

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y
DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A. C**



Estudio de las interacciones bacterias ácido
lácticas- levaduras en fermentación para la
elaboración de una bebida alcohólica

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO
ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN LA
ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA PRODUCTIVA.**

PRESENTA:

Ing. Francisco Rafael Torres Guardado

GUADALAJARA, JALISCO, JUNIO 2017



Titulo

**Estudio de interacciones bacterias ácido
lácticas- levaduras en una fermentación para
la elaboración de una bebida alcohólica**

Agradecimientos

- De manera muy especial quiero agradecer a la Red temática mexicana aprovechamiento integral sustentable y biotecnología de los agaves (**AGARED**)



A Dios y a la **Santísima Virgen María** por permitirme participar en este proyecto de vida y formación profesional, donde me fue posible poner a prueba toda mi persona, en aras de mi crecimiento espiritual, personal y profesional.

A mi Madre Lilia Guardado Padilla. Que en todo momento me has entregado tu amor y sacrificio y que en esta etapa, queda claro que he aprendido de ti todas tus lecciones.

A María Gretel Michel Barba mi novia. Porque con todo tu amor y ternura salí adelante en los momentos más difíciles. Tu llegada a mi vida le dio el equilibrio que tanto anhelaba, porque hoy soy muy feliz a tu lado.

A Mariana, Vianney y Kelly. Por su sincera y valiosa amistad, fui muy feliz compartiendo esta etapa de mi vida con personas tan capaces y profesionales como ustedes, pero sobre todo personas de gran calidad humana.

A Alejandro Arana. Excelente y muy querido amigo, gracias por permitirme corresponder a tu valiosa amistad. Por todos tus consejos y auxilios. Pero sobre todo por esos momentos de conversación agradable con nuestras respectivas pipas.

A la Dra. Anne. Quien me abrió las puertas en su equipo para poder realizar eso que tanto anhelaba y que en su momento fue toda la ilusión de mi vida.

A los Doctores Manuel y Melchor. Por todos sus valiosos consejos y recomendaciones.

A Fátima Ordoñez. Por sus finas atenciones, quien jugó un papel muy importante en todo mi proceso de formación.

Resumen

En las últimas décadas se ha observado un creciente interés en las interacciones y dinámicas poblacionales entre bacterias ácido lácticas y levaduras en procesos fermentativos de bebidas alcohólicas, las cuales tienen un impacto en la producción de etanol y compuestos volátiles, dependiendo de esto la calidad de los productos. La mayoría de los estudios se han enfocado en el estudio de estas interacciones en procesos fermentativos del vino tinto, blanco y algunos otros fermentados como la sidra. Sin embargo se ha reportado la presencia de una gran diversidad de microorganismos que participan en los procesos fermentativos del tejuino y mezcal. En este trabajo se analizaron 17 bacterias ácido lácticas, en cuanto a sus desarrollo celular y tolerancia a diferentes concentraciones de etanol y osmolaridad. Posteriormente las bacterias seleccionadas se utilizaron en diferentes combinaciones bacteria-levadura, para evaluar el crecimiento de las dos diferentes especies por unidades formadoras de colonia "UFC". Una vez seleccionadas las combinaciones de interés para el proyecto, se realizaron nuevamente evaluaciones de interacción en medio MRS líquido y jugo de agave, midiendo la población microbiana mediante el uso de citometría de flujo, la cual permite realizar conteos diferenciados entre especies en una misma muestra y en menor tiempo en comparación a las técnicas convencionales. En esta evaluación se realizó la determinación del consumo de sustrato por medio del método de DNS y la cuantificación de ácidos orgánicos, producción de etanol y compuestos volátiles, evaluados mediante cromatografía de líquidos y gases respectivamente. Como resultado de este trabajo, fue posible encontrar interacciones bacteria-levadura que aportan una mayor concentración de compuestos volátiles y etanol al fermentado, así como catalogar el tipo de interacción entre estos microorganismos. En conclusión el presente trabajo demuestra el efecto de las interacciones bacteria-levadura en jugo de agave y el impacto sobre la producción de etanol y compuestos volátiles, permitiendo en un futuro realizar este estudio con fines de escalamiento y evaluación de moléculas de comunicación inter e intra-especie.

Índice de contenido

1.	Antecedentes	8
2.	Definición del tema	9
3.	Justificación	10
4.	Hipótesis.....	11
5.	Objetivos	12
5.1.	General	12
5.2.	Particulares.....	12
6.	Fundamentación.....	13
6.1.1.	Lácteos.....	13
6.1.2.	Bebidas fermentadas.....	13
6.1.4.	Bebidas destiladas	15
6.2.	Levaduras	16
6.2.1.	<i>Saccharomyces</i>	16
6.2.2.	No- <i>Saccharomyces</i>	16
6.3.	Bacterias ácido lácticas.....	16
6.5.	Interacciones microbianas	17
6.5.1.	Clasificación de interacciones microbianas.....	17
6.5.2.	Interacción levadura-levadura	18
6.5.3.	Interacción bacteria-levadura	19
6.6.	Quorum sensing	21
7.	Materiales y métodos.....	23
7.1.	Selección de bacterias ácido lácticas.....	23
7.1.1.	Desarrollo celular	23
7.1.2.	Tolerancia a etanol y osmolaridad	24
7.2.	Interacción bacteria-levadura mediante UFC/ml.....	24
7.2.1.	Conteo en microscopio.....	25
7.2.2.	Extensión en superficie	25
7.3.	Interacción bacteria-levadura	25
7.3.1.	Medio MRS	25

7.3.2.	Jugo de agave	25
7.3.3.	Desarrollo celular	26
7.3.4.	Cuantificación de azúcares reductores mediante DNS	26
7.3.5.	Evaluación de compuestos volátiles.....	26
7.4.	Análisis estadístico	26
El análisis de varianza fue realizado en el programa STATGRAPHICS CENTURION XVI.II por el método de LSD con 95% de confianza.		26
8.	Resultados y discusión.....	27
8.1.	Selección de bacterias	27
8.1.1.	Selección de bacterias por desarrollo celular.....	27
8.1.2.	Selección de bacterias tolerantes a etanol y osmolaridad.....	29
8.2.	Interacción bacteria levadura con base a desarrollo celular.	32
8.2.1.	Interacciones con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AR5.....	33
8.2.2.	Interacciones con <i>Kluyveromyces marxianus</i> SLP1	35
8.2.3.	Interacciones con <i>Pichia kluyveri</i> GRO3	37
8.3.	Evaluación del comportamiento de interacción en medio químicamente definido y jugo de agave 40	
8.3.1.	Interacción <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AR5/ <i>Leuconostoc</i> Sp BAC 31.3.....	40
8.3.2.	Interacción <i>Kluyveromyces marxianus</i> SLP1/ <i>Leuconostoc</i> Sp BAC 31.3.....	43
8.3.3.	Interacción <i>Pichia kluyveri</i> GRO3 / <i>Weissella cibaria</i> MGBA 16.....	46
9.	Conclusion	51
10.	Perspectivas.....	52
➤	Es necesario realizar análisis de moléculas quorum sensing para calificar puntualmente cada una de las interacciones bacteria-levadura.	52
11.	Bibliografía.....	53

Índice de figuras

Figura 1. Fases de desarrollo de una cinética bacteriana	24
Figura 2. Cinéticas de crecimiento de bacterias ácido lácticas	28
Figura 3. Tolerancia a etanol y osmolaridad con <i>L. plantarum</i> MGBA 30.7 y <i>Leuconostoc</i> Sp MGBA 31.3.	30
Figura 4. Análisis de tolerancia a etanol y osmolaridad con <i>W. cibaria</i> MGBA 16.	31
Figura 5. Tolerancia a etanol y osmolaridad con <i>L. fermentum</i> BAC 30.1.	31
Figura 6. Tolerancia a etanol y osmolaridad con <i>Oenococcus</i> Sp MGBA 36.	32
Figura 7. Interacción levadura-bacteria con <i>S. cerevisiae</i> AR5/ <i>W. cibaria</i> MGBA 16 y <i>S. cerevisiae</i> AR5 / <i>L. plantarum</i> . BAC 30.7.	34
Figura 8. Co- cultivo <i>S. cerevisiae</i> AR5/ <i>Leuconostoc</i> Sp. BAC 31.3.	35
Figura 9. Co-cultivos de interacción <i>K. marxianus</i> SLP1/ <i>W. cibaria</i> MGBA 16 y <i>K. marxianus</i> SLP1/ <i>L. plantarum</i>	36
Figura 10. Co-cultivo de interacción <i>K. marxianus</i> SLP1/ <i>Leuconostoc</i> Sp. BAC 31.3.....	36
Figura 11. Co-cultivo <i>P. kluyveri</i> GRO3/ <i>L. plantarum</i> BAC 30.7 y <i>P. kluyveri</i> GRO3/ <i>Leuconostoc</i> Sp. BAC 31.3.....	37
Figura 12. Co-cultivo <i>P. kluyveri</i> GRO3/ <i>W. cibaria</i> MGBA 16.....	38
Figura 13. Ensayo de co-cultivo <i>S. cerevisiae</i> AR5/ <i>Leuconostoc</i> Sp BAC 31.3..	42
Figura 14. Ensayo de co-cultivo <i>Kluyveromyces marxianus</i> SLP1/ <i>Leuconostoc</i> Sp BAC 31.3.....	44
Figura 15. Ensayo de co-cultivo <i>Pichia kluyveri</i> GRO3 / <i>Weissella cibaria</i> MGBA 16.....	47

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de interacciones microbianas	18
Tabla 2. Impacto de interacción levadura-bacteria , levadura-levadura en diferentes fermentados	20
Tabla 3. Selección de bacterias por desarrollo celular y condiciones de estrés	28
Tabla 4. Bacterias seleccionadas para prueba de interacción con levaduras	33
Tabla 5. Clasificación de relación microbiana levadura-bacteria	39
Tabla 6. Especies seleccionadas para interacción en medio químico y jugo de agave	40
Tabla 7. Análisis de compuestos volátiles, ácidos orgánicos y azúcares al final de la fermentación.....	42
Tabla 9. Análisis de compuestos volátiles, ácidos orgánicos y azúcares al final de la fermentación.....	47

1. Antecedentes

El proyecto que se me propuso despertó mi interés, ya que implicaba el estudio de interacciones microbianas en una fermentación alcohólica de jugo de agave, no obstante era un gran reto para mis habilidades profesionales, porque era necesario implementar técnicas metodológicas para evaluar el comportamiento del crecimiento de cada microorganismo involucrado, así como el impacto de la interacción sobre el fermentado.

Adicionalmente, este proyecto fue una gran oportunidad para adquirir nuevo conocimiento y habilidades técnico-analíticas especializadas en fermentación, lo cual seducía mi deseo de aprendizaje en esta rama de investigación.

2. Definición del tema

La microbiota involucrada en los procesos fermentativos en general y del jugo de agave en particular es muy compleja por la presencia de diferentes especies de levaduras y bacterias, debido a esto las interacciones entre microorganismos afecta la calidad sensorial y rendimientos de conversión de azúcares a etanol en las bebidas. Además se desconoce qué tipo de interacciones, su función e impacto sobre las bebidas elaboradas por fermentación con jugo de agave.

3. Justificación

En diversos procesos fermentativos para la obtención de bebidas alcohólicas se ha estudiado la interacción de bacterias y levaduras y su aportación al producto final, no obstante en procesos fermentativos con jugo de agave se ha reportado la presencia de bacterias, de las cuales se desconoce cómo interactúan con las levaduras y el impacto de esta relación en el producto final.

4. Hipótesis

La evaluación del desarrollo de bacterias y levaduras en co-cultivo de una fermentación, permitirá establecer el tipo de interacción entre estos microorganismos, así como el impacto sobre rendimientos de etanol y composición volátil.

5. Objetivos

5.1. General

- Estudiar la interacción entre bacterias y levaduras aisladas de fermentaciones de jugo de agave y otros procesos fermentativos para definir el impacto de las poblaciones bacterianas sobre las características de las fermentaciones y la generación de compuestos aromáticos en el fermentado.

5.2. Particulares

- Seleccionar al menos 5 bacterias y 3 levaduras de la colección de CIATEJ por sus características individuales, en particular sus capacidades fermentativas.
- Evaluar la interacción de las bacterias y levaduras seleccionadas en co-cultivo bacteria-levadura en medio líquido, con base a su desarrollo celular.
- Evaluar el comportamiento de las interacciones encontradas en el objetivo 2, en medio MRS y jugo de agave en cuanto al desarrollo celular, producción de etanol y compuestos volátiles.

6. Fundamentación

En la alimentación humana existen diversos productos fermentados donde participan bacterias, levaduras y hongos, éstos por acción metabólica transforman diferentes sustratos para elaborar una gran variedad de bebidas, productos lácteos y cárnicos. Es importante señalar que en los productos lácteos participan levaduras y bacterias ácido lácticas, encargadas de transformar y aportar compuestos que enriquecen la calidad sensorial del producto, otorgándole viscosidad, acidez y textura al alimento. Por otra parte las bebidas alcohólicas se elaboran por el proceso de conversión de azúcares a etanol en una gran variedad de mostos de fermentación, los cuales son provenientes de uva, manzana, agave y algunos cereales.

6.1.1. Lácteos

6.1.1.1. Yoghurt

El proceso de la elaboración de yoghurt consiste en la pasteurización de la leche como primer paso, posterior a este tratamiento es posible iniciar una fermentación controlada con inóculos comerciales de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*. Estas bacterias por acción catabólica transforman la lactosa a ácido láctico como producto principal de fermentación y además son responsables de la producción de exopolisacáridos los cuales incrementan la viscosidad y textura del fermentado [1]. En la elaboración de este producto, se adicionan agentes y frutos para satisfacer las demandas del mercado en orden de textura, apariencia, dulzura y sabor [2].

6.1.1.2. Kéfir

El Kéfir es un producto lácteo fermentado, ácido y ligeramente alcohólico el cual posee numerosos compuestos aromáticos y bioactivos como vitaminas, bacteriocinas y péptidos, los cuales tienen un impacto positivo en la salud. Esta bebida es elaborada por consorcios microbianos “kéfir grains” donde intervienen bacterias ácido lácticas, ácido acéticas y levaduras, donde los diversos metabolitos microbianos secretados al medio contribuyen a la riqueza sensorial de la bebida, resaltando principalmente notas agrias, frutales y una ligera efervescencia [3].

6.1.2. Bebidas fermentadas

6.1.2.1. Vinos de uva

El vino ha estado presente desde los comienzos de la civilización y ha seguido al humano y su agricultura por diferentes caminos por más de 7,000 años, desde el mar Caspio hasta Argentina. Su descubrimiento se atribuye a las uvas que espontáneamente se fermentaban en tinajas de almacenamiento, los agricultores al probar estas uvas fermentadas, disfrutaban sus efectos en

mayor medida de las que no se habían fermentado, debido a esto optaron por fermentar el jugo y no las frutas completas, obteniendo así el vino [4]. Además recientemente se han demostrado diversos efectos benéficos para la salud, como la reducción de riesgos por males cardíacos, envejecimiento celular, arterioesclerosis y otras enfermedades [5]. La elaboración del vino puede ser resumida como la biotransformación de los azúcares de jugo de uva a etanol y otros compuestos. La fermentación alcohólica es realizada por acción metabólica de levaduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, no obstante en este proceso interviene la fermentación maloláctica, en la cual el ácido málico se transforma a ácido láctico por el metabolismo de bacterias ácido lácticas [6].

6.1.2.2. Sidra

La sidra es una bebida popular a nivel mundial, donde la región de Asturias España es la principal zona productora. Esta bebida se produce por fermentación espontánea tanto alcohólica y maloláctica del jugo de manzana, seguido de este proceso se realiza la maduración del fermentado en conjunto de los posos originados en el proceso, relacionados con el incremento y complejidad aromática ya que son capaces de retener componentes indeseables como sulfuros y fenoles volátiles que afectan la calidad sensorial de la bebida [7, 8].

6.1.3. Procesos de fermentación

6.1.3.1. Fermentación alcohólica

Este proceso ha sido empleado para la obtención de bebidas alcohólicas, su función es la conversión de azúcar a etanol y dióxido de carbono, este proceso es llevado a cabo por diversos géneros de levaduras donde la especie de especial interés es *Saccharomyces cerevisiae* al ser una especie dominante durante el proceso de fermentación [9]. Las levaduras realizan la conversión de azúcar a etanol y CO₂ con la relación de 1mol de azúcar que se convierten a 2 moles de etanol y 2 de CO₂ según la ecuación de Gay-Lussac.

6.1.3.2. Fermentación maloláctica

La fermentación maloláctica es realizada por bacterias ácido lácticas mediante el proceso de conversión del ácido málico a ácido láctico, catalizado por la enzima maloláctica (lactato-deshidrogenasa). La transformación del ácido málico, depende de la integridad de la membrana celular, debido a que las proteínas internas o enzimas deben estar protegidas de factores inhibidores del medio fermentado, eso explica por qué no se ha desarrollado una enzima útil para el tratamiento del vino en fermentación maloláctica [10]. Usualmente es un proceso secundario de la fermentación alcohólica en vino, y otros fermentados, el cual puede realizarse en condiciones de co-cultivo o de manera secuencial. La fermentación maloláctica es realizada principalmente por *Oenococcus oeni* y otras especies de bacterias ácido lácticas al momento en que incrementa la población bacteriana en el medio de fermentación. Como resultado de este segundo proceso de fermentación disminuye la acidez del vino y se generan características

aromáticas específicas [11-14], clasificadas en alcoholes, furanos, ácidos, aldehídos, cetonas, terpenos y fenoles los cuales confieren notas aromáticas a los fermentados [10].

6.1.4. Bebidas destiladas

6.1.4.1. Cachaça

La cachaça es una bebida destilada típica y exclusiva de Brasil, obtenida del fermentado del jugo de caña con un contenido de 38% a 48% (v/v) de etanol. Durante el proceso fermentativo se presentan diferentes especies de levaduras pertenecientes a los géneros *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* así como diferentes especies de bacterias ácido lácticas y acéticas, donde el mayor aporte aromático lo realizan las levaduras. El mayor productor en litros por año es el estado de Minas Gerais con 230 millones de litros de los 1.3 billones de producción nacional [15, 16].

6.1.4.2. Mezcal

El mezcal es una bebida producida dentro de una zona de la denominación de origen conformada por los estados de Durango, Guerrero, Oaxaca, San Luis Potosí, Zacatecas, algunos municipios de Guanajuato, Tamaulipas y Puebla, por lo que su producción se limita únicamente a estos estados. Es el segundo destilado más importante de México después del tequila y de acuerdo a la NOM-070, el mezcal puede ser elaborado por diferentes especies de agave, donde figuran principalmente las especies *A. angustifolia*, *A. americana*, *A. karwinski*, *A. marmorata* y *A. rhodacantha* en el estado de Oaxaca, no obstante en el centro y norte del país especies como *Agave salmiana*, *A. cupreata* y *A. duranguensis* son empleadas para la producción del mezcal [17]. El proceso general de elaboración del mezcal consiste en la cosecha de las piñas de agave, cocimiento, molienda, fermentación, destilación y maduración, donde la riqueza aromática proviene de todas las etapas de elaboración y la diversidad microbiana asociada a la fermentación juega un papel fundamental [18].

6.1.4.3. Tequila

El tequila es una bebida destilada obtenida de la fermentación de los azúcares presentes en el *Agave tequilana* Weber var. azul, elaborado dentro de las regiones permitidas por la denominación de origen. El proceso de elaboración del tequila consiste en la cosecha de las piñas de agave azul entre 6 a 8 años de edad, posterior a ello son sometidas a cocimiento en hornos de 24 a 48 horas o autoclaves por un periodo de 12 a 24 h. Una vez hidrolizados los azúcares por el tratamiento térmico, las piñas continúan con el proceso de molienda para la extracción del jugo de agave, mismo que se fermenta por inóculos controlados, fermentación espontánea o consorcios microbianos según las prácticas de cada casa productora. Posterior a

la fermentación, el mosto se somete al proceso de doble destilación “ordinario” como primer destilado y “rectificado” la última destilación, con la que de acuerdo a la NOM del tequila se obtiene el producto final [19, 20].

6.2. Levaduras

6.2.1. *Saccharomyces*

Durante el proceso de elaboración del vino de uva, coexisten e interactúan diversos microorganismos lo cual influye en la prevalencia o dominio de especies, así como las propiedades aromáticas del mosto [21]. En la fermentación espontánea del vino es posible encontrar una gran diversidad de levaduras, por una parte las no-*Saccharomyces* presentes durante los primeros estadios de fermentación, así como diversas especies pertenecientes al género *Saccharomyces*, capaces de sobrevivir y permanecer hasta el final de la fermentación alcohólica [22], debido a la combinación de diversas propiedades como alta tasa de crecimiento, gran habilidad para producir etanol y ser tolerantes a condiciones de estrés por alta concentración de etanol y bajos niveles de oxígeno [23]. El uso de *Saccharomyces cerevisiae* como *starter* es una práctica común en la elaboración de vino, no obstante la inoculación de mostos con especies seleccionadas no garantiza su presencia hasta el final del proceso, debido a que la competencia con especies endémicas del ambiente vinícola dificulta la supervivencia de las especies comerciales, así como las condiciones fisicoquímicas del medio de fermentación a las que no están adaptadas [24].

6.2.2. No-*Saccharomyces*

Durante el proceso fermentativo del vino de uva, las dinámicas, la composición y el sabor son influenciados mayoritariamente por las levaduras no-*Saccharomyces*, debido a que su mayor aporte en la fermentación es la producción de diversos metabolitos como ésteres, ácidos orgánicos, aldehídos, cetonas y terpenos que contribuyen significativamente en la calidad sensorial del producto [25]. Como parte de este grupo de levaduras se han reportado diversos géneros donde figuran *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulaspota*, entre otros, los cuales han tenido un impacto positivo en el fermentado por el aporte aromático de cada uno de ellos [26-28]. Sin embargo, una característica de este grupo es que no todas son tolerantes a etanol por lo que no son capaces de fermentar todos los azúcares del medio a medida que avanza la fermentación [25].

6.3. Bacterias ácido lácticas

En el proceso de fermentación del vino de uva figuran principalmente 4 géneros de bacterias ácido lácticas “BAL” (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus*), debido a que son

microorganismos tolerantes a la acidez y al etanol, lo que les permite desarrollarse en condiciones desfavorables para otros microorganismos. Al inicio de la fermentación los mostos contienen una baja población bacteriana, debido a la concentración de etanol y bajo pH que contiene el fermentado, semanas posteriores al almacenamiento del vino la tolerancia de algunas bacterias ácido lácticas a estos compuestos incrementa, además de la disponibilidad de nutrientes propios de la lisis celular de las levaduras inactivas, proporciona un medio más favorable para su desarrollo [12].

6.4. Bacterias ácido acéticas

Son conocidas por su habilidad de oxidar azúcares y alcoholes, como resultado de su metabolismo se obtienen ácidos orgánicos como productos finales. Este tipo de bacterias están involucradas en importantes procesos industriales, donde pueden producir altas concentraciones de ácido acético a partir de etanol, lo cual las hace importantes para la industria del vinagre, sin embargo, no son deseadas en los procesos de fermentación para la obtención de bebidas alcohólicas [29].

6.5. Interacciones microbianas

En un ecosistema pequeño como lo es un mosto de fermentación, habitan diversas especies de microorganismos debido a que es un medio con grandes cualidades nutritivas. Durante el proceso de fermentación se establecen interacciones entre los diferentes microorganismos presentes en el bioproceso, dando origen a interacciones positivas y negativas por el efecto que ejerce un microorganismo sobre la población de otro, éste se encuentra relacionado por la promoción o inhibición del desarrollo por diversos mecanismos, los cuales determinan cada una de las interacciones [30].

6.5.1. Clasificación de interacciones microbianas

Las interacciones microbianas se clasifican por el impacto que genera una especie sobre la otra (Tabla 1) donde los metabolitos secretados por cada microorganismo, así como la competencia por sustrato afectan la relación entre las mismas.

Tabla 1. Clasificación de interacciones microbianas [30]

Interacción	
Positiva	
Mutualismo	Diferentes especies se benefician por la presencia de otra
Comensalismo	Una especie se beneficia sin dañar a otras
Neutra	
No hay efecto de promoción o inhibición de crecimiento	
Negativa	
Amensalismo	Interacción en la que un producto metabólico de una especie tiene un efecto negativo sobre otra
Antibiosis	Una especie detrimenta el desarrollo de otras por productos metabólicos específicos para daño celular

6.5.2. Interacción levadura-levadura

La característica principal de las levaduras es la conversión de los azúcares presentes en los mostos de fermentación a etanol, debido a ello, son los organismos de mayor importancia en la elaboración de bebidas alcohólicas, donde las especies del género *Saccharomyces* son las más importantes al tener como función principal la producción de etanol [23, 31]. No obstante otros géneros de levaduras no-*Saccharomyces* impactan en la producción de etanol, así como en la generación de compuestos volátiles del fermentado, por esta razón existe un creciente interés en la implementación de co-cultivos de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* en fermentación [32].

La interacción entre géneros *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* ha registrado incrementos en compuestos volátiles a diferencia de cultivos con una sola especie. Por ejemplo la interacción *Metschnikowia pulcherrima/Saccharomyces cerevisiae* en vino blanco, presenta un mayor contenido de alcoholes, en contraste a la producción alcanzada por *Saccharomyces cerevisiae* durante un mono-cultivo, por otra parte la interacción *Torulaspota delbrueckii/Saccharomyces cerevisiae* reporta un mayor contenido de terpenos a diferencia de una fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* solamente [32]. Además la fermentación con estos dos microorganismos registra una disminución en la acidez volátil [33] y un aumento en la producción de acetaldehído, isobutanol, 2-feniletiletanol, acetato de isoamilo, hexanol, dietil succinato y glicerol [26].

En procesos fermentativos diferentes al vino, ha sido reportada la presencia de especies de levaduras pertenecientes a géneros *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces exigus*, *Kluyveromyces marxianus*, *Torulaspota delbrueckii*, *Pichia*

kluyveri entre otros, los cuales fueron encontrados en el proceso fermentativo del mezcal [18]. La interacción entre especies procedentes de procesos fermentativos con jugo de agave ha sido estudiada con *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* en medio sintético, donde se registra una disminución del periodo de fermentación en cultivo mixto, así como un incremento significativo en la producción de etanol, en contraste a cultivos puros [27]. Por otra parte las interacciones realizadas entre especies pertenecientes a los géneros *Kloeckera*, *Hanseniaspora* y *Saccharomyces* registran incrementos en la producción de alcoholes superiores, 2-feniletanol, acetato de isoamilo y etil octanoato en fermentación de jugo de *Agave tequilana* [19].

6.5.3. Interacción bacteria-levadura

La transformación del ácido málico a ácido láctico es la principal función de las bacterias ácido lácticas, lo cual disminuye la acidez del vino, impactando en el sabor y haciéndolo menos agresivo al paladar, no obstante numerosos compuestos generados por las bacterias ácido lácticas (BAL) están involucrados en la composición aromática del vino [10]. La presencia de levaduras y BAL así como la interacción de estos microorganismos en la elaboración del vino, ha tenido un creciente interés, particularmente la interacción *Saccharomyces cerevisiae/Oenococcus oeni* anteriormente *Leuconostoc oenos* [31, 34], ha sido objeto de estudio por la generación y aumento en la concentración de numerosos compuestos volátiles como resultado de la interacción. En condiciones de co-cultivo algunos reportes registran incremento de compuestos volátiles tales como etil lactato, ácido propiónico [35], glicerol [36], propanol, 2-feniletanol, etil acetato, etil lactato [37], hexil acetato, etil butirato, etil hexanoato, sin embargo compuestos como furfural e hidroximetil furfural disminuyen como resultado de la interacción [38]. En la fermentación de manera secuencial, se origina de igual manera un aumento en la concentración de compuestos volátiles como acetato isobutílico, hexil acetato, 2-feniletil acetato, siringol, hexenol, metanol, isobutanol [37] y acetaldehído [36], además del incremento en la concentración de compuestos volátiles en co-cultivo y fermentación secuencial, los periodos de fermentación se reducen por efecto de la interacción microbiana. En la interacción *Saccharomyces cerevisiae/Oenococcus oeni* la fermentación maloláctica en co-cultivo se reduce a 6 días, en tanto que en cultivo puro de BAL el periodo es de 25 días [14], también otros reportes registran la disminución de este proceso [35, 39, 40] lo cual puede ser una alternativa para la elaboración del vino con el objetivo de reducir el periodo de fermentación [37]. Los reportes realizados hasta hoy muestran las grandes bondades obtenidas como resultado de una interacción, sin embargo la interacción puede influir en la descomposición y generación de compuestos no deseados en la elaboración de bebidas [13] por lo que para el éxito de una fermentación realizada con interacción de microorganismos, será necesario realizar cuidadosamente la elección de las especies involucradas [40].

En la elaboración del vino y otros procesos de fermentación, las interacciones de bacterias y levaduras han mostrado tener un impacto sensorial en el producto, lo cual no depende estrictamente de la interacción *Saccharomyces cerevisiae/Oenococcus oeni*. Está reportado que la interacción de otras especies de bacterias y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae/Lactococcus lactis* generan un incremento en la concentración de compuestos como propanol, isobutanol y alcoholes amílicos en la fermentación de jugo de caña para la obtención de cachaça, los cuales impactan en la calidad sensorial del producto [15], además la interacción *Saccharomyces cerevisiae/Lactobacillus fermentum* en cachaça, muestra que la composición volátil de diferentes fracciones de destilación tiene un impacto positivo sobre el producto al aumentar en la concentración de acetaldehído, etil lactato y hexanol en cabezas; acetaldehído en colas y etil lactato, 3-metil-1-butanol y 2-feniletanol en corazón [16]. Cabe señalar que hasta el momento los reportes anteriores son los primeros en realizar estudios de interacción bacteria-levadura en la elaboración de bebidas destiladas de jugo de caña, dando origen al análisis de interacción en otras bebidas destiladas, como aquellas relacionadas con la fermentación del jugo de agave, debido a que en el proceso de elaboración del Mezcal se reporta la presencia de bacterias ácido lácticas [17] y hasta el momento existen solamente reportes de interacción levadura-levadura donde se presenta un incremento en la producción de compuestos volátiles [19, 27].

Las interacciones levadura-bacteria se clasifican en positiva negativa y neutra, sin embargo estas deben detallarse con mayor profundidad en cuanto al efecto que ejerce un microorganismo sobre otro a nivel molecular. Por otra parte, las interacciones generan un impacto en el producto de manera independiente a la relación entre estas especies, es decir que el impacto puede ser positivo en el producto, no importando si la relación en función del crecimiento es negativa. En la tabla 2 es posible observar las diferentes relaciones entre especies y el impacto que tienen en diferentes productos

Tabla 2. Impacto de interacción levadura-bacteria , levadura-levadura en diferentes fermentados

Interacción microbiana	Producto	Microorganismos relacionados	Resultado de interacción	Impacto en el producto	Referencia
Amensalismo	Vino tinto	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> y <i>Oenococcus oeni</i>	Fermentación maloláctica sin detrimento	Positivo	[41]
	Vino tinto	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> y <i>Oenococcus oeni</i>	Incremento de compuestos volátiles	Positivo	[35]
	Tequila	<i>Kluyveromyces marxianus</i> y <i>Saccharmyces cerevisiae</i>	Incremento de la producción de etanol	Positivo	[27]

	Cachaça	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Lactococcus lactis</i>	No hubo diferencia significativa en producción de etanol	Neutro	[15]
	Vino tinto	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> y <i>Oenococcus oeni</i>	Disminución periodo de fermentación maloláctica	Positivo	[14]
	Cachaça	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Lactobacillus fermentum</i>	Incremento en compuestos volátiles	Positivo	[16]
Antibiosis	Vino tinto	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> y <i>Oenococcus oeni</i>	Menor degradación de ácido málico	Negativo	[11]
	Vino tinto	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Saccharomyces uvarum</i>	Disminución periodo de fermentación e incremento de acetaldehído	Positivo	[42]
Comensalismo	Vino tinto	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> y <i>Oenococcus oeni</i>	Incremento de compuestos volátiles	Positivo	[38]
	Vino tinto	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> y <i>Oenococcus oeni</i>	Reducción de tiempo de la fermentación maloláctica	Positivo	[39]
Sinergismo	Vino blanco	<i>Torulaspora delbrueckii</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Incremento de compuestos volátiles	Positivo	[32]

Como puede observarse, la interacción de las mismas especies en un mismo producto pueden impactar de manera distinta al producto, como ejemplo las interacciones con *Sacharomyces cerevisiae* y *Oenococcus oeni* en vino tinto pueden generar un aumento en la composición volátil del fermentado y reducción del periodo de fermentación, no obstante es posible que el impacto sea negativo en otro proceso donde la fermentación maloláctica sea afectada.

6.6. Quorum sensing

El proceso mediante el cual las bacterias monitorean y evalúan su población por la secreción de señalizadores químicos se conoce como quorum sensing, éste se divide en dos grupos, para bacterias gram-negativas y gram-positivas, donde las acil-homoserina lactonas (AHL) son moléculas involucradas con las bacterias gram negativas, sintetizadas por las enzimas LuxI y

LuxR, las cuales son únicamente reconocidas por organismos pertenecientes a la misma especie. En contraste las bacterias gram positivas no emplean las homoserina lactonas para señalización, este grupo de bacterias produce y transporta al ambiente autoinductores de origen peptídico (AIPs) [43] que constan de 5-17 aminoácidos [44], sin embargo, la comunicación inter-especie se realiza por un comunicador universal AI-2 sintetizado por la enzima LuxS [45, 46] la cual se encuentra presente en una amplia variedad de bacterias gram negativas y positivas como *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Oenococcus oeni* [44]. Los compuestos de señalización son empleados por bacterias para realizar diversas funciones según sean las condiciones a las que estén expuestas. En el caso de las bacterias gram negativas, las AHL son empleadas para realizar la formación de biofilms, producción de toxinas, simbiosis o algunos metabolitos secundarios [43, 45] y en bacterias gram positivas los AIPs promueven la esporulación, competencia y la producción de toxinas [47]. Estos oligopeptidos o feromonas [48] son acumulados en el ambiente durante el crecimiento celular hasta una concentración límite, desencadenando la producción de péptidos antimicrobianos [47], particularmente dentro del grupo de las bacterias gram-positivas. Las BAL producen 3 clases de péptidos antimicrobianos, los de clase I : lantibioticos, II no-lantibioticos termoresistentes y III no-lantibioticos de cadena larga, la gran mayoría de bacteriocinas pertenecen a los péptidos de clase II [49] como leucocina de los géneros *Leuconostoc* y *Weisella*, mesenterocina por las especies *Leuconostoc mesenteroides* [50], nisina por *Lactobacillus lactis*, subtilina por *Bacillus subtilis* perteneciente a los compuestos lantibioticos [47]. Algunas bacteriocinas producen lisis celular en células sensibles [49], lo cual en ciertas concentraciones matan a otros organismos competidores [47].

En organismos eucariontes poco se conoce del quorum sensing en comparación con otros organismos como bacterias, en *Saccharomyces cerevisiae* principal organismo de estudio, los alcoholes aromáticos 2-feniletanol y triptofol son responsables de regular la formación de pseudohifas [51], filamentación y formación de biofilms, estos alcoholes ocasionalmente se producen en respuesta a estrés, los cuales se han encontrado en la fermentación alcohólica y panificación [48].

7. Materiales y métodos

Al comienzo de este proyecto se contaba con una enriquecida información del estudio en vino, cachaça y tequila, sin embargo era necesario evaluar el desarrollo de las bacterias ácido lácticas seleccionadas para este proyecto, debido a que eran provenientes de diferentes procesos de fermentación.

Asimismo fue necesario evaluar el desempeño de cada bacteria seleccionada en un medio con concentraciones de azúcares y etanol similares a las del proceso de elaboración de tequila. Por otra parte los análisis de interacción se realizaron de acuerdo a los estudios reportados en vino con unidades formadoras de colonia, además se implementó la evaluación del desarrollo de cada microorganismo mediante el uso de citometría de flujo.

Posterior a la selección de diferentes co-cultivos se realizaron ensayos en los que se evaluó la población celular, consumo de sustrato y formación de compuestos volátiles por cromatografía de gases.

7.1. Selección de bacterias ácido lácticas

La selección de bacterias se realizó en dos etapas, selección por desarrollo celular como primer etapa y la selección por la tolerancia a diferentes concentraciones de etanol y osmolaridad, permitiendo así trabajar con aquellas capaces de sobrevivir a estas condiciones similares a las del jugo de agave. Las especies involucradas en este proyecto son pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus* y *Weissella*; las cuales fueron aisladas de los procesos fermentativos del mezcal, cacao y tejuino.

7.1.1. Desarrollo celular

El ensayo de desarrollo celular se realizó por triplicado, inoculando un mililitro del pre inoculo, el cual se generó a partir de criovial, cada especie fue cultivada en tubos Falcon de 15ml con caldo MRS estéril, éstos fueron incubados por 48 horas a 30°C [52, 53]. La toma de muestras se realizó cada 4 horas para medir la densidad óptica a 600 nm en un lector de micro placas EON. Posterior al término de la cinética de crecimiento, se graficaron los resultados de densidad óptica contra tiempo, permitiendo así observar la cinética de crecimiento de cada especie. Para la selección de especies, fue necesario evaluar su crecimiento en función de las etapas de desarrollo de la cinética, donde habrían de observarse las fases de desarrollo *lag*, exponencial, estacionaria y muerte (figura 1) siendo seleccionadas únicamente aquellas que presentaran definidamente cada una de las etapas.

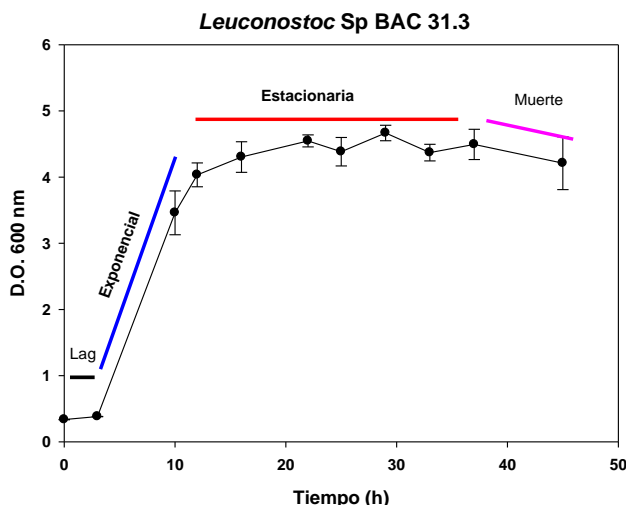


Figura 1. Fases de desarrollo de una cinética bacteriana

7.1.2. Tolerancia a etanol y osmolaridad

El análisis de tolerancia a etanol y osmolaridad se realizó por triplicado para cada especie con diferentes niveles de concentración de etanol y fructosa. El ensayo consistió en adicionar el caldo MRS con cada compuesto [54, 55]. Para el estudio con etanol se establecieron tres niveles de concentración, 6%, 12% y 18% (v/v) con etanol de grado industrial. Por otra parte en el ensayo de osmolaridad se establecieron 4 condiciones, 10,15 y 20° Brix y un nivel de 15°Brix-12% etanol. Cada nivel de concentración de etanol y osmolaridad fue preparado de manera individual, realizando cálculos de concentración para así determinar el volumen necesario para la adición de etanol y solución de fructosa. El ensayo se realizó en un volumen de 50 mL con tubos Falcon de la misma capacidad, inoculados con 1 ml del pre inóculo de cada especie, incubado por 48h a 30°C. La biomasa fue evaluada mediante lector de microplacas a 600 nm, tomando lectura cada 4 horas.

7.2. Interacción bacteria-levadura mediante UFC/ml

El ensayo de interacción bacteria-levadura consistió en cultivar las dos especies individualmente y en co-cultivo por triplicado. El ensayo se realizó en tubos Falcon de 50 ml con caldo MRS, inoculando 1×10^6 cel/ml de cada especie, el ensayo se incubó a 30°C por un periodo de 96 horas. La biomasa se evaluó cada 4 horas mediante extensión de superficie para lo cual fue necesario adicionar clotrimazol y cloranfenicol con 100 mg/L y 0.05 g/L, respectivamente, al agar MRS, permitiendo así realizar conteos de bacterias y levaduras del co-cultivo de manera independiente [14]

7.2.1. Conteo en microscopio

El conteo en microscopio se fundamenta por la determinación de células en un volumen conocido y la extrapolación según la dilución realizada para obtener células/mL. Para realizar el conteo de células es necesario realizar una dilución de la muestra, la cual es transferida a la cámara de Neubauer y vista en el microscopio a 40x.

7.2.2. Extensión en superficie

La extensión en superficie consiste en extender una muestra líquida en la superficie de un medio de cultivo sólido, para posterior al periodo de incubación realizar el conteo de unidades formadoras de colonia y extrapolar según la dilución realizada, determinando finalmente la concentración de la muestra en UFC/mL [56].

7.3. Interacción bacteria-levadura

El ensayo de interacción bacteria-levadura con medio MRS líquido y jugo de agave, consistió en cultivar cada una de las especies de manera particular, así como realizar el co-cultivo de ambas en el mismo medio de fermentación inoculando 1×10^6 cel/mL de cada especie. La biomasa e inóculos fueron determinados mediante citometría de flujo, técnica que permite realizar la evaluación en menor tiempo y capaz de diferenciar dos microorganismos en solución.

7.3.1. Medio MRS

Para realizar la evaluación de las interacciones bacteria-levadura, fue necesario utilizar MRS líquido, el cual permite repetir el ensayo por la composición uniforme del mismo, sin embargo fue preciso ajustar la concentración de la fuente de carbono con fructosa a 15° Brix, similar al jugo de agave [57]. El volumen empleado para cada ensayo fue de 100 ml, mismo que fue incubado a 30°C de manera constante por un periodo de 96 horas en anaerobiosis y sin agitación.

7.3.2. Jugo de agave

En el ensayo de interacción con jugo de agave, fue utilizado el jugo de agave proveniente de la región de los Altos Jalisco el cual contenía una concentración de 140 g/L de azúcares totales, éste fue filtrado por membrana de 0.22 micras para poder esterilizar y analizar cada muestra en el equipo de citometría de flujo. El volumen empleado para cada ensayo fue de 100 ml, mismo que fue incubado a 30°C de manera constante por un periodo de 96 horas en anaerobiosis y sin agitación.

7.3.3. Desarrollo celular

La biomasa fue evaluada mediante el equipo de citometría de flujo (C6 BD ACCURI™) cada 6 horas durante los primeros 3 días y cada 24h los 2 días restantes. Con cada muestra de cultivo se realizaron diluciones seriales en tubos eppendorff utilizando agua miliQ, con el objetivo de no sobrepasar el límite de conteo del equipo (1×10^6 cel/100 μ L), posteriormente cada muestra fue contabilizada y al termino del triplicado de cada ensayo se realizó un lavado del capilar del equipo de citometría con agua miliQ. Esta medición consiste en la contabilización de células por medio de la interrupción de rayo láser, donde ésta relaciona el tamaño y complejidad del microorganismo y lo traduce en la gráfica “dot plot” en la cual por diferencia de tamaño es posible diferenciar dos microorganismos diferentes como bacterias y levaduras.

7.3.4. Cuantificación de azúcares reductores mediante DNS

El consumo de los azúcares fue evaluado en los mismos puntos donde se evaluó la biomasa, es decir cada 6 horas los primeros 3 días y 24h los dos restantes. Para determinar los azúcares presentes en el medio se utilizó la técnica del DNS [58], la cual se basa en la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico en ácido 3-amino-5-nitrosalicílico cuando los grupos aldehídos se oxidan por los grupos carboxilos. Se tomaron 100 μ L de la muestra y 100 μ L del reactivo DNS en un tubo eppendorf. Esta mezcla se colocó a baño maría a 95°C por 5 minutos, posterior a este tratamiento se enfrió en hielo, una vez frío se mezcló con 1 ml de agua destilada y se midió absorbancia a 540 nm en el lector de microplacas EON. Los valores resultantes se convirtieron según la curva de calibración realizada en el mismo momento de la determinación.

7.3.5. Evaluación de compuestos volátiles

Se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies® 7890B acoplado a un muestreador Headspace Agilent Technologies® 7697A. Las muestras se inyectaron a través de este último, calentándolas primero a 90°C durante 5 minutos y después pasando al *loop* a una temperatura de 110°C, en seguida a la línea de transferencia a 115°C para finalmente entrar en el cromatógrafo utilizando un flujo de 1.3 mL/min. En éste, se usó un detector de ionización de flama y una columna de vidrio Agilent® HP-INNOWax de 60 m por 0.25 μ m. Una vez dentro del equipo, la muestra se sometió a una temperatura de 45°C por 8 minutos y enseguida se aplicó un gradiente que la llevó hasta 80°C con una tasa de incremento de 2°C/minuto, posteriormente llegando a 160°C con una tasa de 5°C/min y finalmente llegar a 220°C con una tasa de 25°C/min por 4 minutos. La temperatura del detector fue de 250°C y los flujos de gases fueron: helio 40 mL/min, aire 400 mL/min y nitrógeno 20 mL/min. Para la calibración se hizo una curva con estándares externos en rangos de 0.1 a 100 g/L.

7.4. Análisis estadístico

El análisis de varianza fue realizado en el programa STATGRAPHICS CENTURION XVI.II por el método de LSD con 95% de confianza.

8. Resultados y discusión

8.1. Selección de bacterias

Para seleccionar las mejores especies para realizar este proyecto fue necesario tomar en cuenta las condiciones fisicoquímicas particulares de una fermentación alcohólica, es decir, alto contenido de azúcares al inicio de la fermentación y generación de etanol en el transcurso de la fermentación y poca oxigenación. El crecimiento de cada bacteria se evaluó en estas condiciones para así seleccionar los mejores candidatos para las evaluaciones posteriores de las interacciones.

8.1.1. Selección de bacterias por desarrollo celular

Para satisfacer la primera etapa del objetivo número uno, se realizaron 17 cinéticas de crecimiento de bacterias ácido lácticas en medio MRS líquido. Del total de bacterias analizadas se seleccionaron únicamente aquellas que presentaron claramente todas las fases de desarrollo, mismo que puede observarse en la figura 2 con las cepas *Weissella cibaria* MGBA 16 y *Leuconostoc* Sp BAC 31.3, donde es posible observar con claridad las fases de crecimiento fase de adaptación (fase lag), exponencial y estacionaria. En contraste a las dos especies anteriormente mencionadas, las cepas *Lactobacillus plantarum* MGBA 39 y *Oenococcus* Sp MGBA 36 no tuvieron un buen crecimiento y las fases de desarrollo no se presentaron con claridad. En caso de la cepa *L. plantarum* MGBA 39, no fue apreciable la fase exponencial, únicamente es posible observar un ligero aumento de la densidad celular en el tiempo 24h manteniéndose hasta el final de la cinética. Por otra parte la cinética de *Oenococcus* Sp MGBA 36 presentó todas las fases de desarrollo, sin embargo la fase exponencial fue apreciable hasta 24 horas posteriores del inicio del cultivo, lo cual en condiciones de fermentación de co-cultivo puede ser una desventaja para el crecimiento por parte de la bacteria. Sin embargo esta especie fue seleccionada ya que ha sido reportada por numerosos estudios de interacción levadura-bacteria.

Como resultado de esta primera etapa, se seleccionaron 7 bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Weissella* (tabla 3). Cabe señalar que los tres primeros ya han sido reportados en estudios de interacción levadura-bacteria [13, 16, 39], por lo que en caso de *Weissella* es posible que tras evaluaciones posteriores sea candidato para estudios de interacción.

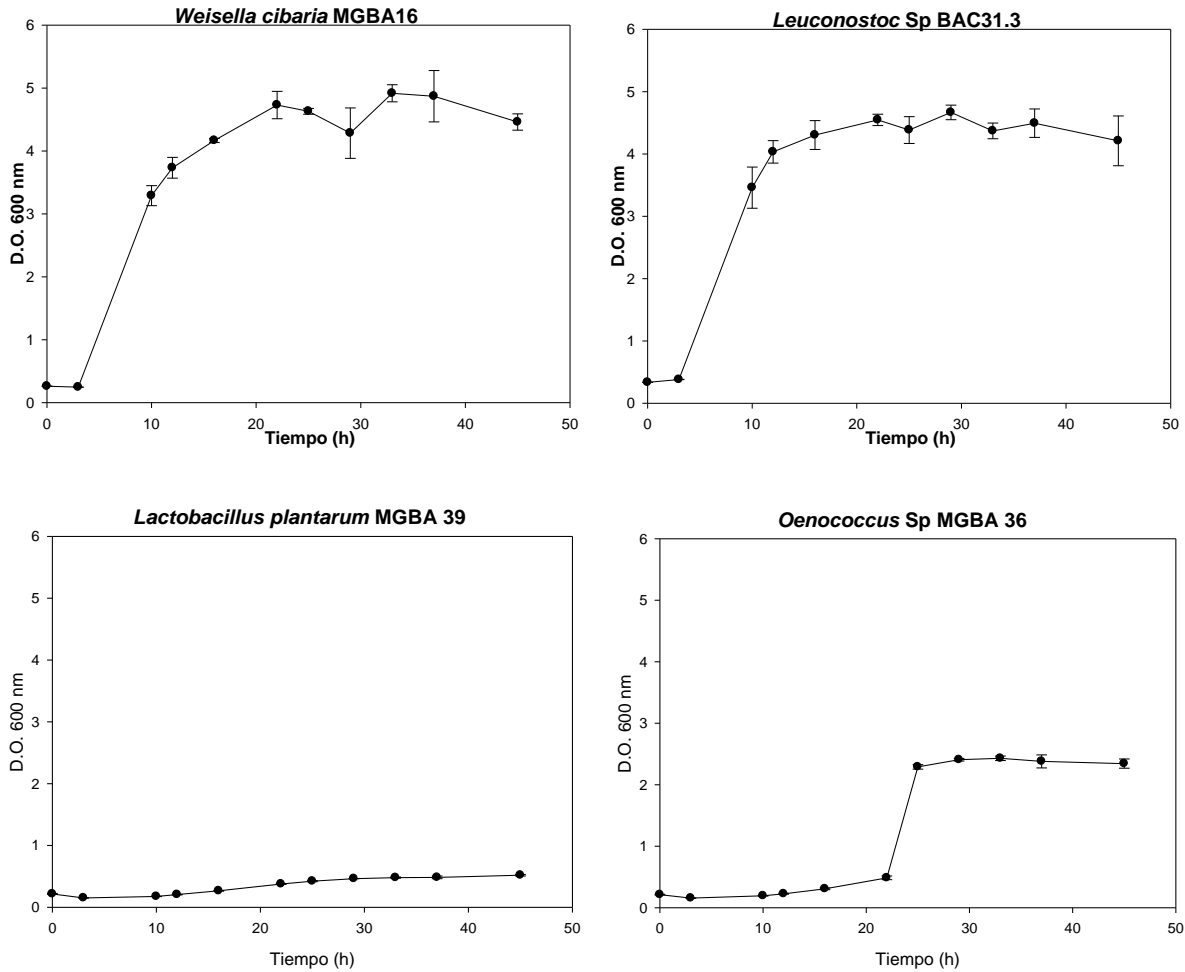


Figura 2. Cinéticas de crecimiento de bacterias ácido lácticas *Weissella cibaria* MGBA 16, *Leuconostoc* Sp BAC 31.3, *Lactobacillus plantarum* MGBA 39 y *Oenococcus* Sp MGBA 36; con diferentes comportamientos de desarrollo.

Tabla 3. Selección de bacterias por desarrollo celular y condiciones de estrés

Género	Especie	Código	Procedente	Selección por desarrollo	Tolerancia a etanol y osmolaridad
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	MGBA39	Mezcal		
		BAC29.6	Tejuino	✓	
		BAC30.5	Tejuino	✓	
		BAC30.7	Tejuino	✓	✓
	<i>fermentum</i>	FCT 40	Cacao		
		BAC30.1	Tejuino	✓	✓
<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	MGBA9	Mezcal		

	<i>pseudomesenteroides</i>	MGBA10	Mezcal		
		FCT35	Cacao		
	<i>citreum</i>	BAC47.5	Tejuino		
	Sp	BAC31.3	Tejuino	✓	✓
<i>Pediococcus</i>	<i>acidilactici</i>	FCT48	Cacao		
<i>Oenococcus</i>	Sp	MGBA36	Mezcal	✓	✓
<i>Weissella</i>	<i>cibaria</i>	MGBA16	Mezcal	✓	✓
		BAC48.1	Tejuino		
	<i>paramesenteroides</i>	MGBA26	Mezcal		
		MGBA17	Mezcal		

8.1.2. Selección de bacterias tolerantes a etanol y osmolaridad

Para esta etapa de selección, 5 diferentes cepas de bacterias fueron sometidas a condiciones de estrés por etanol y osmolaridad (tabla 3), para evaluar su resistencia a los niveles 6, 12 y 18% v/v de etanol y 10, 15 y 20°Brix, similares a las del jugo de agave [57]. Como resultado de este análisis únicamente 3 bacterias fueron resistentes a etanol y osmolaridad. En el caso de *Lactobacillus plantarum* MGBA30.7 se muestra que tiene la facultad de desarrollarse en presencia del 6% v/v de etanol (figura 3) con retraso del inicio del crecimiento de 10 horas aproximadamente, sin embargo su comportamiento fue similar al testigo donde claramente pueden observarse todas las fases de desarrollo microbiano. En contraste a las concentraciones del 12% y 18% v/v de etanol donde no se observó crecimiento. Por otra parte en el análisis de la influencia de la osmolaridad, se observa que esta bacteria tiene la capacidad de desarrollarse en concentraciones de 10, 15 y 20°Brix, sin embargo con la combinación del 12% etanol y 15° Brix no hubo desarrollo.

En el ensayo de *Leuconostoc* Sp BAC31.3 la cinética de crecimiento (figura 3) en presencia de etanol al 6% difiere al testigo posterior a la fase exponencial, no obstante la densidad celular no muestra una diferencia significativa al final del periodo de análisis a las 52 horas, a diferencia del 12% y 18% de etanol donde se observa un desarrollo limitado. Por otra parte en el análisis de osmotolerancia (figura 3), se observa que el crecimiento en los 3 niveles de concentración es superior al testigo, sin embargo no se presentó una diferencia entre estos niveles de concentración, en contraste, la combinación de etanol y azúcares mostró un menor crecimiento en comparación al testigo.

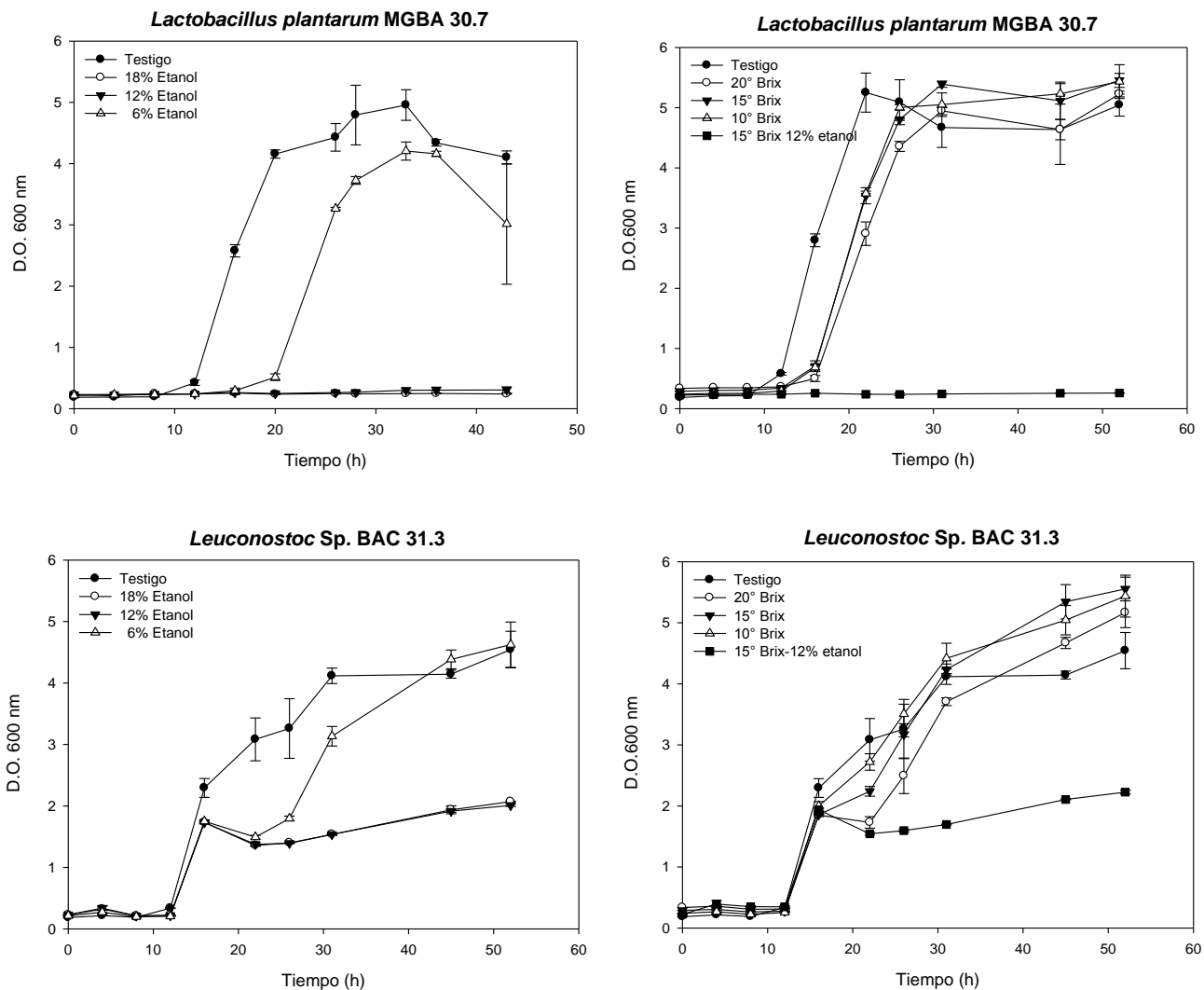


Figura 3. Tolerancia a etanol y osmolaridad con *L. plantarum* MGBA 30.7 y *Leuconostoc* Sp MGBA 31.3.

En el caso de la última bacteria seleccionada *Weissella cibaria* MGBA16, los resultados del análisis de tolerancia a etanol (figura 4) revelan que esta cepa tiene la facultad de desarrollarse con un 6% de etanol, sin embargo su crecimiento es menor en comparación al testigo y superior a los niveles 12% y 18%. Por otra parte este microorganismo presentó un retraso en la fase exponencial de 4 horas en los niveles 10, 15 y 20° Brix (figura 4), no obstante su concentración celular no tuvo diferencia entre estos niveles y el testigo.

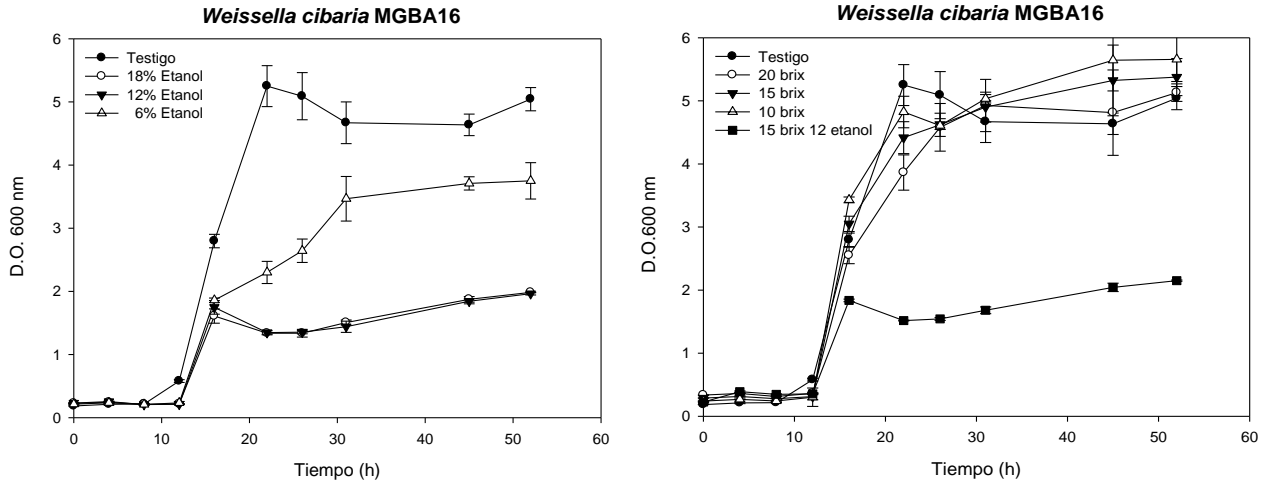


Figura 4. Análisis de tolerancia a etanol y osmolaridad con *W. cibaria* MGBA 16.

En contraste a los resultados obtenidos con las 3 primeras bacterias seleccionadas (figura 3 y 4), *Lactobacillus fermentum* BAC30.1 (figura 5) no mostró diferencia significativa entre el crecimiento del testigo y en presencia de etanol al 6%. No obstante en el caso de la osmolaridad el crecimiento fue prácticamente nulo con respecto al testigo en 10, 15 y 20° Brix así como la combinación de etanol 12% y osmolaridad 15° Brix (figura 5). Finalmente *Oenococcus* Sp MGBA36 no tuvo diferencia significativa en crecimiento en presencia de etanol al 6% con respecto al testigo (figura 6), sin embargo el crecimiento de ambos fue prácticamente nulo. Por otra parte, en la influencia de la osmolaridad no hubo diferencia significativa entre los niveles de concentración de azúcar y el testigo, teniendo un comportamiento de crecimiento nulo de manera uniforme.

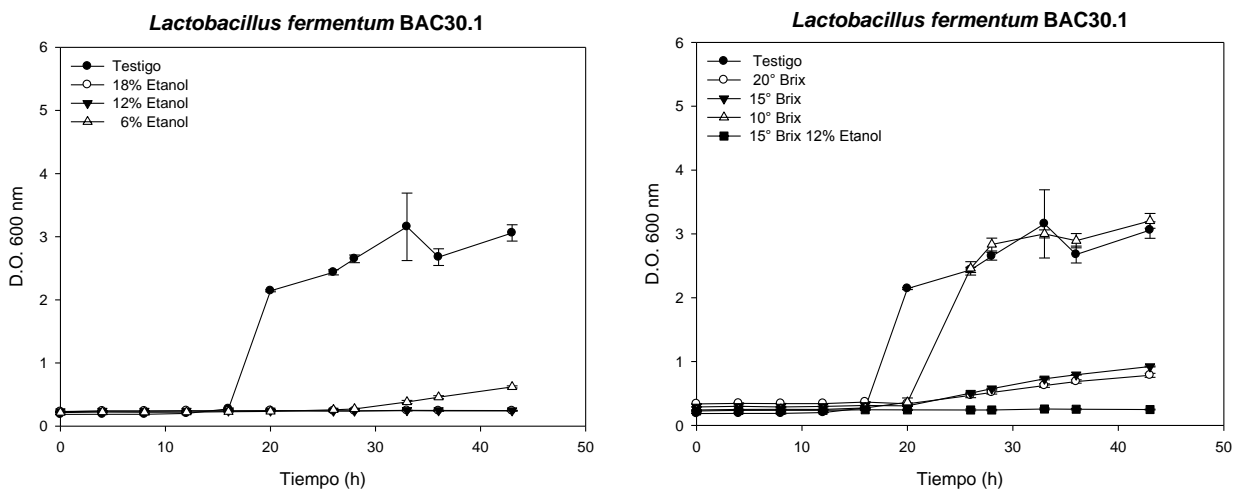


Figura 5. Tolerancia a etanol y osmolaridad con *L. fermentum* BAC 30.1.

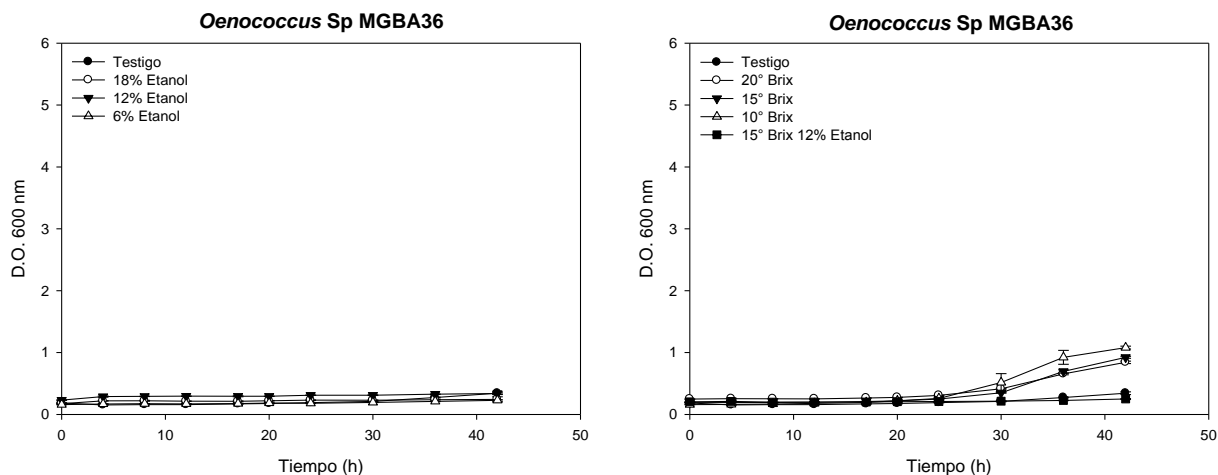


Figura 6. Tolerancia a etanol y osmolaridad con *Oenococcus Sp MGBA 36*.

La presencia y selección de bacterias ácido lácticas en el medio de fermentación depende principalmente de la concentración de diversos metabolitos provenientes de la fermentación alcohólica como ácidos orgánicos y etanol [10]. La concentración de etanol juega un papel muy importante en el desarrollo de las bacterias ácido lácticas, debido a que este compuesto altera la membrana celular, por lo que únicamente se desarrollan aquellas tolerantes a la concentración del mismo. Se ha reportado que al término de la fermentación alcohólica es posible encontrar bacterias pertenecientes al género *Oenococcus*, las cuales son resistentes a la presencia de etanol en el medio, no obstante en los estudios realizados en este trabajo se observa que no hubo crecimiento por parte de la bacteria *Oenococcus Sp MGBA36* en los diferentes niveles de concentración de etanol, contrastando este resultado con reportes previos [10]. Este resultado pone en evidencia las características específicas de cada cepa perteneciente a una misma especie. Por otra parte los resultados obtenidos revelan que las especies pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Weissella* fueron capaces de desarrollarse en presencia de etanol y azúcares, en condiciones similares a las del proceso de elaboración de Tequila. Con esta información es posible seleccionar aquellas bacterias capaces de desarrollarse en una fermentación alcohólica de jugo de agave para poder estudiar en una segunda etapa la interacción de estas bacterias con levaduras para poder identificar posibles co-cultivos de interés.

8.2. Interacción bacteria levadura con base a desarrollo celular.

De las 3 bacterias seleccionadas por ser tolerantes a etanol y osmolaridad (tabla 4), se procedió a realizar pruebas de interacción bacteria-levadura con 3 especies de levadura, *Saccharomyces cerevisiae* AR5, *Pichia kluyveri* GRO3 y *Kluyveromyces marxianus* SLP1; las cuales han mostrado

tener altos rendimientos de producción de etanol y compuestos volátiles en el proceso fermentativo del tequila [27, 57].

Tabla 4. Bacterias seleccionadas para prueba de interacción con levaduras

Género	Especie	Código	Procedente	Selección por desarrollo	Tolerancia a etanol y osmolaridad	Interacción Ufc/ml
Lactobacillus	<i>plantarum</i>	MGBA39	Mezcal			
		BAC29.6	Tejuino	✓		
		BAC30.5	Tejuino	✓		
		BAC30.7	Tejuino	✓	✓	✓
	<i>fermentum</i>	FCT 40	Cacao			
		BAC30.1	Tejuino	✓	✓	
Leuconostoc	<i>mesenteroides</i>	MGBA9	Mezcal			
	<i>Pseudomesenteroides</i>	MGBA10	Mezcal			
		FCT35	Cacao			
	<i>citreum</i>	BAC47.5	Tejuino			
	Sp	BAC31.3	Tejuino	✓	✓	✓
Pediococcus	<i>acidilactici</i>	FCT48	Cacao			
Oenococcus	Sp	MGBA36	Mezcal	✓	✓	
Weissella	<i>cibaria</i>	MGBA16	Mezcal	✓	✓	✓
		BAC48.1	Tejuino			
	<i>paramesenteroides</i>	MGBA26	Mezcal			
		MGBA17	Mezcal			

8.2.1. Interacciones con *Saccharomyces cerevisiae* AR5

En las interacciones realizadas con *Saccharomyces cerevisiae* AR5, es posible observar diferentes comportamientos de desarrollo entre cada interacción, cabe señalar que en este estudio únicamente se evaluó el crecimiento de cada especie.

En la interacción *S. cerevisiae* AR5/*W. cibaria* MGBA 16 (figura 7a) se puede observar que durante los primeros tiempos de la fermentación, la fase exponencial de la bacteria y de la levadura fueron similares con respecto al testigo de cada una de ellas, indicando que no hay una inhibición en esta fase de desarrollo, no obstante en el estado estacionario de ambas especies se presenta una diferencia significativa entre el cultivo puro y de interacción, posiblemente originado por competencia por el sustrato, sin embargo el cultivo puro de la bacteria revela que su crecimiento posee la tendencia a crecer en mayor medida, lo cual en el co-cultivo esta característica posiblemente tuvo una incidencia en la inhibición de la levadura. Particularmente

en el caso de la levadura en co-cultivo, a las 36h no se observó crecimiento en caja en la dilución 10^{-6} , lo que indica que la población celular disminuyó a este tiempo de la cinética con respecto al cultivo puro. Este comportamiento es posible que esté asociado a un efecto de inhibición entre especies, revelando una relación negativa entre las mismas.

Por otra parte, el co-cultivo *S. cerevisiae* AR5 /*L. plantarum*. BAC 30.7 presentó una marcada diferencia con respecto al cultivo puro (figura 7b), donde el desarrollo de la bacteria en co-cultivo muestra un desfase del crecimiento durante la etapa exponencial alcanzando una población similar al cultivo puro hasta las 36h, no obstante este comportamiento limita el desarrollo de la levadura en interacción a las 36h, por lo que la relación resultante del co-cultivo es negativa desde el punto de vista del crecimiento.

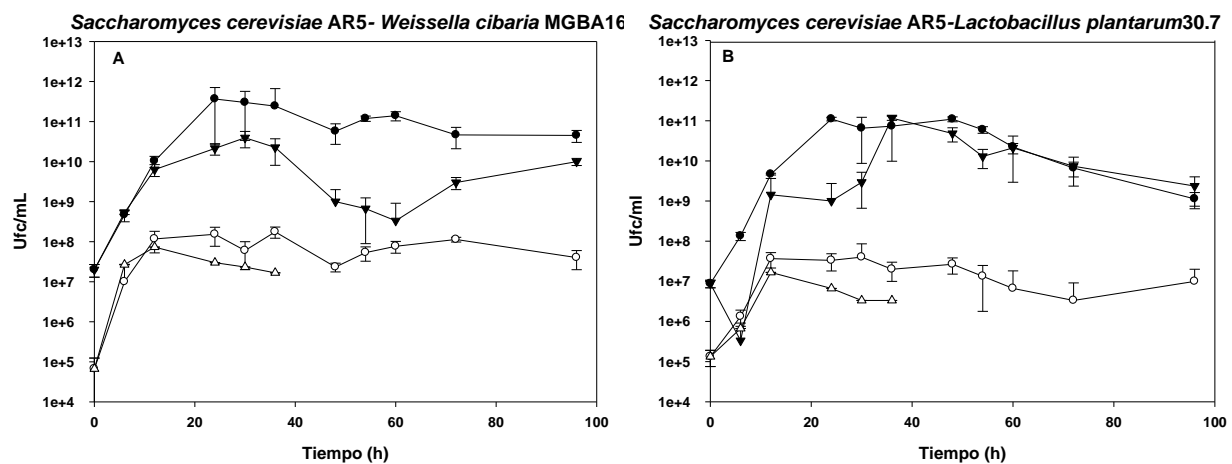


Figura 7. Interacción levadura-bacteria con *S. cerevisiae* AR5/*W. cibaria* MGBA 16 y *S. cerevisiae* AR5/*L. plantarum*. BAC 30.7 Bacteria cultivo puro (●), levadura cultivo puro (○), bacteria en co-cultivo (▼) y levadura en co-cultivo (△).

A diferencia de los comportamientos anteriores, la interacción *S. cerevisiae* AR5/*Leuconostoc* Sp. BAC 31.3 (figura 8) muestra un desarrollo muy similar por parte de la levadura en interacción con respecto al testigo hasta las 50h, por lo que en comparación de los co-cultivos antes descritos, este es el de mejor desarrollo de la levadura, sin embargo en caso de la bacteria, su crecimiento es similar durante la fase exponencial, posterior a esta fase su comportamiento mantiene una conducta errática hasta el término de la fermentación. Este fenómeno de crecimiento fue observado en el proceso de elaboración de cachaça, lo cual indica que la relación entre estas especies es negativa en función del crecimiento [16]. De acuerdo a las características de crecimiento presentadas por parte de la levadura en interacción, este co-cultivo fue seleccionado para estudios posteriores, debido a que en un proceso de fermentación alcohólica el organismo de mayor interés es la levadura.

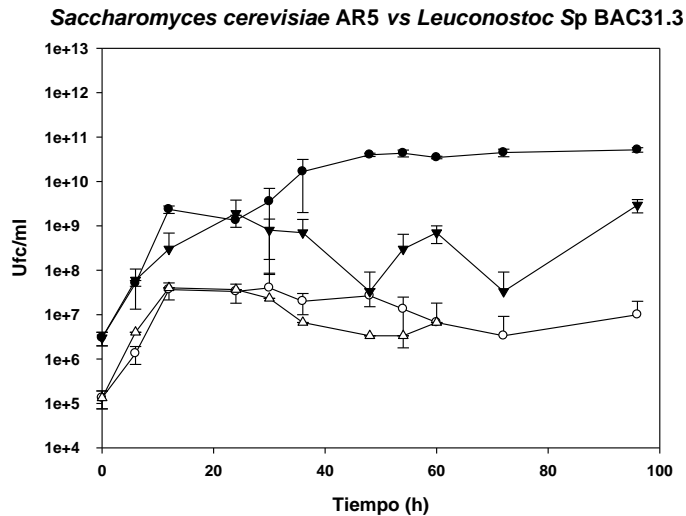


Figura 8. Co- cultivo *S. cerevisiae* AR5/ *Leuconostoc* Sp. BAC 31.3 Bacteria cultivo puro (●), levadura cultivo puro (○), bacteria en co-cultivo (▼) y levadura en co-cultivo (△).

8.2.2. Interacciones con *Kluyveromyces marxianus* SLP1

La interacción *K. marxianus* SLP1/*W. cibaria* MGBA 16 (figura 9A), muestra un desarrollo similar en la fase exponencial de cada especie con respecto al cultivo puro, en caso particular de la bacteria su comportamiento es estrechamente similar al testigo, ya que se puede observar que en desarrollo celular alcanzan el mismo nivel en la fase estacionaria. Por otra parte la levadura en interacción se ve afectada desde las 12 horas registrando un nivel inferior en población en contraste al alcanzado por el cultivo puro. Este fenómeno puede estar asociado a una competencia por sustrato, ya que la disminución del crecimiento de la levadura se presenta durante la fase de crecimiento exponencial de la bacteria. Por otra parte, el comportamiento del co-cultivo *K. marxianus* SLP1/ *L. plantarum*. BAC 30.7 (Figura 9B), muestra un desarrollo similar de la bacteria en el cultivo puro y co-cultivo. Sin embargo, en este ensayo el comportamiento de la levadura difiere desde el tiempo 4h con respecto al cultivo puro, donde la población es significativamente inferior, poniendo en evidencia que la bacteria ejerce un efecto de inhibición del crecimiento sobre la levadura.

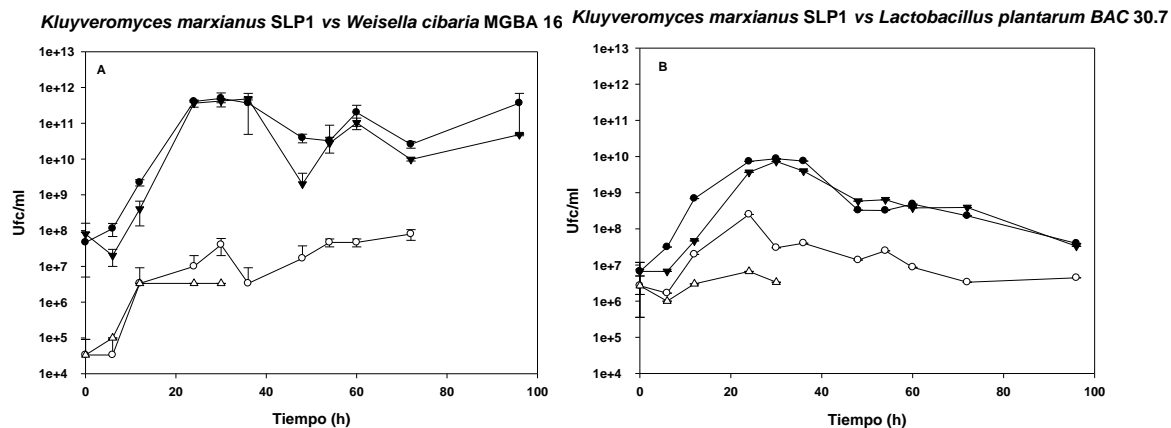


Figura 9. Co-cultivos de interacción *K. marxianus* SLP1/*W. cibaria* MGBA 16 y *K. marxianus* SLP1/*L. plantarum*. BAC 30.7. Bacteria cultivo puro (●), levadura cultivo puro (○), bacteria en co-cultivo (▼) y levadura en co-cultivo (△).

En contraste a los resultados previamente descritos, en el co-cultivo de *K. marxianus* SLP1/*Leuconostoc* Sp. BAC 31.3 (figura 10), el comportamiento de la levadura muestra un retraso en la fase exponencial de 4 horas y un menor desarrollo celular, además se puede apreciar que el crecimiento se detuvo hasta las 32h a diferencia a los co-cultivos con otras especies bacterianas. Por otra parte el desarrollo de *Leuconostoc* Sp BAC 31.3 es similar únicamente en la fase exponencial, posterior a esta fase, la población celular disminuye significativamente. En similitud a los ensayos con *Saccharomyces cerevisiae* AR5, se seleccionó el co-cultivo donde la levadura tuvo un periodo de desarrollo mayor, debido a esto la interacción *K. marxianus* SLP1/*Leuconostoc* Sp. BAC 31.3 fue candidata a evaluar en estudios posteriores.

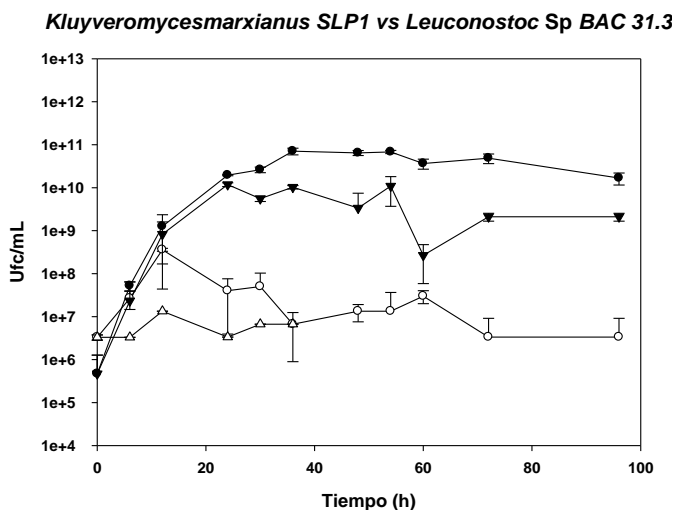


Figura 10. Co-cultivo de interacción *K. marxianus* SLP1/*Leuconostoc* Sp. BAC 31.3. Bacteria cultivo puro (●), levadura cultivo puro (○), bacteria en co-cultivo (▼) y levadura en co-cultivo (△).

8.2.3. Interacciones con *Pichia kluyveri* GRO3

En las interacciones realizadas con esta levadura, pudo observarse de manera general que el comportamiento de cada una de las bacterias fue muy similar al testigo. En el caso de la interacción *P. kluyveri* GRO3/*L. plantarum* BAC 30.7 (figura 11 A), el comportamiento por parte de la bacteria es estrechamente similar al testigo, sin embargo por parte de la levadura se observa que a partir del tiempo 8h la población celular es significativamente inferior al testigo y su desarrollo se detuvo en el tiempo 32h. Por otra parte el ensayo con *P. kluyveri* GRO3/*Leuconostoc* Sp. BAC 31.3 (figura 11 B), muestra un comportamiento de la cinética de crecimiento bacteriano similar al cultivo con *Lactobacillus plantarum* BAC 30.7, sin embargo en la levadura su desarrollo se detuvo a las 8 horas, revelando así una relación negativa entre estos dos microorganismos.

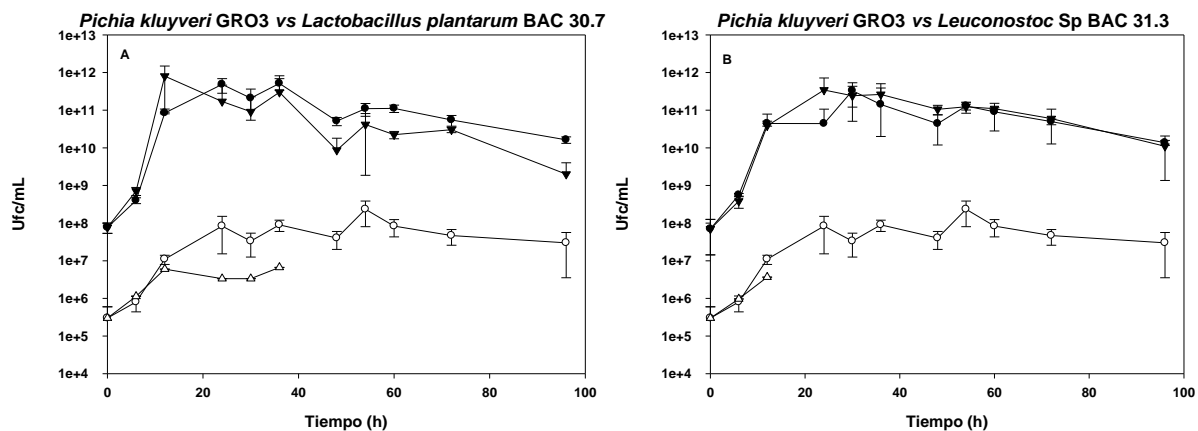


Figura 11. Co-cultivo *P. kluyveri* GRO3/*L. plantarum* BAC 30.7 y *P. kluyveri* GRO3/*Leuconostoc* Sp. BAC 31.3. Bacteria cultivo puro (●), levadura cultivo puro (○), bacteria en co-cultivo (▼) y levadura en co-cultivo (△).

A diferencia de los dos cultivos anteriores, el ensayo de *P. kluyveri* GRO3/*W. cibaria* MGBA 16 (figura 12), muestra en su cinética bacteriana un comportamiento significativamente uniforme hasta el tiempo 44h lo cual revela que es indiferente la presencia de *W. cibaria* MGBA 16 dentro del mismo medio de fermentación, adicionalmente, por parte de la levadura se observa un mejor comportamiento en contraste a los resultados de los co-cultivos previamente descritos, debido a que en este ensayo es posible observar todas las fases de desarrollo a diferencia de los cultivos anteriores en los que su crecimiento terminaba entre las 8 y 30 horas. Con estos resultados es posible seleccionar el co-cultivo con *Pichia kluyveri* GRO3, permitiendo así analizar su comportamiento en ensayos posteriores por su interacción parcialmente neutra.

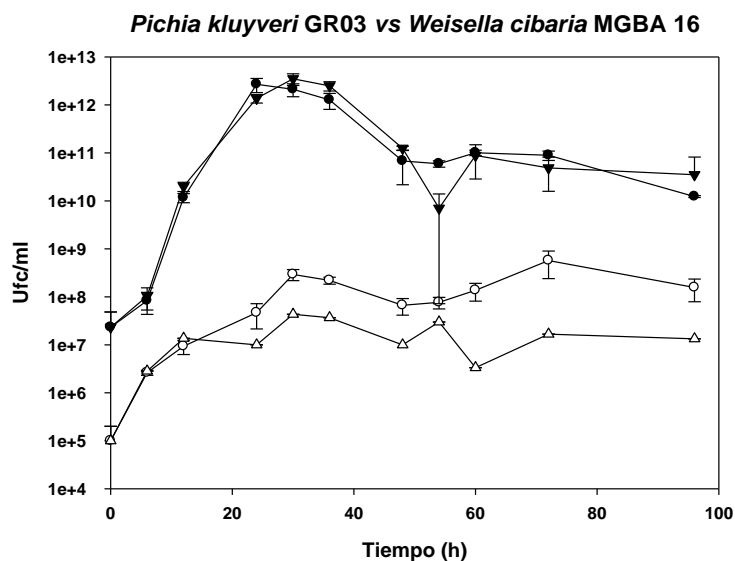


Figura 12. Co-cultivo *P. kluyveri* GRO3/ *W. cibaria* MGBA 16. Bacteria cultivo puro (●), levadura cultivo puro (○), bacteria en co-cultivo (▼) y levadura en co-cultivo (Δ).

En la primera etapa de selección de bacterias ácido lácticas, fue posible evaluar el comportamiento de las bacterias bajo condiciones de estrés por osmolaridad y presencia de etanol, similares al inicio y evolución de una fermentación alcohólica. Debido a esto, fueron seleccionadas únicamente aquellas resistentes a tales condiciones de estrés, permitiendo así cultivarlas en estudios posteriores de fermentación.

Con las bacterias candidatas para su cultivo en fermentación alcohólica, se realizaron estudios de interacción levadura-bacteria. Cabe señalar que para este análisis no fue utilizada la técnica en solido de “doble película”[11], debido a que en estudios recientes esta técnica registra diferencias significativas en contraste a las realizadas en medio líquido [41]. El análisis de interacción se realizó en medio líquido, cultivando simultáneamente las especies de bacteria y levadura permitiendo así evaluar el desempeño de cada especie en el mismo medio de fermentación.

Con esta técnica fue posible determinar la relación positiva, negativa y neutra de los co-cultivos levadura-bacteria en función del crecimiento como puede observarse en la tabla 5, donde 7 interacciones fueron consideradas como relaciones negativas en función del desarrollo celular. Por otra parte, solo 2 interacciones presentaron un comportamiento de interacción neutra al no revelar efectos de inhibición o promoción del crecimiento. Este análisis permite seleccionar co-cultivos de interés para analizar posteriormente su impacto en la composición volátil y rendimiento de etanol en el fermentado. No obstante, el estudio de compuestos de inhibición o promoción del crecimiento, pondrían en evidencia con mayor exactitud la interacción de estos

microorganismos, permitiendo clasificar en caso de interacciones negativas efectos de interacción antibiótica y amensalista o comensalismo y sinergismo en caso de interacciones positivas.

Tabla 5. Clasificación de relación microbiana levadura-bacteria

Interacción microbiana	
Neutra	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AR5- <i>Weissella cibaria</i> MGBA 16
	<i>Pichia kluyveri</i> GRO3- <i>Weissella cibaria</i> MGBA 16
Negativa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AR5- <i>Lactobacillus plantarum</i> BAC 30.7
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AR5- <i>Leuconostoc</i> Sp BAC 31.3
	<i>Kluyveromyces marxianus</i> SLP1- <i>Weissella cibaria</i> MGBA 16
	<i>Kluyveromyces marxianus</i> SLP1- <i>Lactobacillus plantarum</i> 30.7
	<i>Kluyveromyces marxianus</i> SLP1- <i>Leuconostoc</i> Sp BAC 31.3
	<i>Pichia kluyveri</i> GRO3- <i>Lactobacillus plantarum</i> BAC 30.7
	<i>Pichia kluyveri</i> GRO3- <i>Leuconostoc</i> Sp BAC 31.3

8.3. Evaluación del comportamiento de interacción en medio químicamente definido y jugo de agave

Con las 2 bacterias seleccionadas (Tabla 6) y las 3 levaduras se realizaron análisis de interacción en medio MRS y jugo de agave, evaluando la población celular con citometría de flujo y cromatografía de gases-líquidos para determinar el impacto de la composición volátil.

Tabla 6. Especies seleccionadas para interacción en medio químico y jugo de agave

Género	Especie	Código	Procedente	Interacción Ufc/ml	Interacción medio químico	Interacción jugo de agave
Lactobacillus	<i>plantarum</i>	MGBA39	Mezcal			
		BAC29.6	Tejuino			
		BAC30.5	Tejuino			
		BAC30.7	Tejuino	✓		
	<i>fermentum</i>	FCT 40	Cacao			
		BAC30.1	Tejuino			
Leuconostoc	<i>mesenteroides</i>	MGBA9	Mezcal			
	<i>Pseudomesenteroides</i>	MGBA10	Mezcal			
		FCT35	Cacao			
	<i>citreum</i>	BAC47.5	Tejuino			
	Sp	BAC31.3	Tejuino	✓	✓	✓
Pediococcus	<i>acidilactici</i>	FCT48	Cacao			
Oenococcus	Sp	MGBA36	Mezcal			
Weissella	<i>cibaria</i>	MGBA16	Mezcal	✓	✓	✓
		BAC48.1	Tejuino			
	<i>paramesenteroides</i>	MGBA26	Mezcal			
		MGBA17	Mezcal			

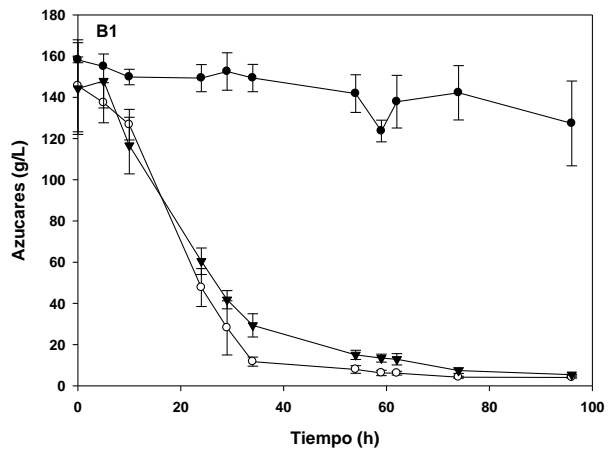
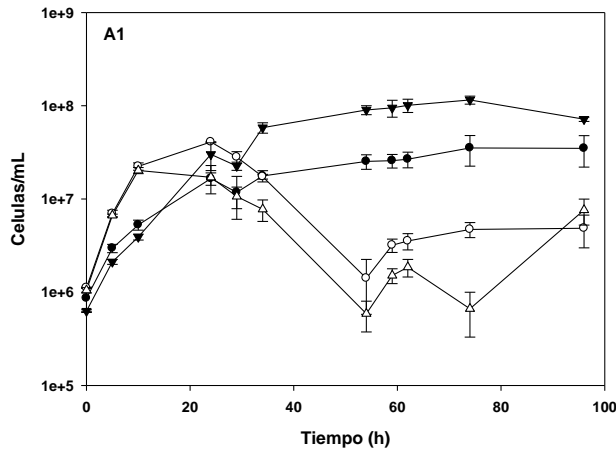
8.3.1. Interacción *Saccharomyces cerevisiae* AR5/*Leuconostoc* Sp BAC 31.3.

En la interacción *S. cerevisiae* AR5/ *Leuconostoc* Sp BAC 31.3, es posible observar que el desarrollo de la cinética de crecimiento de la bacteria y la levadura es similar al cultivo puro correspondiente (figura 13 A1), sin embargo no se alcanza la misma densidad celular en el ensayo de interacción. Es importante señalar que este comportamiento no está asociado a una competencia por sustrato (figura 13 B1) ya que la fuente de carbono se consume en su totalidad a las 96 horas en el co-cultivo y la fermentación realizada por la levadura en cultivo puro. Estos resultados revelan que la interacción de estas dos especies es aparentemente neutra en este medio de fermentación, en función del crecimiento y el consumo del sustrato. Por otra parte en

la fermentación con jugo de agave, el crecimiento de la levadura y la bacteria difiere al cultivo puro respectivo a partir del tiempo 24h (figura 13 A2), no obstante este fenómeno no está relacionado con una competencia por sustrato, debido a que el consumo de la fuente de carbono es similar durante todo el proceso con *Saccharomyces cerevisiae* AR5 y el co-cultivo (figura13 B2), adicionalmente ésta se consume a las 96 horas en los dos cultivos. Es importante señalar que en los dos medios de fermentación jugo de agave y caldo MRS, el consumo de sustrato es estrechamente similar en la levadura y el co-cultivo, adicionalmente se puede observar que el consumo por parte de la bacteria es reducido en los dos medios de fermentación, lo cual pone en evidencia que su consumo no origina una competencia con la levadura. Por otra parte, el crecimiento si se ve afectado por el medio de fermentación, principalmente en la bacteria que muestra un mayor crecimiento en caldo MRS que en el jugo de agave, lo cual puede estar asociado a la complejidad nutritiva e inhibidores del jugo de agave o la carencia de algún nutriente específico para su correcto desarrollo.

Saccharomyces cerevisiae AR5- *Leuconostoc* Sp BAC 31.3

Saccharomyces cerevisiae AR5-*Leuconostoc* Sp BAC 31.3



Saccharomyces cerevisiae AR5 - *Leuconostoc* Sp BAC 31.3

Saccharomyces cerevisiae-*Leuconostoc* Sp

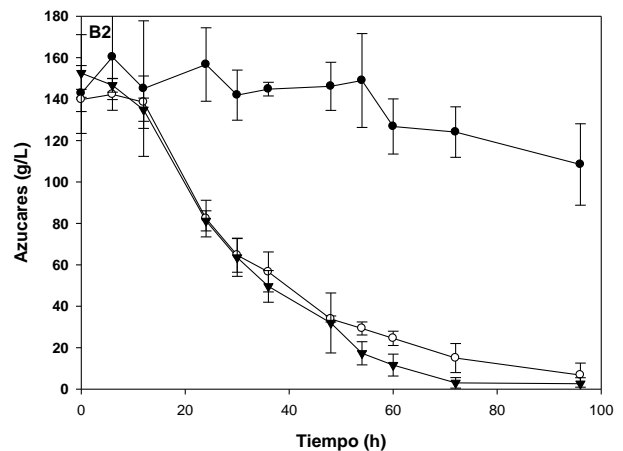
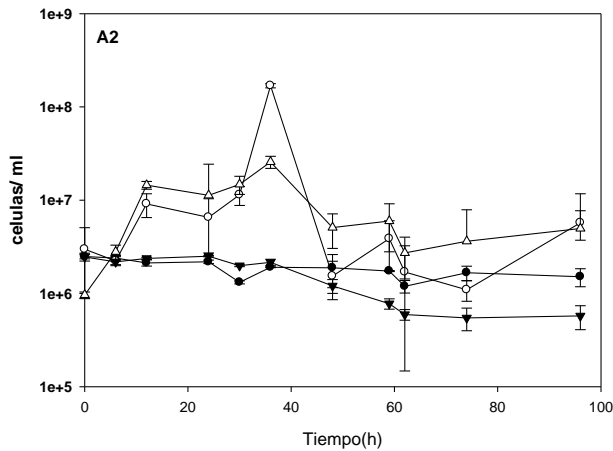


Figura 13. Ensayo de co-cultivo *S. cerevisiae* AR5/*Leuconostoc* Sp BAC 31.3. “1 medio químico”, “2 jugo de agave”. Evaluación de desarrollo celular “A” Bacteria cultivo puro (●), levadura cultivo puro (○), bacteria en co-cultivo (▼) y levadura en co-cultivo (Δ). Consumo de sustrato “B” bacteria cultivo puro (●), co-cultivo (▼) y levadura cultivo puro (○).

Por otra parte en el estudio de cromatografía (Tabla 7), el impacto de la interacción sobre el fermentado revela, que hay un aumento en la concentración de compuestos volátiles en el jugo de agave con el co-cultivo *S. cerevisiae* AR5/*Leuconostoc* Sp BAC 31.3, en comparación a la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* AR5 en cultivo puro. No obstante estos resultados contrastan con la fermentación en medio MRS, donde la producción de furfural, ácido málico y láctico fue significativamente mayor. De acuerdo con los resultados obtenidos en jugo de agave, es posible observar que como resultado de interacción hubo una mayor producción de compuestos volátiles y etanol. Esto concuerda con estudios recientes, donde se demuestra que el impacto de la interacción bacteria-levadura sobre el producto puede ser positivo independientemente a la relación entre estas especies [16].

Tabla 7. Análisis de compuestos volátiles, ácidos orgánicos y azúcares al final de la fermentación

Compuesto g L ⁻¹	Medio MRS		Jugo de agave	
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S.cerevisiae/L. Sp</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S.cerevisiae/L. Sp</i>
Acetaldehído	0.386 ^a	0.188	NC	0.526
Acetato de etilo	0.180 ^a	0.087	NC	0.014
Metanol	NC	NC	1.477	1.714
Etanol	51.83	45.42	68.44	77.18
Etil propionato	ND	ND	ND	ND
Butirato de etilo	NC	ND	ND	ND
1-Propanol	0.177 ^a	0.082	0.340	0.037
1-Butanol			ND	ND
Isobutanol	.141 ^a	.079	.019	0.024
Hexanoato de etilo				0.015
Acetato de isopentilo	NC	NC	NC	ND
Acetato de isoamilo	.012	.017	NC	NC
Alcohol isoamilico	.150 ^a	.086	NC	ND
Lactato de etilo	ND	NC	NC	NC
Octanoato de etilo	NC	NC	NC	NC
Furfural	2.332	5.985 ^a	0.535	0.618
Alcohol furfurilico	NC	NC	NC	NC
Dodecanoato de etilo	NC	NC	NC	NC

Fenil acetato	NC	NC	NC	NC
Ácido cítrico				
Ácido tartárico				
Ácido vanílico	1.66	1.79		
Ácido málico	1.50	0.65 ^a		
Ácido succínico	0.55	0.38		
Ácido láctico	0.37	12.52 ^a	3.56	3.29
Ácido fórmico	0.07	0.00		
Ácido acético	3.38	3.41	0.38	0.32
Ácido propiónico	4.04	4.51	0.08	0.07
Glucosa	0.00	NC	0.02	0.03
Xilosa	0.22	0.26		
Fructosa	NC	NC	0.09	0.08
Glicerol	0.23	0.16	0.23	0.22

El valor medio es resultado del ensayo por triplicado

*^a Diferencia significativa valor-P .05

Método LSD 95% confianza

ND: No detectable NC: No cuantificable

8.3.2. Interacción *Kluyveromyces marxianus* SLP1/*Leuconostoc* Sp BAC 31.3.

El co-cultivo *Kluyveromyces marxianus* SLP1/*Leuconostoc* Sp BAC 31.3 (figura 14 A1) muestra un comportamiento diferente por parte de la levadura con respecto al cultivo puro al término de la fase exponencial, donde es apreciable un menor desarrollo celular durante la fase estacionaria. Este fenómeno puede estar relacionado a un efecto de inhibición ejercido por la bacteria, ya que el consumo de sustrato se ve contrastado desde el tiempo 28h con una tasa inferior al cultivo puro (figura 14 B1). A diferencia del comportamiento observado en el medio químicamente definido, en la fermentación con jugo de agave es posible observar que el crecimiento de cada una de las especies difiere del cultivo puro respectivo (figura 14 A2), cabe señalar que en el caso de la bacteria registra un incremento en la población celular en el tiempo 28h, dicho comportamiento puede estar asociado a la adaptación de la especie en estas un mayor consumo de la fuente de carbono al tiempo 28h, el cual coincide con el incremento de la población celular por parte de la bacteria en interacción. Este fenómeno no afecta el crecimiento y consumo de sustrato por parte de la levadura, debido a que el cultivo puro y co-cultivo de la levadura mantienen un comportamiento similar en las dos condiciones hasta el final del proceso (Figura 14 B2).

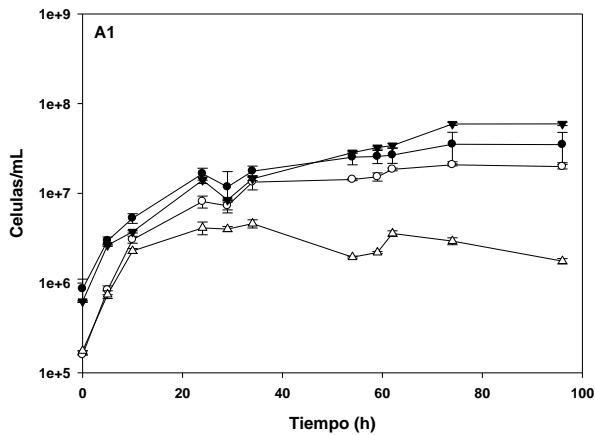
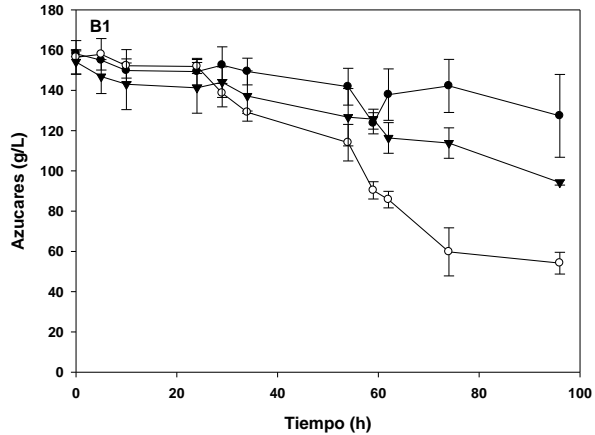
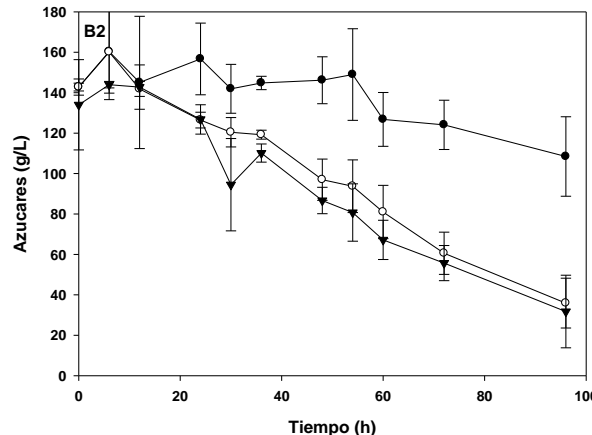
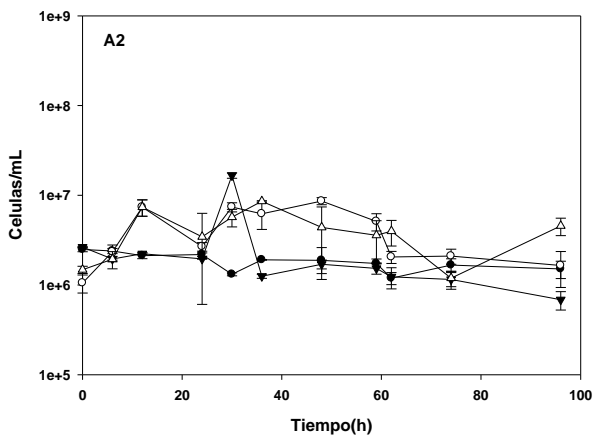
*Kluyveromyces marxianus* SLP1- *Leuconostoc* Sp BAC 31.3*Kluyveromyces marxianus* SLP1- *Leuconostoc* Sp BAC 31.3

Figura 14. Ensayo de co-cultivo *Kluyveromyces marxianus* SLP1/*Leuconostoc* Sp BAC 31.3. “1 medio químico”, “2 jugo de agave”. Evaluación de desarrollo celular “A” Bacteria cultivo puro (●), levadura cultivo puro (○), bacteria en co-cultivo (▼) y levadura en co-cultivo (Δ). Consumo de sustrato “B” bacteria cultivo puro (●), co-cultivo (▼) y levadura cultivo puro (○).

Por otra parte el análisis de cromatografía (Tabla 8), muestra que hay un incremento en la producción de acetato de etilo, isobutanol y fenil acetato en el co-cultivo *Kluyveromyces marxianus* SLP1/*Leuconostoc* Sp BAC 31.3 en jugo de agave, a diferencia de los índices obtenidos en la fermentación con cultivo puro de *Kluyveromyces marxianus* SLP1. Estos resultados contrastan con los índices registrados en la fermentación del medio MRS, donde hubo mayor producción de furfural y ácido láctico. El incremento de la producción de compuestos volátiles es un fenómeno que ha sido registrado en otros estudios, principalmente en vino, los cuales tienen un impacto positivo en el fermentado por el aporte de las notas aromáticas propias de cada compuesto [37, 38].

Tabla 4. Análisis de compuestos volátiles, ácidos orgánicos y azúcares al final de la fermentación

Compuesto g L ⁻¹	Medio MRS		Jugo de agave	
	<i>K. marxianus</i>	<i>K. marxianus</i> /L. Sp	<i>K. marxianus</i>	<i>K. marxianus</i> /L. Sp
Acetaldehído	0.279	0.255	NC	NC
Acetato de etilo	0.232 ^a	0.100	0.135	0.262 ^a
Metanol	NC	NC	1.426	1.263
Etanol	40.71 ^a	14.6	42.14	47.44
Etil propionato	ND	ND	NC	ND
Butirato de etilo	ND	ND	ND	ND
1-Propanol	0.129 ^a	0.014	0.045	0.048
1-Butanol	ND	ND	ND	ND
Isobutanol	0.255 ^a	0.076	NC	0.018
Hexanoato de etilo				
Acetato de isopentilo	NC	ND	ND	ND
Acetato de isoamilo	NC	NC	ND	ND
Alcohol isoamilico	0.170 ^a	0.049	ND	ND
Lactato de etilo	ND	0.066	NC	ND
Octanoato de etilo	NC	ND	0.056	0.060
Furfural	4.841	6.478 ^a	0.946	0.762
Alcohol furfurilico	NC	NC	NC	ND
Dodecanoato de etilo	NC	NC	NC	NC
Fenil acetato	0.020	NC	NC	.002
Ácido cítrico				
Ácido tartarico				
Ácido vanílico	1.35	1.69 ^a	ND	ND
Ácido málico	0.85	0.87	ND	ND
Ácido succínico	1.57 ^a	0.35	ND	ND
Ácido láctico	0.24	17.72 ^a	3.31 ^a	2.19
Ácido fórmico	0.04	NC	ND	ND
Ácido acético	3.84	3.78	0.42 ^a	0.22
Ácido propionico	4.01	4.34	0.09 ^a	0.05
Glucosa	0.06	0.18 ^a	ND	ND
Xilosa	4.09	8.26 ^a	ND	ND
Fructosa	ND	ND	2.94	1.43
Glicerol	0.33 ^a	0.10	0.24	0.11

El valor media es resultado del ensayo por triplicado

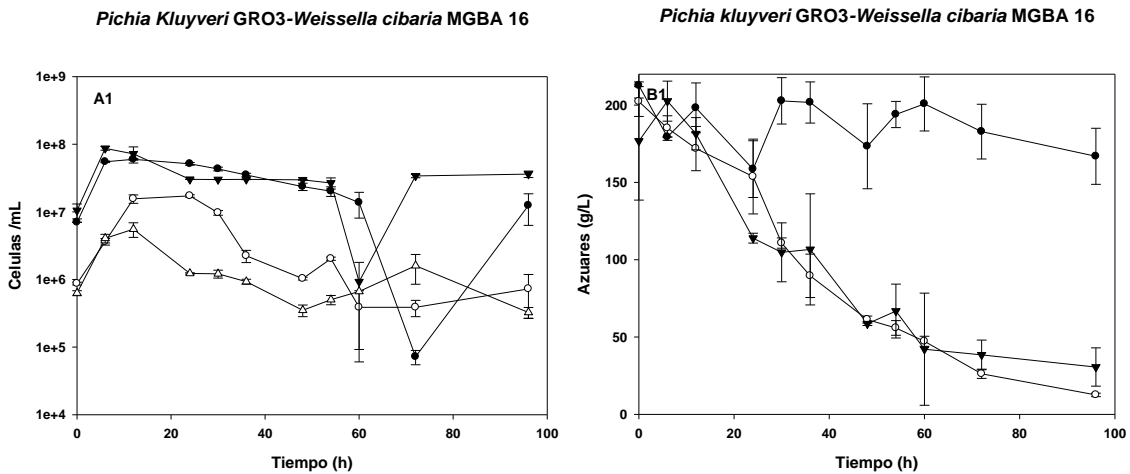
*^a Diferencia significativa valor-P .05

Método LSD 95% confianza

ND: No detectable NC: No cuantificable

8.3.3. Interacción *Pichia kluyveri* GRO3 /*Weissella cibaria* MGBA 16.

En la interacción *Pichia kluyveri* GRO3 /*Weissella cibaria* MGBA 16 en medio químicamente definido es posible observar un fenómeno de inhibición en *Pichia kluyveri* GRO3 por parte de *Weissella cibaria* MGBA 16 al tiempo 24h (figura 15 A1), posiblemente asociado a la competencia por sustrato, donde es apreciable que al tiempo 24h el consumo por parte de la bacteria aumenta en cultivo puro y co-cultivo, no obstante el consumo de la fuente de carbono se mantiene a una tasa similar durante el proceso de fermentación indicando que la actividad fermentativa de la levadura no ha sido negativamente afectada (figura 15 B2). En contraste a los resultados observados en el medio químicamente definido, el comportamiento de desarrollo por parte de la levadura es estrechamente similar al cultivo puro respectivo en la fermentación con jugo de agave (figura 15 A2), sin embargo el desarrollo por parte de *W. cibaria* MGBA 16 registra un incremento significativo en población celular a partir del tiempo 12h, manteniéndose hasta el término del proceso. Cabe señalar que este comportamiento difiere a lo observado en el medio químicamente definido ya que no hay un incremento en el consumo de la fuente de carbono por parte de la bacteria.



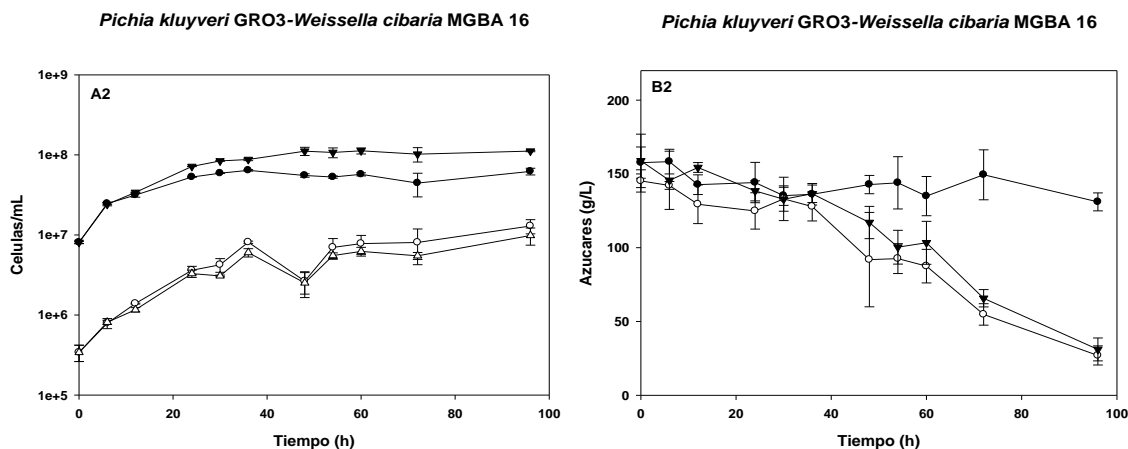


Figura 15. Ensayo de co-cultivo *Pichia kluyveri* GRO3 /*Weissella cibaria* MGBA 16. “1 medio químico”, “2 jugo de agave”. Evaluación de desarrollo celular “A” Bacteria cultivo puro (●), levadura cultivo puro (○), bacteria en co-cultivo (▼) y levadura en co-cultivo (△). Consumo de sustrato “B” bacteria cultivo puro (●), co-cultivo (▼) y levadura cultivo puro (○).

En el análisis de cromatografía (Tabla 9), se muestra que no hay una producción significativamente mayor de compuestos volátiles en la fermentación del co-cultivo *Pichia kluyveri* GRO3 /*Weissella cibaria* MGBA 16 en jugo de agave, cabe señalar que en la producción de etanol no hay diferencia significativa en la concentración entre cultivos, adicionalmente estos resultados coinciden con los niveles de producción de los compuestos antes mencionados en la fermentación con medio MRS, indicando que independientemente del medio MRS y jugo de agave la interacción no impacta de manera positiva la composición volátil del fermentado.

Tabla 8. Análisis de compuestos volátiles, ácidos orgánicos y azúcares al final de la fermentación

Compuesto g L ⁻¹	Medio MRS		Jugo de agave	
	<i>P. kluyveri</i>	<i>P. kluyveri</i> / <i>W. cibaria</i>	<i>P. kluyveri</i>	<i>P. kluyveri</i> / <i>W. cibaria</i>
Acetaldehído	0.518 ^a	0.251	0.326	0.393
Acetato de etilo	NC	NC	0.198	0.250
Metanol	0.020	0.022	1.530	1.858
Etanol	77.95	61.82	50.49	50.58
Etil propionato	ND	ND	ND	ND
Butirato de etilo	0.041	NC	NC	NC
1-Propanol	0.038 ^a	0.028	0.029	0.030
1-Butanol	ND	ND	ND	ND
Isobutanol	0.028 ^a	0.017	0.124	0.145
Hexanoato de etilo	NC	NC	0.015	ND
Acetato de isopentilo	NC	ND	NC	ND
Acetato de isoamilo	NC	NC	NC	NC

Alcohol isoamilico	NC	NC	NC	NC
Lactato de etilo	NC	0.131	ND	0.062
Octanoato de etilo	NC	NC	NC	NC
Furfural	NC	NC	NC	NC
Alcohol furfurilico	NC	0.007	NC	NC
Dodecanoato de etilo	NC	NC	NC	NC
Fenil acetato	0.003	NC	0.001	NC
Ácido citrico	ND	ND	ND	ND
Ácido tartarico	ND	ND	ND	ND
Ácido vanilico	1.59 ^a	1.00	0.63 ^a	0.16
Ácido málico	0.81	1.04 ^a	2.35	NC
Ácido succinico	1.12 ^a	0.18	27.54	24.44
Ácido láctico	0.09	23.40 ^a	5.62	12.79 ^a
Ácido formico	0.04	ND	0.38 ^a	0.04
Ácido acético	3.54	3.55	5.54 ^a	4.26
Ácido propionico	3.56	3.88 ^a	1.16	1.25
Glucosa	ND	NC	ND	ND
Xilosa	2.47	5.26 ^a	7.61	6.87
Fructosa	ND	ND	ND	ND
Glicerol	0.39 ^a	0.29	0.44 ^a	0.37

El valor media es resultado del ensayo por triplicado

*^a Diferencia significativa valor-P .05

Método LSD 95% confianza

ND: No detectable NC: No cuantificable

Como resultado del estudio de interacciones bacteria-levadura en fermentación con jugo de agave, se obtuvo una mayor producción de compuestos volátiles en la interacción *K. marxianus* SLP1 /*Leuconostoc* Sp BAC 31.3, los cuales tienen un impacto positivo sobre el fermentado, ya que aportan notas aromáticas [37]. Sin embargo éstos pueden variar en concentración según la selección de especies para fermentaciones en co-cultivo, ya que las interacciones pueden no ser compatibles para obtener un impacto positivo en el fermentado, como las interacciones *S.cerevisiae* AR5/*Leuconostoc* Sp BAC 31.3 y *P. kluyveri* GRO3/ *W. cibaria* MGBA 16 [39]. No obstante, para calificar el impacto de una interacción sobre el producto, el resultado no solo depende de los índices de producción de compuestos volátiles, ya que la reducción del periodo de fermentación y el rendimiento de etanol también son importantes.

Como resultado de este trabajo, es posible determinar el tipo de relación entre especies levadura-bacteria y el impacto de la composición volátil que se genera durante una fermentación en co-cultivo (tabla 10). Es importante señalar que hasta el momento este ha sido el primer acercamiento de investigación en el tema de interacción levadura-bacteria en jugo de agave, por lo que es necesario realizar más estudios de interacción, donde sea posible encontrar

candidatos potenciales para la elaboración de una bebida con mayor cantidad de compuestos volátiles, menor periodo de fermentación y alto rendimiento de etanol.

Tabla 6. Resultado e impacto de interacción en jugo de agave

Interacción microbiana	Producto	Microorganismos relacionados	Resultado de interacción	Impacto en el producto
Neutra	Jugo de agave	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AR5/ <i>Leuconostoc</i> Sp BAC 31.3	Aumento en la producción de compuestos volátiles y etanol	Positivo
Positiva	Jugo de agave	<i>Kluyveromyces marxianus</i> SLP1/ <i>Leuconostoc</i> Sp BAC 31.3	Incremento en la producción de acetato de etilo, isobutanol y fenil acetato	Positivo
Positiva	Jugo de agave	<i>Pichia kluyveri</i> GRO3 / <i>Weissella cibaria</i> MGBA 16	Sin aumento en la producción de compuestos volátiles y producción de etanol	Neutro

De acuerdo a los resultados de interacción obtenidos en este proyecto, es posible catalogar la interacción entre especies de levadura y bacteria, así como el impacto sobre el fermentado. De esta manera se puede observar que el impacto en una de las 3 interacciones *Pichia kluyveri* GRO3 /*Weissella cibaria* MGBA 16 es neutro ya que no hubo un incremento significativo en la producción de compuestos volátiles y producción de etanol. Este fenómeno ya ha sido reportado con anterioridad en el proceso de elaboración de Cachaça con interacción de *Saccharomyces cerevisiae* y *Lactococcus lactis*, teniendo como única diferencia a este estudio, la relación entre microorganismos donde está documentada una relación amensalista, lo cual pone en evidencia que el impacto sobre el producto no está asociado a la relación entre microorganismos [15]. Por otra parte, en este estudio las interacciones *Kluyveromyces marxianus* SLP1/*Leuconostoc* Sp BAC 31.3 y *Saccharomyces cerevisiae* AR5/*Leuconostoc* Sp BAC 31.3, muestran una similitud al impacto positivo sobre el producto con respecto a la interacción amensalista de *Saccharomyces cerevisiae* y *Lactobacillus fermentum* en Cachaça [16]. Sin embargo las especies involucradas en dicho proceso son diferentes a las utilizadas en este proyecto de investigación, lo cual revela que tanto el impacto como la relación no son afectados por un mismo par de especies levadura-bacteria.

Es de gran importancia resaltar que de acuerdo a los estudios de interacción reportados en diferentes fermentados, predomina el empleo de levaduras *Saccharomyces*, por lo que el

impacto en el producto utilizando otras especies podría revelar comportamientos de mayor interés, debido al aporte de compuestos volátiles que se producen principalmente por especies no-*Saccharomyces*.

9. Conclusion

Con este trabajo fue posible seleccionar bacterias ácido lácticas candidatas para realizar estudios de interacción levadura-bacteria en un proceso de fermentación, es importante señalar que las condiciones de alta concentración de azúcares y generación de etanol influyen en el desarrollo de estos microorganismos. Debido a esto, la selección de especies tuvo como base el crecimiento en estas condiciones, permitiendo así obtener candidatos potenciales para desarrollarse en un proceso de fermentación. Posteriormente las bacterias seleccionadas fueron sometidas a ensayos de interacción con 3 diferentes levaduras, donde fue posible evaluar el comportamiento de bacterias y levaduras en co-cultivos. Con este ensayo fueron clasificadas las interacciones en positiva, negativa y neutra en función del crecimiento.

Con la selección previa de bacterias y la clasificación de interacciones levadura-bacteria, fue posible desarrollar estudios de interacción en dos diferentes medios de fermentación. En una primera etapa de estudio, las interacciones fueron analizadas en medio MRS líquido, el cual fue enriquecido con fructosa para simular la concentración del jugo de agave, cabe señalar que este medio fue empleado para evaluar el comportamiento de las interacciones de forma repetible, ya que su composición no cambia en contraste al jugo de agave. Por otra parte los diferentes co-cultivos fueron analizados en jugo de agave, poniendo en evidencia los cambios originados por el medio de fermentación, así como el impacto particular de cada interacción sobre el fermentado.

De acuerdo a los análisis de cromatografía fue posible identificar co-cultivos de interés, en función del impacto sobre el producto, es decir, el incremento de la concentración de compuestos volátiles y producción de etanol. Sin embargo de los 3 co-cultivos solo la interacción *Kluyveromyces marxianus* SLP1/*Leuconostoc* Sp BAC 31.3 registró un aumento significativo en la producción de compuestos volátiles, por lo que el impacto sobre el fermentado fue positivo.

Es importante señalar que este proyecto fue el primer acercamiento al tema de interacciones levadura-bacteria en fermentación de jugo de agave, por lo que esta estrategia de evaluación puede ser útil para estudios posteriores de interacción. Adicionalmente el método de evaluación del crecimiento de los co-cultivos mediante citometría de flujo, permitió realizar mediciones precisas y más rápidas en el proceso de fermentación, en contraste a las técnicas reportadas en diversos estudios de interacción. Debido a esto, el proyecto de interacciones levadura-bacteria en jugo de agave, se convierte en el primer estudio en hacer uso de esta técnica en co-cultivos de fermentación.

10. Perspectivas

- Es necesario realizar análisis de moléculas quorum sensing para calificar puntualmente cada una de las interacciones bacteria-levadura.
- Es necesario realizar estudios a nivel bioreactor para evaluar a detalle el comportamiento de cada interacción en cuanto al desarrollo celular, producción de compuestos volátiles y producción de etanol.
- Es recomendable hacer estudios de escalamiento para evaluar el impacto de la interacción sobre el destilado en el proceso de elaboración del tequila.

11. Bibliografía

1. Youssef, M., et al., *Fermentation of cow milk and/or pea milk mixtures by different starter cultures: Physico-chemical and sensorial properties*. LWT-Food Science and Technology, 2016. **69**: p. 430-437.
2. Sørensen, K.I., et al., *Enhancing the Sweetness of Yoghurt through Metabolic Remodeling of Carbohydrate Metabolism in Streptococcus thermophilus and Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Applied and environmental microbiology, 2016. **82**(12): p. 3683-3692.
3. Gethins, L., et al., *Acquisition of the yeast Kluyveromyces marxianus from unpasteurised milk by a kefir grain enhances kefir quality*. FEMS Microbiology Letters, 2016. **363**(16): p. fnw165.
4. Chambers, P.J. and I.S. Pretorius, *Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research*. EMBO reports, 2010. **11**(12): p. 914-920.
5. Alañón, M., M. Pérez-Coello, and M. Marina, *Wine science in the metabolomics era*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2015. **74**: p. 1-20.
6. Alexandre, H., et al., *Saccharomyces cerevisiae–Oenococcus oeni interactions in wine: current knowledge and perspectives*. International journal of food microbiology, 2004. **93**(2): p. 141-154.
7. Antón-Díaz, M.J., et al., *Impact of different techniques involving contact with lees on the volatile composition of cider*. Food chemistry, 2016. **190**: p. 1116-1122.
8. Puertas, A.I., et al., *Lactobacillus sicerae sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from Spanish natural cider*. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2014. **64**(9): p. 2949-2955.
9. Liu, P.-T., et al., *The contribution of indigenous non-Saccharomyces wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation*. LWT-Food Science and Technology, 2016. **71**: p. 356-363.
10. Lonvaud-Funel, A., *Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine*, in *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. 1999, Springer. p. 317-331.
11. Comitini, F., et al., *Interactions between Saccharomyces cerevisiae and malolactic bacteria: preliminary characterization of a yeast proteinaceous compound (s) active against Oenococcus oeni*. Journal of applied microbiology, 2005. **99**(1): p. 105-111.
12. Costantini, A., E. García-Moruno, and M.V. Moreno-Arribas, *Biochemical transformations produced by malolactic fermentation*, in *Wine chemistry and biochemistry*. 2009, Springer. p. 27-57.
13. Mendoza, L.M., M.C.M. de Nadra, and M.E. Fariás, *Antagonistic interaction between yeasts and lactic acid bacteria of oenological relevance: Partial characterization of inhibitory compounds produced by yeasts*. Food research international, 2010. **43**(8): p. 1990-1998.
14. Muñoz, V., B. Beccaria, and E. Abreo, *Simultaneous and successive inoculations of yeasts and lactic acid bacteria on the fermentation of an unsulfited Tannat grape must*. Brazilian Journal of Microbiology, 2014. **45**(1): p. 59-66.
15. Carvalho, F.P., et al., *Interaction of Saccharomyces cerevisiae and Lactococcus lactis in the fermentation and quality of artisanal cachaça*. Acta Scientiarum. Agronomy, 2015. **37**(1): p. 51-60.
16. Duarte, W.F., et al., *Effect of Co-Inoculation of Saccharomyces cerevisiae and Lactobacillus fermentum on the Quality of the Distilled Sugar Cane Beverage Cachaça*. Journal of food science, 2011. **76**(9): p. C1307-C1318.
17. Narváez-Zapata, J., et al., *Culture-independent analysis of lactic acid bacteria diversity associated with mezcal fermentation*. Current microbiology, 2010. **61**(5): p. 444-450.

18. Valdez, A.V., et al., *Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from Agave salmiana*. Antonie Van Leeuwenhoek, 2011. **100**(4): p. 497-506.
19. González-Robles, I.W., M. Estarrón-Espinosa, and D.M. Díaz-Montaño, *Fermentative capabilities and volatile compounds produced by Klöeckera/Hanseniaspora and Saccharomyces yeast strains in pure and mixed cultures during Agave tequilana juice fermentation*. Antonie van Leeuwenhoek, 2015. **108**(3): p. 525-536.
20. Prado-Jaramillo, N., et al., *Volatile compounds generation during different stages of the Tequila production process. A preliminary study*. LWT-Food Science and Technology, 2015. **61**(2): p. 471-483.
21. Ciani, M., et al., *Yeast interactions in inoculated wine fermentation*. Frontiers in Microbiology, 2016. **7**: p. 555.
22. Morgan, S.C., et al., *Sulfur dioxide addition at crush alters Saccharomyces cerevisiae strain composition in spontaneous fermentations at two Canadian wineries*. International Journal of Food Microbiology, 2016.
23. Piškur, J., et al., *How did Saccharomyces evolve to become a good brewer?* TRENDS in Genetics, 2006. **22**(4): p. 183-186.
24. Barraón, N., et al., *Enological properties in wild and commercial Saccharomyces cerevisiae yeasts: relationship with competition during alcoholic fermentation*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011. **27**(11): p. 2703-2710.
25. Parapouli, M., et al., *The effect of Debina grapevine indigenous yeast strains of Metschnikowia and Saccharomyces on wine flavour*. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2010. **37**(1): p. 85-93.
26. Canonico, L., F. Comitini, and M. Ciani, *Influence of vintage and selected starter on Torulaspora delbrueckii/Saccharomyces cerevisiae sequential fermentation*. European Food Research and Technology, 2015. **241**(6): p. 827-833.
27. Lopez, C.L.F., et al., *Interactions between Kluyveromyces marxianus and Saccharomyces cerevisiae in tequila must type medium fermentation*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014. **30**(8): p. 2223-2229.
28. Tiukova, I., T. Eberhard, and V. Passoth, *Interaction of Lactobacillus vini with the ethanol-producing yeasts Dekkera bruxellensis and Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and applied biochemistry, 2014. **61**(1): p. 40-44.
29. Sengun, I.Y. and S. Karabiyikli, *Importance of acetic acid bacteria in food industry*. Food Control, 2011. **22**(5): p. 647-656.
30. Ivey, M., M. Massel, and T.G. Phister, *Microbial interactions in food fermentations*. Annual review of food science and technology, 2013. **4**: p. 141-162.
31. Fleet, G.H., *Yeast interactions and wine flavour*. International journal of food microbiology, 2003. **86**(1): p. 11-22.
32. Sadoudi, M., et al., *Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts*. Food microbiology, 2012. **32**(2): p. 243-253.
33. Bely, M., et al., *Impact of mixed Torulaspora delbrueckii–Saccharomyces cerevisiae culture on high-sugar fermentation*. International journal of food microbiology, 2008. **122**(3): p. 312-320.
34. Badotti, F., et al., *Oenococcus alcoholitolerans sp. nov., a lactic acid bacteria isolated from cachaça and ethanol fermentation processes*. Antonie van Leeuwenhoek, 2014. **106**(6): p. 1259-1267.
35. Rossouw, D., M. Du Toit, and F.F. Bauer, *The impact of co-inoculation with Oenococcus oeni on the transcriptome of Saccharomyces cerevisiae and on the flavour-active metabolite profiles during fermentation in synthetic must*. Food microbiology, 2012. **29**(1): p. 121-131.

36. Pan, W., et al., *Kinetics of sugars, organic acids and acetaldehyde during simultaneous yeast-bacterial fermentations of white wine at different pH values*. Food Research International, 2011. **44**(3): p. 660-666.
37. Cañas, P.M.I., et al., *Influence of inoculation time of an autochthonous selected malolactic bacterium on volatile and sensory profile of Tempranillo and Merlot wines*. International journal of food microbiology, 2012. **156**(3): p. 245-254.
38. Cañas, P.M.I., et al., *Sequential inoculation versus co-inoculation in Cabernet Franc wine fermentation*. Food Science and Technology International, 2015. **21**(3): p. 203-212.
39. Azzolini, M., et al., *Evaluation of technological effects of yeast-bacterial co-inoculation in red table wine production*. Ital J Food Sci, 2010. **3**: p. 257-263.
40. Nehme, N., F. Mathieu, and P. Taillandier, *Quantitative study of interactions between Saccharomyces cerevisiae and Oenococcus oeni strains*. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2008. **35**(7): p. 685-693.
41. Comitini, F. and M. Ciani, *The inhibitory activity of wine yeast starters on malolactic bacteria*. Annals of microbiology, 2007. **57**(1): p. 61-66.
42. Cheraiti, N., S. Guezenc, and J.-M. Salmon, *Redox interactions between Saccharomyces cerevisiae and Saccharomyces uvarum in mixed culture under enological conditions*. Applied and environmental microbiology, 2005. **71**(1): p. 255-260.
43. Greenberg, E.P., *Bacterial communication and group behavior*. Journal of clinical investigation, 2003. **112**(9): p. 1288.
44. Federle, M.J. and B.L. Bassler, *Interspecies communication in bacteria*. Journal of Clinical Investigation, 2003. **112**(9): p. 1291.
45. González, J.E. and N.D. Keshavan, *Messing with bacterial quorum sensing*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2006. **70**(4): p. 859-875.
46. Lebeer, S., et al., *Functional analysis of luxS in the probiotic strain Lactobacillus rhamnosus GG reveals a central metabolic role important for growth and biofilm formation*. Journal of bacteriology, 2007. **189**(3): p. 860-871.
47. Kleerebezem, M., *Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis*. Peptides, 2004. **25**(9): p. 1405-1414.
48. Rul, F. and V. Monnet, *How microbes communicate in food: a review of signaling molecules and their impact on food quality*. Current Opinion in Food Science, 2015. **2**: p. 100-105.
49. Cuozzo, S.A., et al., *Differential roles of the two-component peptides of lactocin 705 in antimicrobial activity*. Current microbiology, 2003. **46**(3): p. 0180-0183.
50. Papathanasopoulos, M.A., et al., *Multiple Bacteriocin Production by Leuconostoc mesenteroides TA33a and Other Leuconostoc/Weissella Strains*. Current microbiology, 1997. **35**(6): p. 331-335.
51. Avbelj, M., et al., *Quorum-Sensing Kinetics in Saccharomyces cerevisiae: A Symphony of ARO Genes and Aromatic Alcohols*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015. **63**(38): p. 8544-8550.
52. Beasley, S., T. Manninen, and P. Saris, *Lactic acid bacteria isolated from canine faeces*. Journal of applied microbiology, 2006. **101**(1): p. 131-138.
53. Wolf, B.F. and H.S. Fogler, *Alteration of the growth rate and lag time of Leuconostoc mesenteroides NRRL-B523*. 2001.
54. Bravo-Ferrada, B., et al., *Effect of the fatty acid composition of acclimated oenological Lactobacillus plantarum on the resistance to ethanol*. Letters in applied microbiology, 2015. **60**(2): p. 155-161.
55. Yuan, Y., et al., *Directional isolation of ethanol-tolerant acetic acid bacteria from industrial fermented vinegar*. European Food Research and Technology, 2013. **236**(3): p. 573-578.

56. Tristezza, M., et al., *Simultaneous inoculation of yeasts and lactic acid bacteria: Effects on fermentation dynamics and chemical composition of Negroamaro wine*. LWT-Food Science and Technology, 2016. **66**: p. 406-412.
57. Amaya-Delgado, L., et al., *Performance evaluation of Pichia kluyveri, Kluyveromyces marxianus and Saccharomyces cerevisiae in industrial tequila fermentation*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013. **29**(5): p. 875-881.
58. Miller, G.L., *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Analytical chemistry, 1959. **31**(3): p. 426-428.

12. Anexos

