. Horizon Scientific Press, Wymondham, United Kingdom.
- Vanechoutte M (1996) DNA fingerprinting techniques for microorganisms: a proposal for classification and nomenclature. *Molecular Biotechnol* 6:115–142
- Walker, J., Rapley, R. (2000). *Molecular Biology and Biotechnology*. 4a. Ed. Royal Society of Chemistry, UK.

- Watanabe, K., Fujimoto, J., Tomii, Y., Sasamoto, M., Makino, H., Kudo, Y., Okada, S. (2009). *Lactobacillus kisonensis* sp. nov., *Lactobacillus otakiensis* sp. nov., *Lactobacillus rapi* sp. nov. and *Lactobacillus sunkii* sp. nov., heterofermentative species isolated from sunki, a traditional Japanese pickle. *International Union of Microbiological Societies* 1: 156-8502
- Weidner, S., Arnold, W., Pühler, A. (1995). Diversity of cultured microorganism associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology* 62:766-771
- Xia, X., Xie, Z. (2001). DAMBE: Software package for data analysis in molecular biology and evolution the journal of heredity. 92:371-373
- Zambonelli, C. (1988). *Microbiologia e biotecnologia dei vini*. Ed. Edagricole, Bologna.
- Zar, J. (1996). *Biostatistical analysis*. Tercera edición. Prentice Hall, New Jersey, 918 pp.

13. APENDICE

Apendice 1. Protocolos

Protocolo de Ligación en M13®- Vector (PROMEGA)

1. Centrifugar el tubo con el vector M13®
2. Usar la fórmula para estimar la cantidad de producto de PCR necesario para ligar con 50ng de vector, en una proporción 1:8.
3. ng del vector x tamaño en Kb del inserto
4. cantidad del inserto: proporción molar del vector
5. Tamaño en Kb del vector
6. Fijar a 5µl la reacción de ligación como se indica en la Cuadro

Reactivos y concentraciones para realizar la ligación

Reacción	1X µl
Amortiguador T4	2.0
ligasa 2X	
Vector (50ng)	0.5
Producto de PCR	2.0
T4 ADN ligasa	0.5
Volumen final	5.0

1. Mezclar la reacción por pipeteo. Incubar a temperatura ambiente por 1 h.
2. Posteriormente incubar la reacción a 4° C toda la noche.

Nota. Si no se utiliza en el momento la reacción de ligación para hacer la transformación, se debe almacenar a -20°C, hasta su uso.

Transformación en el vector M13®

1. Centrifugar el tubo de la reacción de ligación para bajar todo el líquido al fondo y mantenerlo en hielo.
2. Descongelar sobre hielo un tubo de 200µl de células competentes por cada ligación/transformación.
3. Tomar con una pipeta 2µl de cada reacción de ligación y colocar en un tubo de 1.5ml.
4. A cada uno de los tubos del paso 3 agregar 50µl de células competentes.
5. Mezclar suavemente los tubos, posteriormente incubar la reacción en hielo por 20 min.
6. Dar un choque térmico a 42° C de 45-50 segundos. No mezclar ni agitar, al pasar el tiempo del choque térmico, colocar inmediatamente en hielo por 2 min.
7. Adicionar 950µl de medio LB (a temperatura ambiente) a cada tubo.
8. Incubar los tubos a 37° C por una hora a 300rpm.
9. Concentrar las células en el fondo del tubo, centrifugar por 30 seg. Eliminar el sobrenadante dejando solamente 200µl.
10. Para cada reacción de ligación, preparar dos cajas de agar-LB con ampicilina/IPTG/X –Gal (100µg/ml, 100 mM y 20 µl a 50mg /ml respectivamente). Permitir que se absorban por 30min a temperatura ambiente previo a su uso.
11. Marcar las placas de agar LB. Tomar 100µl de cada tubo de transformación y sembrar.
12. Asegurarse que el líquido se haya absorbido, posteriormente colocar las placas invertidas a 37° C, al menos por 18 horas, finalmente, las placas se pueden colocar a 4°C para favorecer el desarrollo del color.

PCR de Tamizaje

Reactivos	1X
Amortiguador	2.5
MgCl ₂	0.75
PF	1.0
PR	1.0
dNTP's	0.2
Taq ADN polimerasa	0.2
H ₂ O	14.35

Tratamiento de Tamizaje

1. Añadir 20µl de agua mili Q estéril a un tubo de PCR
2. Obtener una clona por tubo
3. Tomar 15µl de cada clona y vaciarlo a otro tubo limpio
4. Agregar 100µl de LB a un tubo de ensayo limpio
5. Los tubos de PCR son pasados a lisar en el Termociclador en el programa de lisis por 15min
6. Pasando los 15 min los tubos de PCR son llevados a hielo.
7. Agregar 10 µl del mix de reacción dar un pin y llevar al Termociclador al programa específico para cada cebador.
8. Elaboración del gel de agarosa al .8% para su corrimiento en electroforesis a 110 V por 1 hora aproximadamente.

Extracción de ADN Plasmídico

Minipreparación de ADN plasmídico (Sambrook, *et al.*, 1989).

1. Colocar en un tubo eppendorf 1ml de cultivo de células bacterianas (de E. coli, las cuales tiene el plásmido de interés).
2. Centrifugar a 12000 rpm, por espacio de 10 segundos (1 pin), descartar el sobrenadante.

3. Adicionar 100µl de solución 1, mezclar en el vortex hasta resuspender la pastilla.
4. Adicionar 200µl de solución II, mezclando suavemente por inversión, enseguida se incubaba el tubo en hielo por 10 minutos, hasta observar un lisado claro.
5. Adicionar 150 µl de solución III, mezclar suavemente, observando un precipitado blanco.
6. Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos, recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo (cuantificarlo aprox. 500 µl).
7. Agregar 1µl de RNAsa e incubar por 15 minutos a 37°C.
8. Adicionar 1 V de solución de cloroformo / octanol (24:1, aproximadamente 500 µl).
9. Mezclar en el vortex por 30 segundos y centrifugar a 12000 rpm / 5 minutos.
10. Tomar la fase acuosa y pasar a un tubo eppendorf nuevo (aproximadamente 500 µl).
11. Agregar 2V de etanol al 100% (1ml) e incubar 1 hora a -20°C.
12. Centrifugar a 12000 rpm / 10 minutos, eliminar el sobrenadante y lavar la pastilla con 500 µl de etanol al 70%.
13. Secar y resuspender la apstilla en 25 ml de TE 1X (500 rpm / 37°C en el termomixer).
14. Correr electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%.

Secuenciación

Sequi Therm EXCEL TM II ADN Sequencing Kit-LC. Epicentro Biotechnologies.

Programa del termociclador para la secuenciación

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1° Ciclo	92°C	2min
	92°C	30seg
30ciclos	58°C	30seg
	70°C	30seg
1Ciclo	72°C	7min
1Ciclo	4°C	∞

En un tubo de 0.2 ml preparar la mezcla de reacción agregando los componentes a las concentraciones que indica el siguiente cuadro.

Reactivos y concentraciones de la reacción de secuenciación.

Reactivo	µl
ADN templado	2.4
Cebador etiquetado IRD 700 (1.0pml/ml)	1.0
Cebador etiquetado IRD 800 (1.0pml/ml)	1.0
Amortiguador de secuenciación	3.6
ADN polimerasa II EXCEL	0.5
Volumen final	8.5µl

1. Etiquetar un grupo de 4 tubos de 0.2 ml para cada una de las combinaciones primer/templado como A, T, G, C.
2. Agregar 1.0µl de la mezcla de terminación A al tubo A, la mezcla de terminación T al tubo T, etc.
3. Agregar 1.6µl de la mezcla de reacción a cada uno de los tubos A, T, C y G, mezclar suavemente.
4. Someter las muestras al programa de secuenciación y al finalizar agregar 2µl de solución stop a cada tubo.
5. Las muestras se corren en un gel de acrilamida de 61cm.

Apendice 2. Matrices de ausencia presencia

Matriz binaria obtenida de gel de SSCP de acrilamida elaborado en base a los oligonucleotidos COM1 y COM2

Activa I			Activa II		
MSCHI	MELZI	MFREI	MSCHII	MELZII	MFREII
0	0	1	0	1	0
1	1	1	1	1	0
1	0	0	0	0	0
0	1	0	1	0	0
0	0	1	0	1	1
0	1	1	0	0	1
1	0	1	0	0	1
0	1	0	1	1	0
1	1	0	1	0	0
1	0	0	1	0	1
0	0	1	0	1	0
0	0	0	1	0	0
0	0	0	1	0	1
1	0	1	0	1	0
0	0	1	0	1	0
0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1
0	0	1	0	1	0
1	1	0	1	1	1
0	0	1	0	1	0

Matriz binaria obtenida de gel de SSCP de acrilamida elaborado en base a los oligonucleotidos 341F y 907R.

Activa I			Activa II		
MSCHI	MELZI	MFREI	MSCHII	MELZII	MFREII
0	0	0	0	1	0
1	1	1	1	1	1
1	1	0	1	1	0
1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	0
1	0	1	1	0	1
0	1	0	0	1	0
0	0	0	0	1	1
0	1	1	0	1	1
1	0	1	0	1	0
0	0	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0

Matriz binaria obtenida de gel de SSCP de acrilamida elaborado en base a los oligonucleotidos LbF y LbR.

Activa I			Activa II		
MSCHI	MELZI	MFREI	MSCHII	MELZII	MFREII
0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	1
0	0	1	1	1	1
0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1
0	0	1	0	1	0
0	0	0	1	1	1
0	0	0	0	0	1
0	1	1	1	0	1
0	1	1	1	0	1
0	0	0	0	1	1
0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	1

Matriz binaria obtenida de gel de SSCP de acrilamida elaborado en base a los oligonucleotidos 16S F Y 16S R

	Activa I			ActivaII		
	MSCHI	MELZI	MFREI	MSCHII	MELZII	MFREII
1	0	0		1	0	0
0	1	1		0	1	1
0	0	0		1	0	0
1	1	1		1	1	1
0	1	1		0	1	1
1	0	0		1	0	0
1	0	0		1	0	0
1	0	0		1	0	0
1	0	1		1	0	1
0	0	1		0	1	0
0	1	1		0	1	0
0	1	1		0	1	1
0	1	1		0	1	1
0	1	0		0	0	1
0	1	0		0	0	1
1	0	0		1	0	0
0	1	1		0	1	1

Apendice 3. Resultados del analisis de preferencia de consumo

Calificaciones promediadas para cada variable donde los consumidores evaluaron el mezcal de preferencia para su consumo.

Preferencias en general de los consumidores

Características	SCH	EL	F
Fort. Alcoh.	7.36111111	5.06944444	6.18055556
Color	7.56944444	5.06944444	6.18055556
Olor	7.15277778	5.41666667	5.27777778
Acidez	7.36111111	7.01388889	7.34722222
Sabor	8.05555556	7.5	7.63888889

Consumidores que prefirieron el mezcal de Sierra Chiquita

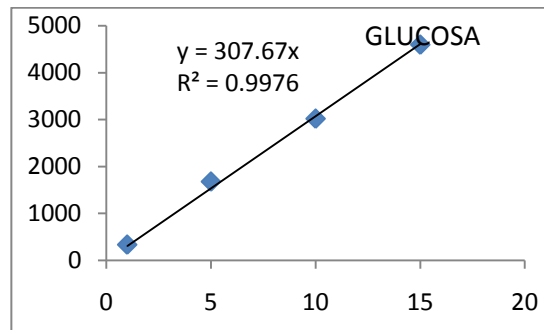
Características	SCH	EL	F
Fort. Alcoh.	7.73809524	4.4047619	4.4047619
Color	7.97619048	7.02380952	7.38095238
Olor	7.73809524	6.30952381	6.4047619
Acidez	7.61904762	4.64285714	5.35714286
Sabor	7.85714286	4.4047619	4.76190476

Consumidores que prefirieron el mezcal de Los Fresnos

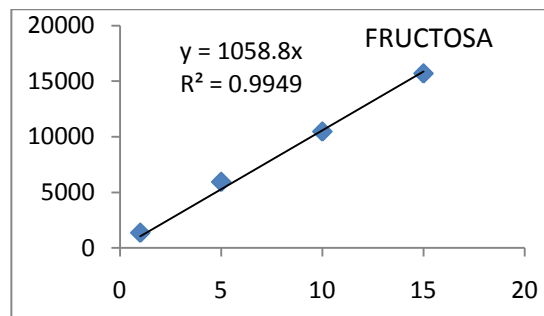
Características	SCH	EL	F
Fort. Alcoh.	5.83333333	9.16666667	5
Color	8.33333333	8.75	8.33333333
Olor	7.91666667	9.58333333	8.75
Acidez	7.5	8.33333333	6.66666667
Sabor	7.5	8.75	7.5

Apéndice 4. Curvas de calibración para análisis físicoquímico.

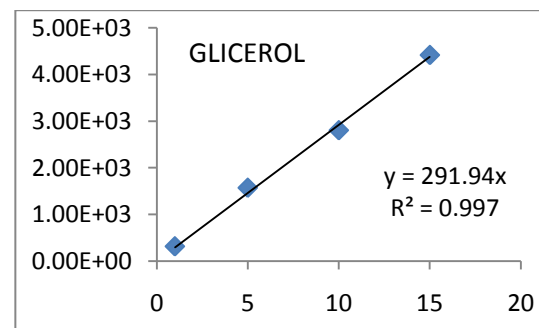
Curvas de calibración para HPLC5



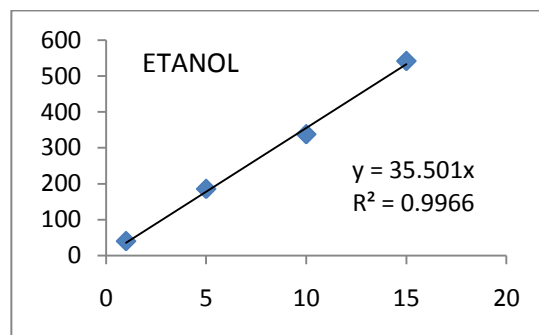
Tiempo de retención 9.68 min



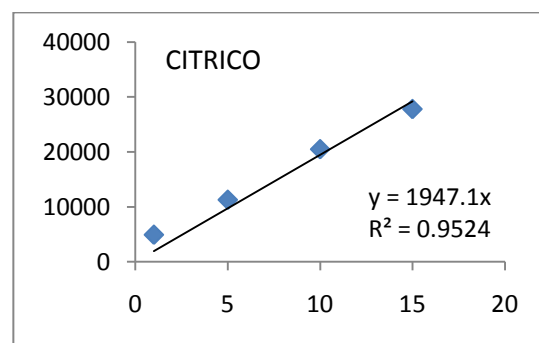
Tiempo de retención 10.58 min



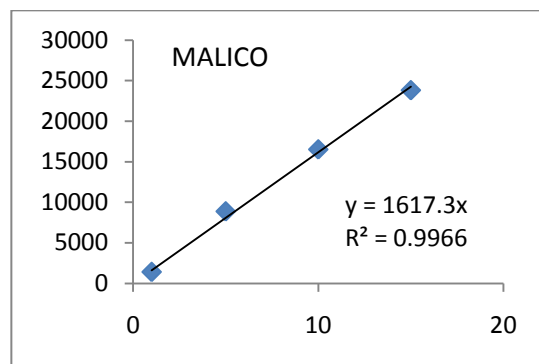
Tiempo de retención 14.7 min



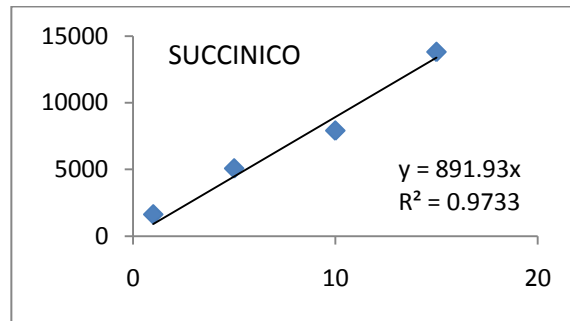
Tiempo de retención 24 min



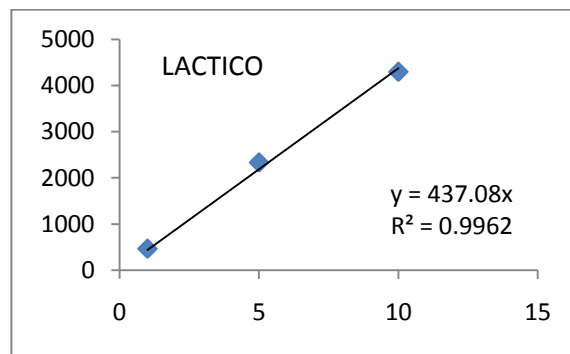
Tiempo de retención 9.232 min



Tiempo de retención 11.021min

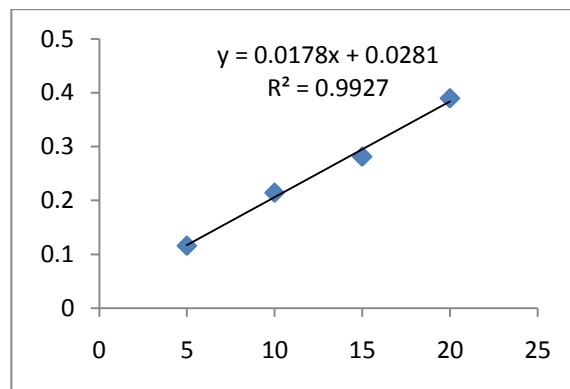


Tiempo de retención 13.281



Tiempo de retención 14.382

Curva de calibración de Proteínas



Apéndice 6. Secuencias en fasta

>1.COM.MELZ

TTCCGGATGATGAGACGTAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTACCACCCAAAAGTG
CATTGAAACAGGGAGACTTGAGTGCGAAAGAGGAGGGTGACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGAAGA
ACACCAGTGGCGAAGGCGCCCTATCGTGAAATAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATT
AAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGTTGAAACTCAAAGGAATTGCGGGCGCCCGCACAGCGTGAGCATGTGGT
TTAATC

>2.COM.MSCH

GATTGGGCGTAGCGAGCGCAGCGCGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTGGGCAATGAGAGCTGCATGGAACGGGAGACTA
GAGTGCAGAAGAGGACAGTGAACCTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGAAAAGAACACCGGTGGCGAAGG
GCGGGCTGTCTCGGTCTCTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGGTATGCCAAACAGGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGATGTTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTCTGCAGCTAACGCGATTAAGCACCT
CCGCCCTGGGGGAGTACGGACCGCAAGGTTTGAAGTCAAAGGAATTGACGGG

>3.COM.MELZ

ATTAACGAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGGATAGTGCATTTGAAACT
GGAAGACTTGAGTGCAGGAAAAGGGCAGTGAACCTCATGTTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGGAAGAACACCA
GTGGCGAAAGCGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGTATAGCAAAACAGGGATTAGAATCC
CCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAAGTGTAGGGTGTGGGGTGGGGTTTTCCGCCCTTCAGGGCCGAAGCTAACG
CATTAAAGCCCCCCCCCTGGGGGACGGACCGCAAGGTGGAAGTCAAAGGAATTGAGGGG

>4.COM.MSCH

GCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCG
AGGAAGTGCATCGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAACCTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
TATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTATAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCCGAGCTA
ACGCATTAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGT
GGAGCATGTGGTTAATTCGTTTTGGGG

>5.COM.MFRE

TCCGGTATTGGGCGTAAGCGACGCAGCGGTTTTTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGTTAACCGAGGAGTGCATCGGAA
ACCGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGAACCTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACC
AGTGGCGAAGGCGGCTGCCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG
TAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCC
GCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACG

>6.COM.MELZ

GAAAATATTGGGCGTAAGCGCGCTAGGCGGTTTTTTTCAGTCAGATGTGAATCCTCGGGCTTAACCTAGGAGCTGCATTT
GATACTGGTTGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACA
CCGGTGGCGAAGGCGGTAACAAGGCTCGATACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
TGGTAGTCCACGCTGTAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGGGCTTCGCCCTCCAGGGCCGCACCTACGGCATAAAGCATT
CCCCTTGGGAAGTCCGACCGCAAGGTTGACACTCAAAGGAATTGAGG

>7.COM.MFRE

TTTTCGGATTGGGCGTAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATC
GGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGAACCTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTACTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGC
ATTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG

>8.COM.MELZ

GACACTGGGCGTAAGGGCGCGTAGGCCGGCCGATTAAGTCGGGGGTGAAGCCTGTGGTTAAACACAGAATTGCCTTCGAT
ACTGGTTGGCTTGAGACCTGAAGAGGACAGCGAACTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGAAGAACACCA
GTGGCGAAGGCCGCTGTCTGGTCCGGTCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGCCGTTGGCCTGCTTGCAGGTCATGGCCCCCTAACGCATTTAGCATTCCGCCT
GGGGAGTACGGTCCCCAGATTAACCAAGGAATTGAGGG

>9.COM.MSCH

TTCGATACTGGGCGTAAGCGAGCGCAGGCCGGTTCCTTAGTCTGATGTGAAGCCCCGGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTG
GATACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATACGGAGGAAC
ACCAGTGGCGAAGGCCGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCAAACGCATTAAGCA
CTCCGCTGGGGAGTAGGACCG

>10.COM.MFRE

TCGGTTTTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCGGTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTTACCCGGGGAGGGTCATT
GGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAA
CACCAGTGGCGAAGGCCGACTCTCTGGTCTATAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCA
CTCCCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGGCG

>11.COM.MELZ

TTTTTCGATATGGCGTAAGCGAGCGCAGGCCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATC
GGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAA
CACCAGTGGCGAAGGCCGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCA
CTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGAGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTG

>12.COM.MFRE.MSCH

CGGATTTGGGCGTAAGCGAGCGCAGGCCGGTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTTAAAGGGGAGGGTCATTGG
AAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGGGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAAACA
CCAGTGGCGAAGGCCGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGGGCTGCAGCAAACGTATTAAGCTC
TCCCTCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTG

>13.COM.MFRE

TCCCCGCCCTCGTACGTACTGGGCGTAAGGGCGCGCTCGGCCGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTGTGCTTAACAAAGG
ATAGGGTCTTTGATACTGGGAGACTGAGTGTGAAAGGGGGGTAGAATTGCGTGTGTAGCGGTGAAATTCGTAGATATT
CGGAAGAACACCAGTCCGAAGCGCGCAAATGGTAAGTAATGAGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGTGAGCAAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGAATGCTAGCTGTTGGAGTGTGCCCCCTCAGTGGTGCAGCTAACGCTT

>14.COM.MELZ

CGTAAAGCGAGCGCAGCCGGTTCCTTAAGTCTGATGTGAAGCCCCGCCTAAACGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGA
CTTGAGTGCAGAAAAAGGGGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAAACACCAGTGGCGAA
GGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGTGCTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCAAACGCTTAAAGCACTCCGCTGGGGA
GTACGACCGCGATGTAGAAACTCAAAGGAATTGACGG

>15.COM.MFRE

TTCAAACGTTATTTGGGATTATTGGGCGTAGCGGAGAGCGGAGGCCGGTTCCTAGTCTGTGTGAAGCCTTGGGCTTAAAGG
GGAGTCTTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAAGAGAGGAGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATACG
GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCCGCCGAAAGGACTGGAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGTCCAGCTAACGC
ATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGCCCGAGATTTGACTCTAAGAAAATTGACGGGG

>16.COM.MSCH.MELZ

AAGCGTTGTCCGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAAACGA
AGAAGTGCATCGGAAACTGGGAACTTGAGTGAGAAAGAGGCCAGTGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA
TATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCCTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAA
CGCATTAAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG

>17.COM.MSCH.MFRE

GACGTTGGGAGCGTTAAGAACAAGAAGGGGAAGTGAATTCCTTGTGAGGCGGTGAAATGCCTAGATATTGGGAAGAA
CACCGGTGGCGAAGGCGGCGACTGGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGGAAAAACCGGGATTAGA
TACCTGGGAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTA
AGCACTCCCCCTGGGGAGTGAAGTCCCCCCAAGGTTTGAACCCCTCAAAGGAATTTGGCCGGG

>18.COM.MELZ

TGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAAACGAAGAAGTGCATCGGAAACTG
GGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAAGTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTG
GCGAAGGCGGCTCTCCGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCATGCCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCT
GGGGAGTACGGCCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG

>19.COM.MSCH

CGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGTAACTGGAAA
CTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGAAGTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAG
GCGGCTGTCTGGTCTTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATAC
CGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAG
TACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG

>20.COM.MFRE

TGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGGGTGAGCCGATCTGCATCGAACGGCAGA
CTAGAGGGAAGGGCATTGCAATCCATGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGAATATATGGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGT
CGGCTAGTTCAGGGTTGAGTTAACTGACGCTGAAGGCGCGAAAGGATGGGGGTAGCAAAAACAGGAATTAGAATACCC
TTGGGTAGTCCCAATGCCGGAACCGGATGAATTCATTCTAAGATGGTTGGGGGGATTTAGGCCCTTTCAGGGTTCGGCG
GTTTACGCGGTTAAGGCACACCCCCCGTGGGGAGGTACGGGCCCGCAAGGTTTGAACCTCAAAGGAAATGGACGGG

>21.COM.MELZ

TATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAGGTTTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAAACCGGAGAAGTGCATCGGAA
ACCGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGAAGTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAAATATATGGAAGGAACAC
CAGTGGGGAAGGCGGGCTGTCTGGTCTTCCGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTATTAGCGAACAGGAATTA
GATACCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGG
ATTAAGCACCTCCGCCCTGGGGAGTACGGACCGCAAGGTTTGAACCTCAAAGGAAATTTGACGGG

>22.COM.MELZ

GCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCCAGTCAAGTCTGTTGTCAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTGAGCAATGGAACTGAT
TGGCTTGAGTGCTCGAAAAGGGCCCTGGGAAATCCATGTTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCCGTT
GTTAAAGGTTCTTAAAAAGGAAATTAATTGGACGCTGACGCTCCAAAAGTTATGGGKTAGCTAAACAGGATTTATAAT
CCCCCTGTAGTTCACGTCCCCTAAAACGGATGAAGTGTGGGGGGTTGGGCGGGTACTCGCCCTTTTAGGGCCGAA
GCTAACCGATTAACGCCCCCCCCCCCTGGGGGTCGGTCCGCATGGTGAATCCGAATGGATTGGAAGG

>23.COM.MFRE.MSCH

TTGGACTCTATAGGGCGATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGCCGCCATGGCGGCCCGGGAAACGATTCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAGGCTGATGTG
AAAGCCTTCGGCTTAAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACCGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGATAGTGAAGTCCATGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCG
AAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCC

GCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGAC
GGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGT
ATTCTATAGTGCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGGTT

>1K.MELZ

CTGCCTTTTSTCTGACGCAATAAGCTGATCACCTCGCGGATGAGACGGCTTAGGGTCAAAAGTCTTTGGAGGGCAGAAAA
ATGACGGAAGAAGGAGAGCCCCGCTCAACACCGACTTACGCCGGTAATACGAAAGGAGCTAGCTGTGCTCCCAATCACT
GGGCGTAAAGGGCSCGTAGGAAGCCGAGGTAAGTCGGGGGTGAAAGCCTGTGGCTCAACCACAGAATTGCCTTCGATACT
GGTTGGCTTGAGACCGGAAGAGGACAGCGGAACTGCGAGTGAAGAGGTGAAATTCGTTTCATATTCGGAAGAACCAGT
GGCGAAGGCTGCTGTCTGGCCCGTTCTGACGCTGATGTCCGAAATGTAAGTACCAACAGGATCAGAAACCCTGGTAG
TCCACGGGATTAACATGAATGCCGGCCGTTGCCCTGCTTGTGGTACTAGGCGCCGCTAACGCATTACCTTTCCGCCTGG
GGAGAAGGGTTAAAAATCAAACCTCAAAAAGAAATTGACGGGAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG

>2K.MFRE

ATACGCTGATCAGCCTGCGCGTGAGTGACGATGCTCAGAAGTACCTCTGGCAGGACGAAAATGACGGTACGAAGAGAA
GCCCGCTCGGCTCCTTACGCCACGGTAATACGACAGGAGCTAGCTGTGCTCCACTAACTGGGCTGAAGGGGGCGGTAGG
AGGGCGCATAAGGGGGAGGTGAAAGCCTGTAGGTCATCCACAGAATTGCCTTCTATACTGCCAGGCTTGAGACCGGGAGA
GGAGCCAGAACTGCTAGTGTAGAGGAGAAATTCGTAGATATCCCAAGAACCATGGGCGAAGGCGGGATCTGCCCC
GCTCTGACGCTGATCTCTGAAAGCGTGGTGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTTAGATTTGGATGC
CGACCGTTGGCCTGCTTGGCTTGAGTGGCGCAGCTAACGCATTACGCATTCCGCCTGGGGAAATACGGTCCGAAGATTA
AACTCAAAGGAATTGACGGGGCTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG

>3K.MSCH

ACGGCCAGACTCCCGCTCAGAGAACGCTTGAGCAGCCCTGCCGTGATGCCGGAGGATTTAGGGTTGTAAACTCCTTTT
GGAGGGGGCTACAATGACGGTATCTAACGAAAAAGCCCCGAGCAGAGCGGGCCATCAGCCCGGTACACGAAAGGAGC
TAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCGGAAGGGGCGGTATACGGCTTGGCAAGTCGGGGGTGAAAGCCTGTGGCACAACCA
CGGAATTGCCTTCGATACTGGCAGGCTTGAGACCGGGAGAGGACAGCGGAACTGCGAGTGTAGAGGAGAAATTCGTTGAT
TGTGGAAGAACAATAAGGGCGAAGGCTGGAGGAACGCCGGTTCTGACGCTGATGTCCGAAAGCGTGGGGACAATCAG
GATTAACAAACCCTGGTAGTCCACGTGATAAATATTGTTTGACGCCCTCCCTGCTGTTGGTGTGAGGCTGGAAACGCA
TTAACCTCCGCTGGGGAAACGGTTGAAAGATACGACTGGAAGGAATTGACGGAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
A

>4K.MELZ

TCCGACCAAACTCCTACGGGACACGAACTGACCAGCAATGCGCGTGAGTGAAGAGGGCTTTGGATTGTAAGCTCTTTTG
AAAAGAGATACAATGACGGTATCTAACGAAAAAGCCCCGAGAAAGGGCCTGCAAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCT
AGCGTTGCTCGGAATTAAGGGCGTAAAGGGAGCGCAGACGGTTCCCGTAAGTCTGAGGTGAAAGCCTGTGTCTCAACCA
CAGAATTGCCTTCGATACTGGGTGGCTTGAGACCGGGAGAGCACAGCGGAACTGCAGGAGTAGAGGAGAAATTCGTTTCAT
TGTCGAACGAACAAAAGGGGCGAAGGCTGGAGGAACGCCTGGTTCTGACGCTGATGTCCGAAATGGTACTGACACTGAG
GATAAAAACCTGGGAGTCCACGCCTTAAATATTTGTCCAGCCGTTGGCCTGCTTTGAGTCATCGGGCAGGTAACGCTTT
CCCATTCCGCTGGGGGAGAACGGTCAACAAGATGCAACTGGAGAGACCTGACGCGAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACG
GGTC

>5K.MFRE

TATGCGTCGCGTTGCGTCTGATCAGCCCTGCCGCGTGAGTGTAGGCTTAGGAATTGTAAAGTCTTTTGTCCGGGAGG
AAAAGGACGGTACCGAAAGAATAGCCCCGAGGGTCTCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCG
GAATCACTGGGCGTAAAGGGGCGGGAGGGGGGATTAAGTCGGGGGTGAAAGCCTGTGGCTCAACCACTGAATTGCCTTC
GATACTGGTTGGCTTGAGACCGGAAGAGGACAGCGGAACTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTTTCATATTCGCAAGAACA
CCATGGGCGAAGGCTGCTGTCTGGTCCGGTTCTGACGCTGATGTCTGAAAGCGTGSTGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCGATTAACATGAATGCCAGCCGTTCCCTGCTTTTATTTCTCGGCGCCGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCT
GGGGAGTACGGTCCGAGATTAACCTGGAAGAATTAACGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGA

>6K.MELZ

GATCGCTGATCAGCATGCGCGTGAGTGATGATTCTCAGGACGTCAGCTCTGTGAAGACATAATGACGGTACGAACGAAAA
AGCCCTGCGAAATCACCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTTCCGATTACTGGGCGTAAAGGGAGCG
GAGGGGGTGGGTAAGTCCGAGGTGAAAGCCTGTGGCTTAACCACAGAATTGCCTTCGATACTGGGTGGCTTGAGACCTG
AAGAGGACAGCGGAAGTCTGTCTGAGAGGTGAAATTCGTTTATTCGGAAGAACCACCATGGGCGATATATGGACCTGG
CCCGTACTGACGCTGATGTCTGGTCTGTGCTGAGGCTGAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCATTAATATGTATG
CTAACCGTTGGCTGCTTGGCGGTGCTCGGCGCCGGGACGCATTGACCGTTCCGCTGGGGAGTACGGTCCGCGGATCC
ACTGAAGTGGATTGACGGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG

>7K.MSCH

CGGCGGTTAAGCTGATCAGCACGCGCGTGAGTGAAAGTCTTTGGATTGTAAGCTCTTTGGGAAAGGGCTCCAATGACGG
TACCTAACGAAAAGACTGAGAAATAGTCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCTAGCGTTGTTCCGATTTTTATCGTA
AAGGGGCGGAGGACGGGCGGAAGTCCGAGGTGAAAGCCTGTGGCTCAACCACAGAATTGCCTTCGATACTGGGAGGCT
TGAGACCGGAGAGGACAGCGGAAGTGCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTTGATATTCGCAAGAACCACCATGGGCGAAGG
CTGGAGGAACGCTGTAACTGACGCTGATGTCTGAAATGTGTTGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTT
AGATATGAATGCTAACCGTTGGCTGCTTGGAGTGATCGGCTCTGGGCAAACGGTCGAGCAATCCAAGTGGAAAGAATTG
ACGGAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGA

>8K.MSCH.MELZ.MFRE

ACGGCCAACTCCTACGGAGCAGAATCTGATGGAGCACCCGCGTGATAAGAAGGCTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTG
GTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAAGTGTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCTGGATTTGTTGGGCGTAAAGCGAGGGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTG
ATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAATTTGAGTGCAGAAAGAGGACAGTGGAACTCC
ATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATACATGGAAGAACCAGTTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGA
GGCTCGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGTTCCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGATTGCTAGGTGGTGGAGG
TTTTCCCCCTTAGTGCCGCTGGGGAGTACGACCGGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGAGGGG

>9K.MFRE.MSCH

TGCACAATGGAGGCCAAGCCTGATGAGCAACCCGCGTGAGTGAAGAAAGTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTGTGCGGTGA
AGAATTGACGGTAACCAACCAGAAAAGCCCGTAAGTACGTGCCAGCAGCCCGTTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTTTCC
GGATTTATTGGGCGTAAAGGGAGCGCAGGCGCAATTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAACTGCAT
CGGAAACTGTCATTCTGAGTGCAGAAGAGGATTGTGGAATTCATGTGTAGAGGTGGAATGCGTAGATATAGGGAAGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGATGGGTAGCGACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCATGCCGTAAAGATGAGCGCTAGGTGTTGGGGACTTTCGCTGAGTGGCGCCAGCAAACGATTAAGCGCTCCGC
CTGGGAAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGAAGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGA

>1.LB.MELZ.MFRE

GGCGGCCGCGGAAAAACGATTCCGTCAATTCCTTAATTTCTGGGGGCGACCGTTATCCGGAATTAGTGTGCTTAATGCGTT
AACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAACCTTAGCACTCATCGTTACGGCGTGACTACCAGGGTATCTAATCCT
GTTTGTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTACAGTACAGACCAGAAAAGGCGACTTCGCCACTGGTGTCTCTCCATATCTCT
ACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCACCTTTCTCTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCTCTCCGGTTG
AGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAAACCACTGCGCGGCTTTACGCCAATAATTCAGATAACGCTTGCCACCT
ACGTATTACCGCGGCTGTGAATCACTAGTGAATTCGCGCGCCGCTGCAGTCCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTT
GGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAATTGT
T

>2.LB.MFRE.MSCH

TTCACATTTGACGGTATCCAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGGGCGGCCGCGGGAATTCGCGATTGTCCA
GCCGCGTAATACGTAGGTGCAAGCGTTGTCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGTTTTTTAGGTCTGAAAC
CCTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGGCATCGGAAACCGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCAT
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGCATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGTCTGTAAGTACGCTGAGGC
TCGAAAGTCCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTGGAGGG

TCCGCCCTTCAGTGCCGCATGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAGGGAAT
ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTAATTCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTGTACATCTTCTGC
CAACCTAAGAGCGTTCCTGGACAGATTGACGTGGTCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG

>3.LB.MELZ.MSCH

TTGACATTCTTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGGGCGGCCGCGGAATTCGATTCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAGGTCTGATGT
GAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACCAGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTC
GAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTC
CGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTAATTCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTGTACATCTTCTGCC
AACCTAAGAGCGTTCCTGGACAGAATGACGTGGTCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAGATGGGTT

>4.LB.MFRE

CTCTGTTCTATAGGGCGATTGGGCCCCGACGTGCGATGCTCCCGGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAGGTCTGATGTG
AAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACCAGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCG
AAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCC
GCCCTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGAC
GGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGT
ATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGACGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTAAGATGGGTTAATACCCCAAC

>5.LB.MFRE

AAGCGTTGTCCGATTTTATTGGGCGTAAAGGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGGTGAAAGCCCCGGCTCAACCG
GGGAGGTCATTGGAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT
ATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTCAGTGCTGCAGCAA
ACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTAAGACCGCAAGG

>6.LB.MELZ

AGCGTTGTCCGAATTTATTGGGCGTAAAGGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAACCCCGGCTCAACCGGGA
GGGTCATTGGAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAT
GGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTCAGTGCTGCAGCTAACGC
ATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCGAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGC
ATGTGG

>7.LB.MSCH

TTCACATTCTTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGGGCGGCCGCGGAATTCGATTCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT
GAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACCAGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTC
GAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTC
CGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCGTGTGTAATTCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTGTACATCTTCTGCC
AACCTAAGAGCGTTCCTGGACAGAATGACGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTAAGATGGGTTAAGTCCCGCAAC
GAGCGCAACCTTATTGTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG
GGGATGACGTCTCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCCGGAACCGC
GAGGTCAAGCT

>1.16S.MFRE.MSCH

GTTCTGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGCTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTAGCTAAC
CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAACTCGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAA
AGCGAGCGCAGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGCTCAACTGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGAGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGC
GGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGCTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTCAGTGCTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACC
GCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG

>2.16S.MELZ.MFRE

GCCGTCGGCTGTATCTGATCAGCACCCCGCTGAGTGAAGCAGGTCTTCGGCTCTGTAACTCTGTGGAAGGACAATAAT
GATGAGAGTATTTGAATAAGGACGGAATCCACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
GTGTCAAGCGTTGTCCGAGGGAGAGGACGAAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTCCATCTC
AACTGGAGAGGGGCATCGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGTAGC
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTCAGTGCTGC
AGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGA

>3.16S.MELZ

GATAGCTGATCAGCATGCGGTGAGTGCTATGCTCGGTGCAGTTAGGCACTAATGACGTAAGAGAAGAGAGGGCCACCCAG
CCGAAACGTGCCAGCCGTGGTCCGAATTAATGGGCCGTAAGGGCGGAGGGGCAATAAATCGGGGGAAAGGGTGTG
GGATAACCCAGAATCGCCTTCGATACTGGCTGGATTGGGACCGAAAGAGGACAGCGGAAGTCTGCGGTAGAGGAGAAA
TTCCTTCATGTCGCAAGAACCATTGGGTGAAGGGTGGATGAACGCCCGGGACTTAAGCTGATGGCTGAACTGTGGTGA
GGCTGAGGATTAGATACCCTGGGAGGCCACGGATTATAAATTTATGGCCCGCTCCCTGCGGTGAGTGCTTAGGCGCCG
CTAACGCATTAGCCGTTCTGCTGGGGAGTACGCATTTAAAGATTAATAACTGGGGAGGAATTGACGGAAGGTTGAAACT
CAAAGGAATTGACGGA

>4.16S.MFRE

TTTTSGCCGTGCGCAGCAAGCTGATCAGCCCTCCGCTGAGTGATGAAGCCATTAGGTATGTAAGCTATTTTCGTAGTGAA
GAAAAATGACGGTACCCGTAGAATAAGCCCGGCATAAAGAGTCCCATCAGCCCGGAATACGAGCGACGCTAGCGTTGTT
CGTATTCACGGGGCGTAAAGGGCGCGGAGGCGAGTGGATTAATCCGGCGGTGAAGGCATGTTCTGCCCCACAGAATTGCC
TTCGATACTGGAGGGCTTGAGACCGGAAGAGGACAGCGGAAGTGCAGTGAAGAGGTGAAATTCGTTTCATATTCGAAGA
ACACCATGGGCGAGGCTGGAGGAACTCCCGGGCTGACGCTGATCTCTGAAAGCGTGCTGAGGCTCAGGATTAGATACC
TGGAAGTCCACGCCATTAATATGAATGCCACCCGTTGGCCTGCTTTGAGTGAGTGGCGCCGCTAACGCATTCCTTTCCG
CCTGGGGAAACGGTTAAGGCATCCCACTGGGGAGAATTGCCGGAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGA

>5.16S.MELZ

GACCTCCGATCTCGTATGATCAGCACGCGCTGATGAAGATGTTTTTCGATCTGTAATCTGTTGGGAGAGGAGAAAAAT
GACGGTATCTAACGAAAAAGCCCGTAAAAACGAGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTTCGGATTT
ATTGGGCGTGAAGCGAGCGGAGGGAGTGGATTAAGAGTGAAGGGAAAGCCTGTGTTCAACTGATGAATTGCCTTCGAAA
CTGTCCGGCTTGAGTCTTGAAGTGGGAACTTGAGTGCTGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATTGTGTAGCGAACAAAAAT
GCGTAGATATATGGAGGAACACCCGTAAGTACGCTGATGTCTGGTCTGTAAGTACGCTAAGGCTCAAAAAGCCCTGGTA
GCAAACAGGATTAGATACCCTGGCAGTCCACCGGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGGC
TGGGCAAACGATTTAAGCACTCCGCCTGGGGAGAATTAACGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGA

>6.16S.MELZ

GACGATCAGTAGCTGGTCTGAGGGGATGTTGAGCACTTGCCTGGATGATAGGTCTTAGGATTGTAAATCCTTTCAGG
GAAAATAATGACGGTACCCAAAGAAGAAGCCCCGGTAACTACGGGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCG
TTGCTCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGTTGGCGGACAGTTAAGTTGGGGGTGAAAGCCCGGGGCTAACCTCGGAA
TTGCCTCAATACTGGCTGTCTTGAGTACGGGAGAGGTGAGTGGAACTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCC
GAAGAACCAGTGGCGAAGGCGACTACTGGCCCTTACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT

AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGTTGTCGGCATGCATGCATGTCCGGTGACGCAGCTAACGCAT
TAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGAGG

>7.16S.MFRE

GATAAAAGTTTCCAATGGTCTGAGAGATGATCGCCTGCGGTGAGGAAATTCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTGAACGG
AAGGAAAGCTCTTTCTAATAAAGAGGGGTCATGAGGAACCCGGAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTAATCGGAATACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTTGTAAGACAGAGGTGAA
ATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCCTTTGTGACTGCAAGGCTGGAGTGCGGCAGAGGGGGATGGAATTCCGCGTGTAG
CAGTAAAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAATCCCCTGGGCCTGCACTGACGCTCATGCACGAA
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTTGGGTCTTCACTGA
CTCAGTAACGAAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGA

>8.16S.MELZ

ACGACGATGTTTTGGAGTTCGTATTCTCTGATCAGCATGCCCGTGATGATACGGCTTTGGGTCGTAAACTCTGTTGAAGGA
CAAAAATGACGGTACCTTACGAATGGCCCTGGCTAAAACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGGGGTGCAAGCGTTGTT
CGGAATTATTGGGCTTAAAGGGTGCATGCGTTTGATTAAGTGAGAGGTGAAAGCCTGTGTCTCAACCACTGAATTGCCT
TCGATACTGGCCGGCTTGAGTCTGGTGAGGACGGAGGAACTGCGAGTGAAGAGGAGAAAATTCGTAGATATTCCAAAGA
ACACCATGGGCGAGGCTGGACCTGGCCCGCTTCTGACGCTGATGTCTGAAAGCGTGGTGAGCAAACAGGGATTAAGGCC
CTGGTAGTCCACGCCTTAAATACCCTGGCCGTCGTTGCSCTGCTTTGATTGCTAAGGGGCCGCTAACCCATTCCCTTTCCG
GCTGGGGGAGAACCGGTTAAGTAATCCGCCTGGAGAGAATTACCGGAAGGTTGAAGCTCAAAGGAAATTGACGGA