

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA

TESIS

CARACTERIZACIÓN CINÉTICA Y FISIOLÓGICA DE CEPAS DE LEVADURAS PRESENTES EN LA FERMENTACIÓN DEL MEZCAL PARA SER UTILIZADAS EN LA MEJORA DE LA CALIDAD DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA:

ANTONIO CRUZ ALMA LILIA

ASESOR:

DRA. CLAUDIA LÓPEZ SÁNCHEZ

COMISIÓN REVISORA:

DRA. CLAUDIA LÓPEZ SÁNCHEZ

DR. FELIPE DE JESÚS PALMA CRUZ

M.C. MINERVA DONAJÍ MENDEZ

M.I. MARCO ANTONIO MALDONADO NUÑEZ

Agradecimientos

Son muchas las personas que han contribuido para la elaboración de este proyecto. En primer lugar, quiero agradecer a mis asesores; a la Dra. Claudia López Sánchez, asesora interna quien me compartió sus conocimientos en todo momento y al Dr. Felipe de Jesús Palma Cruz, asesor externo por estar siempre al pendiente de los avances del proyecto, compartirme de sus conocimientos en el área, por despejar todas mis dudas acerca del proyecto y guiarme en el procedimiento realizado, por permitirme contribuir en el Laboratorio de Control ambiental desde la realización de mi servicio social.

Agradezco mucho a todos los que colaboran en este laboratorio, al equipo de Servicio Social, maestría y doctorado ya que la ayuda de cada uno fue indispensable para que este proyecto llegara a un buen término, a los integrantes de Servicio Social por colaborar dentro de la experimentación de la cinética de crecimiento, a los integrantes de maestría y doctorado por brindarme su apoyo en todo el proceso, en especial a la Mtra. Emilene Reyes Rodríguez por brindarme su valioso apoyo durante todo el proceso experimental para lograr los objetivos establecidos, de igual manera agradezco el apoyo de la QFB Jeimy Magdala López Torres quien fue de gran ayuda para la realización en cada parte del proceso de la caracterización cinética de cada cepa .

Agradezco a mis padres y hermana por brindarme su apoyo en todo momento a lo largo de la carrera con sus consejos y ánimo, por la oportunidad que me dieron para continuar con la carrera.

Resumen

En el presente informe se muestra el procedimiento utilizado para caracterizar fisiológica y cinéticamente las cepas de levaduras, las cuales son *Saccharomyces sp.*, *Kluyveromyces sp* y *Schizosaccharomyces sp.* Identificadas como ITYI002, ITOYI001 e ITOYI003 respectivamente, para lograr la caracterización fisiológica se probaron medios de cultivo para levaduras y se realizó una comparación entre los nutrientes para saber cuál es el medio de cultivo adecuado también se realizó un diseño por bloques aleatorizados en el cual se manejaron tres temperaturas y tres pH para determinar con esto de acuerdo al diseño elaborado en el programa Minitab la temperatura óptima, pH óptimo y tiempo de incubación. En base a los resultados obtenidos, se procedió a realizar la caracterización cinética punto a punto de dos cepas, por medio del método espectrofotométrico y por conteo de células en la cámara de Neubauer, al término de la caracterización cinética se realizó el experimento para obtener azúcares reductores directos los cuales ayudaron a obtener datos del gasto de sustrato durante la duración de la cinética y se obtuvo con esto la producción de etanol por cada cepa según el rendimiento teórico máximo de cada una.

Contenido

Agradecimientos.....	2
Resumen	3
1 Introducción.....	10
2 Objetivos.....	11
2.1 General.....	11
2.2 Específicos:	11
3 Planteamiento del problema	12
4 Justificación.....	13
5 Antecedentes.....	14
5.1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en la producción de bebidas fermentadas	14
5.1.2 Aislamiento, caracterización molecular y fermentativa de una levadura usada en la producción de etanol durante la elaboración de mezcal.....	14
5.2 Caracterización fermentativa de levaduras productoras de etanol a partir de jugo de <i>Agave cupreata</i> en la elaboración de mezcal	15
5.3 Comunidades de levadura asociadas con fermentaciones artesanales de mezcal de <i>Agave salmiana</i>	16
6 Marco teórico	17
6.1 Mezcal	17
6.2 Fermentación.....	17
6.2.1 Fermentación alcohólica y respiración	18
6.2.2 Levaduras: Fermentación alcohólica.....	19
6.3 Levaduras.....	19
6.3.1 Importancia y concepto	19
6.3.2 Distribución y medios en que viven.....	23
6.3.3 Morfología y estructura.....	23
6.4 Reproducción de las levaduras.....	26

6.4.1	Reproducción asexual.....	26
6.4.2	Reproducción sexual.....	27
6.5	Ciclos biológicos	28
6.6	Necesidades nutritivas de las levaduras.....	29
6.7	Biotecnología de levadura	30
6.8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
6.9	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	33
6.10	<i>Kluyveromyces lactis</i> y <i>Kluyveromyces marxianus</i>	33
6.11	Ruta metabólica y rendimiento teórico máximo	34
6.11.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
6.11.2	Rendimiento teórico de <i>Schizosaccharomyces</i>	36
7	Materiales y métodos.....	38
7.1	Material biológico.....	38
7.2	Recuperación, conservación y tinción con azul de metileno de las cepas de levaduras.....	38
7.3	Caracterización fisiológica	40
7.3.1	Conservación de las cepas y prueba de medio de cultivo óptimo de crecimiento	40
7.3.2	Planteamiento del diseño de pH y temperatura	41
7.3.3	Elaboración del preinóculo	42
7.3.4	Elaboración de azul de metileno y conteo de células vivas en la cámara de Neubauer	43
7.3.5	Preparación de matraces para diseño	45
7.3.6	Inoculación e incubación de matraces para el diseño	46
7.3.7	Conteo de las células en la cámara de Neubauer.....	47
7.3.8	Tiempo de incubación	48
7.4	Caracterización cinética.....	48

7.4.1	Elaboración de medio de cultivo para la cinética de crecimiento	48
7.4.2	Elaboración del preinóculo	49
7.4.3	Conteo de células vivas en la cámara de Neubauer	50
7.4.4	Inoculación e incubación de los matraces para la cinética.....	51
7.4.5	Realización de la cinética de crecimiento.....	52
7.4.6	Realización de la cinética de crecimiento con conteo de células viables	53
7.5	Gasto de sustrato	54
7.5.1	Azúcares reductores directos.....	54
7.6	Producción de etanol	55
8	Resultados y discusión.....	57
8.1	Medio de cultivo óptimo y método de conservación de las cepas	57
8.2	Caracterización fisiológica	57
8.2.1	Obtención de pH y temperatura óptima.....	57
8.2.2	Cepa <i>Saccharomyces sp</i> (ITOYI003).....	62
8.2.3	Cepa <i>Schizosaccharomyces sp</i> (ITOYI008).....	67
8.2.4	Tiempo de incubación	70
8.3	Caracterización cinética.....	71
8.3.1	Cepa <i>Saccharomyces sp</i> (ITOYI003).....	71
8.3.2	Cepa <i>Schizosaccharomyces sp</i> (ITOYI008).....	74
8.4	Gasto de sustrato y producción de etanol	76
8.4.1	Cepa <i>Saccharomyces sp</i> (ITOYI003).....	77
8.4.2	Cepa <i>Schizosaccharomyces sp</i> (ITOYI008).....	80
9	Conclusión.....	83
10	BIBLIOGRAFÍA	84
11	Anexo I	87
12	Anexo II	92

13	Anexo III	93
14	Anexo IV	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Biotecnología de levaduras en diferentes áreas (Kurtzman et al., 2011).....	31
Figura 2	Metabolismo de <i>S. cerevisiae</i> para la producción de etanol.....	35
Figura 3	Cepas conservadas en PDA A: <i>Kluyveromyces sp</i> (ITOYI002) B: <i>Saccharomyces sp</i> (ITOYI003) y C: <i>Schizosaccharomyces sp</i> (ITOYI008).	39
Figura 4	Tinciones con azul de metileno por cepa. A: <i>Kluyveromyces sp</i> (ITOYI002), B: <i>Saccharomyces sp</i> (ITOYI003), C: <i>Schizosaccharomyces sp</i> (ITOYI008).	39
Figura 5	Conservación de cepas de levaduras en tubos inclinados con agar	40
Figura 6	Cajas de Petri con crecimiento de cada cepa en medio YPG para observar su crecimiento. A: <i>Kluyveromyces sp</i> (ITOYI002), <i>Saccharomyces sp</i> (ITOYI003), C: <i>Schizosaccharomyces sp</i> (ITOYI008).	41
Figura 7	Inoculación del preinóculo para el diseño de pH y temperatura.	43
Figura 8	Azul de metileno preparado y prueba en la cámara de Neubauer.....	44
Figura 9	Preparación de la muestra para el conteo en la cámara de Neubauer.....	45
Figura 10	Ajuste del pH de cada matraz del diseño.....	46
Figura 11	Inoculación de cada matraz del diseño e incubación.....	47
Figura 12	Preparación de muestras por matraz para conteo en la cámara de Neubauer.....	47
Figura 13	Preparación de medio de cultivo para la cinética con las condiciones de pH y esterilización.....	49
Figura 14	Incubación del preinóculo con las condiciones indicadas.....	50
Figura 15	Células vistas en la cámara de Neubauer de la cepa <i>Saccharomyces</i> (ITOYI003) A: Células vivas B: Células muertas.	51
Figura 16	Inoculación de los matraces utilizados en la cinética de crecimiento.	51
Figura 17	Lectura de la absorbancia en la cinética de crecimiento.....	53
Figura 18	Vaciado en frascos del medio con crecimiento y toma de muestras para conteo en la cámara de Neubauer.....	54
Figura 19	Preparación de muestras por punto para la determinación de azúcares reductores directos.....	54

Figura 20 Titulación para obtener resultados de azúcares reductores directos.	55
Figura 21 Gráfica de contornos para la cepa <i>Kluyveromyces sp.</i>	60
Figura 22 Superficie de respuesta de la cepa <i>Kluyveromyces sp.</i> Y (cél/mL) contra temperatura °C y pH.....	62
Figura 23 Superficie de respuesta para la cepa <i>Saccharomyces</i>	65
Figura 24 Superficie de respuesta. Y promedio (cél/mL) contra Temperatura (°C) y pH de la cepa <i>Saccharomyces sp.</i>	66
Figura 25 Superficie de respuesta para la cepa <i>Schizosaccharomyces</i>	69
Figura 26 Superficie de respuesta de la cepa <i>Schizosaccharomyces sp</i> con ejes Yprom (cél/mL) contra temperatura (°C) y pH.	70
Figura 27 Comportamiento de los datos de la cinética de crecimiento por medio de la absorbancia como por célula/mL para la cepa <i>Saccharomyces</i>	73
Figura 28 Comportamiento de los datos de la cinética de crecimiento por medio de la absorbancia y por célula/mL de la cepa <i>Schizosaccharomyces sp.</i>	76
Figura 29 Comportamiento del consumo de glucosa y producción de etanol de la cepa <i>Saccharomyces sp</i>	79
Figura 30 Comportamiento del consumo de glucosa y la producción de etanol de la cepa <i>Schizosaccharomyces</i>	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Ejemplos de fermentaciones comunes y algunos microorganismos que las realizan (Alcázar, 2011).....	18
Tabla 2 Codificación empleada por cepa.....	38
Tabla 3 Planteamiento del diseño de pH y temperatura.	42
Tabla 4 Composición del medio YPG con concentración modificada.	43
Tabla 5 Cantidad añadida por cepa para la inoculación de cada matraz del diseño.	46
Tabla 6 Ajuste de pH de acuerdo a la cepa.	48
Tabla 7 Condiciones para incubación de las cepas.	50
Tabla 8 Dilución realizada para lectura en el espectrofotómetro.	52
Tabla 9 Nutrientes contenidos en cada medio probado.....	57

Tabla 10 Resultados de cél/mL de acuerdo al diseño de pH y temperatura para la cepa <i>Kluyveromyces</i>	58
Tabla 11 Análisis de varianza para la cepa <i>Kluyveromyces sp.</i>	59
Tabla 12 Coeficientes para el modelo cuadrático de la cepa <i>Kluyveromyces sp.</i>	59
Tabla 13 Resultados de cél/mL de acuerdo al diseño de pH y temperatura para la cepa <i>Saccharomyces</i>	63
Tabla 14 Análisis de varianza para la cepa <i>Saccharomyces</i>	64
Tabla 15 Coeficientes para el modelo cuadrático.	65
Tabla 16 Resultados de cél/mL de acuerdo al diseño de pH y temperatura de la cepa <i>Schizosaccharomyces sp.</i>	67
Tabla 17 Análisis de varianza para la cepa <i>Schizosaccharomyces sp.</i>	68
Tabla 18 Coeficientes para el modelo cuadrático de la cepa <i>Schizosaccharomyces sp.</i>	69
Tabla 19 Tiempo de incubación adecuada para cada cepa.....	71
Tabla 20 Resultados de la cinética de crecimiento por el método espectrofotométrico y la desviación estándar de la cepa <i>Saccharomyces sp.</i>	71
Tabla 21 Resultados de la cinética por medio del conteo en la cámara de Neubauer para la cepa <i>Saccharomyces sp.</i>	72
Tabla 22 Resultados de la cinética de crecimiento por el método espectrofotométrico de la cepa <i>Schizosaccharomyces sp.</i>	74
Tabla 23 Resultados de la cinética por medio del conteo en la cámara de Neubauer para la cepa <i>Schizosaccharomyces sp.</i>	75
Tabla 24 Azúcares presentes en cada punto de la cinética (ARD) y consumo de glucosa de la cepa <i>Saccharomyces sp.</i>	77
Tabla 25 Resultados de consumo de sustrato y producción de etanol durante la cinética de la cepa <i>Saccharomyces sp.</i>	78
Tabla 26 Resultados de los azúcares presentes y consumo de glucosa en cada punto de la cinética de la cepa <i>Schizosaccharomyces</i>	80
Tabla 27 Resultados del consumo de glucosa y la producción de etanol para cada punto de la cinética de la cepa <i>Schizosaccharomyces sp.</i>	81

1 Introducción

El mezcal es una de las bebidas que caracterizan al estado de Oaxaca, su proceso de producción es de forma artesanal y conlleva una serie de pasos importantes para su obtención los cuales son; el corte, cocción, molienda, fermentación, destilación y envasado. Un paso clave es la fermentación puesto que intervienen microorganismos que participan en el proceso para obtener las características del mezcal y para obtención de etanol. Este trabajo se enfocará en las levaduras que se encuentran presentes durante la fermentación, de manera más específica se trabajó con las cepas *Saccharomyces sp*, *Kluyveromyces sp* y *Schizosaccharomyces sp* las cuales fueron aisladas en un palenque en San Dionisio Ocotepec por el ingeniero Víctor Adrián Espinosa.

El proyecto se basó en la obtención de las condiciones óptimas de crecimiento como lo son el medio de cultivo, pH y temperatura óptima de crecimiento así como el tiempo de incubación; es decir, la caracterización fisiológica de cada cepa, así también se enfocó en la caracterización cinética de las cepas y en obtener el consumo de sustrato (glucosa) y la producción de etanol de acuerdo al rendimiento teórico máximo de cada cepa, lo que nos ayudará a saber la cepa que tiene mayor capacidad de producir etanol que es un punto importante en la producción del mezcal.

2 Objetivos

2.1 General

Caracterizar cinética y fisiológicamente cepas de levaduras presentes en la fermentación del mezcal.

2.2 Específicos:

- Realizar pruebas para elegir el medio de crecimiento adecuado para las cepas de levaduras
- Establecer el método y medio de cultivo adecuado para la conservación
- Experimentar con diferentes condiciones de temperatura, pH y tiempo de incubación
- Llevar a cabo el estudio de la cinética de crecimiento de cada una de las cepas de levaduras.
- Realizar la cinética donde se medirá el gasto de substrato y la producción de etanol

3 Planteamiento del problema

Actualmente existe falta de información acerca de los parámetros cinéticos de las cepas de levaduras que están involucradas durante la fermentación del mezcal del estado de Oaxaca, además de que no se conocen las condiciones óptimas de crecimiento y producción de las levaduras para la producción de etanol, el conocimiento sobre el gasto de sustrato y producción de etanol es importante para conocer el proceso de producción de mezcal.

4 Justificación

En el estado de Oaxaca una de las actividades que tiene mayor importancia económica es la producción de mezcal, que se lleva de forma artesanal por maestros mezcaleros y varía dependiendo de la región o lugar en que se lleva a cabo , un punto relevante en la producción es el proceso de fermentación en la cual intervienen las levaduras del género *Saccharomyces* y no *Saccharomyces*, la elaboración del mezcal no sólo involucra a las especies de agave sino a sus levaduras y otros organismos nativos para la fermentación es por esto que este proyecto propone el estudio de la caracterización de las levaduras presentes durante este proceso y que es de vital importancia para la producción del mezcal ya que se debe reconocer diversidad microbiológica que es relevante para el mejoramiento de la producción, así como conocer la manera en que estos microorganismos se desarrollan, las condiciones de pH y temperatura en las que presentan mejor crecimiento, esto para poder proponer mejoras en el proceso de fermentación para la obtención de la bebida en el palenque beneficiando a los pequeños productores, así también el proyecto es punto de partida para la realización de otros estudios.

5 Antecedentes

5.1.1 *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de bebidas fermentadas

Las bebidas alcohólicas se producen después de la fermentación de azúcares por levaduras, principalmente (pero no exclusivamente) cepas de la especie, *Saccharomyces cerevisiae*. Los materiales de partida azucarados pueden emanar de almidones de cereales (que requieren pre hidrólisis enzimática) en el caso de cervezas y whiskis, plantas ricas en sacarosa (melaza o jugo de azúcar de la caña de azúcar) en el caso de los rones, o de frutas (que no requieren pre-hidrólisis) en el caso de vinos y brandies. En presencia de azúcares, junto con otros nutrientes esenciales como aminoácidos, minerales y vitaminas, *S. cerevisiae* llevará a cabo el metabolismo fermentativo a etanol y dióxido de carbono (como metabolitos primarios de fermentación) a medida que las células se esfuerzan por generar energía y regenerar la coenzima. NAD⁺ en condiciones anaeróbicas. Las levaduras también producirán numerosos metabolitos secundarios que actúan como importantes congéneres de sabor de bebidas, incluidos alcoholes superiores, ésteres, carbonilos y compuestos de azufre. Estos son muy importantes para dictar el sabor final y las características de aroma de bebidas como la cerveza y el vino, pero también en bebidas destiladas como el whisky, el ron y el brandy.

Por lo tanto, las levaduras son de vital importancia para proporcionar el contenido de alcohol y los perfiles sensoriales de tales bebidas (Walker y Stewart, 2016).

5.1.2 Aislamiento, caracterización molecular y fermentativa de una levadura usada en la producción de etanol durante la elaboración de mezcal.

Existen estudios dirigidos hacia la composición y cuantificación de la microflora responsable de las fermentaciones espontáneas. Dentro de ellos se ha encontrado que las levaduras son microorganismos clave durante la fermentación alcohólica. Gonzales y colaboradores aislaron y caracterizaron molecularmente dos levaduras por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) en las cuales se comparan los patrones de restricción de diferentes regiones genómicas correspondientes al DNA ribosomal. Se realizó un diseño de experimentos (DE)

basado en la metodología de superficie de respuesta (MSR) para diseñar un medio de cultivo en la producción de Mezcal, usando como sustrato jugo de *Agave cupreata* y la levadura LEVM. Encontrándose por RFLP dos levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (LEVM y LEVZ). En el Diseño de experimentos para la LEVM las variables analizadas fueron el pH, concentración de sustrato y temperatura, para evaluar las variables y los niveles de operación lo más cercanos posible al proceso original. Encontrando que la temperatura es la variable que tiene un efecto significativo sobre la producción de etanol estos resultados preliminares muestran la importancia de usar técnicas moleculares para la caracterización de levaduras en la industria de las bebidas y el uso de permitió establecer las condiciones para llevar a cabo el proceso de fermentación (González et al., 2012).

5.2 Caracterización fermentativa de levaduras productoras de etanol a partir de jugo de *Agave cupreata* en la elaboración de mezcal

Las cepas de levaduras convencionales y no convencionales son capaces de producir etanol bajo distintas condiciones operativas y nutricionales, con distintos rendimientos en la producción de biomasa y etanol. Pérez y colaboradores estudiaron el comportamiento cinético de biomasa y etanol nivel matraz y nivel biorreactor durante la fermentación alcohólica. Se utilizó jugo de *Agave cupreata* y se establecieron como variables de estudio: tipo de levadura, concentración de azúcares y temperatura, a nivel matraz (Diseño Box-Behnken). En biorreactor, se estudió la aireación y agitación (Diseño factorial). Las variables de respuesta evaluadas en cada ensayo fueron el crecimiento celular; la cantidad producida de etanol; el consumo de azúcares y el pH. Ya destilado el producto, se procedió a realizar la identificación de compuestos volátiles (metanol, etanol y alcoholes superiores) por cromatografía de gases. Se encontró que la interacción concentración de azúcares-temperatura fue la variable con mayor influencia sobre el incremento en el porcentaje de etanol. La cepa de *Kluyveromyces marxianus* presento el mayor rendimiento de etanol (12.46 % v/v), en concentraciones de azúcares de 12 ° Brix y una temperatura de 28 °C, y a nivel biorreactor, con agitación de 150 rpm y aireación de 0.1 vvm. El destilado presentó una concentración de metanol y etanol de 1.89 % y 47.75 ´ % respectivamente (Pérez et al., 2013).

5.3 Comunidades de levadura asociadas con fermentaciones artesanales de mezcal de *Agave salmiana*.

Verdugo et al., 2011 caracterizaron el proceso de fermentación del mezcal en San Luis Potosí, México e identificaron las levaduras presentes en la fermentación utilizando métodos dependientes del cultivo molecular (RFLP del 5.8S-ITS y secuenciación del dominio D1 / D2) y también mediante el uso de un método independiente del cultivo (DGGE). Se analizaron las fermentaciones alcohólicas de dos mostos separados obtenidos de *Agave salmiana*. Las concentraciones de azúcar, etanol y compuestos volátiles fueron incrementaron en magnitud en la primera fermentación, lo que demuestra la importancia de tener un estándar de calidad para las materias primas, particularmente en la concentración de fructanos, para producir mosto de *agave salmiana* fermentado con características similares. Ciento noventa y dos (192) colonias de levadura diferentes fueron identificadas, de las presentes en placas de agar WL, por análisis RFLP del ITS1-5.8S-ITS2 del gen rRNA, con endonucleasas de restricción, HhaI, HaeIII y HinfI. Las levaduras identificadas fueron: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kluyveri*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Clavispora lusitaniae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Candida ethanolica* y *Saccharomyces exiguus*. Estas identificaciones se confirmaron secuenciando la región D1-D2 del gen 26S rRNA. Con el método PCR-DGGE, se detectaron claramente las bandas correspondientes a *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii*, confirmando los resultados obtenidos con técnicas clásicas.

6 Marco teórico

6.1 Mezcal

“Mezcal” es el nombre genérico que viene del náhuatl mexcalli que significa agave horneado, es el nombre aplicado a la bebida alcohólica destilada producida en muchas áreas rurales de México (Pérez et.,al 2016).

El mezcal es una bebida alcohólica, tradicional de México, la cual es obtenida por procesos artesanales en su mayoría, así como también por procesos tecnificados, que incluyen las siguientes etapas de producción: la selección y corte de la materia prima, la cocción del agave, la molienda del mosto, la fermentación del jugo fructosado, la destilación, la rectificación y la maduración del destilado. Eventos que tienen el potencial de afectar la calidad sensorial y química del producto final, así como sus rendimientos. Estas características son factores clave para una buena aceptación por el consumidor en función de las características organolépticas que percibe, como el sabor, el aroma y el cuerpo (Pérez et al., 2016).

6.2 Fermentación

Muchos productos de la industria alimenticia están basados en la fermentación: vinos, cerveza, pan, quesos, chocolate, entre otros productos son ahora alimentos permanentes en la dieta de toda persona.

En las levaduras, se conocen dos mecanismos de conservación de energía: la fermentación y la respiración. Desde el punto de vista de las reacciones redox, la fermentación y la respiración difieren en que la primera el proceso redox ocurre en ausencia de aceptores finales de electrones, mientras que la segunda el oxígeno molecular o algún otro aceptor de electrones funciona como aceptor final de electrones (Alcázar, 2011).

La clasificación de fermentaciones se realiza basándose en los sustratos fermentados o en los productos formados (Tabla 1) (Alcázar, 2011).

Tabla 1 Ejemplos de fermentaciones comunes y algunos microorganismos que las realizan (Alcázar, 2011)

Tipo	Reacción global	Microorganismo
Fermentación alcohólica	$Glucosa \rightarrow 2Etanol + 2CO_2$	Levadura <i>Zymomonas</i>
Fermentación homoláctica	$Hexosa \rightarrow 2Lactato^- + 2H^+$	<i>Streptococcus</i> Algunos <i>Lactobacillus</i>
Fermentación heteroláctica	$Hexosa \rightarrow Lactato^- + Etanol + CO_2 + H^+$	<i>Leuconostoc</i> Algunos <i>Lactobacillus</i>
Ácido propiónico	$Lactato^- \rightarrow Propionato^- + Etanol + CO_2 + H^+$	<i>Propionibacterium</i>

La fermentación alcohólica consiste en la transformación de los azúcares simples como glucosa o fructosa en etanol y otros compuestos que directamente definen las principales características de la bebida alcohólica (Alcázar, 2011).

6.2.1 Fermentación alcohólica y respiración

Al inicio del proceso de fermentación, las levaduras comienzan a metabolizar los azúcares y nutrientes presentes (nitrógeno y minerales). Las levaduras usan todos estos nutrientes para obtener energía e incrementar su población.

La fermentación alcohólica ocurre si existe una gran cantidad de glucosa disponible en el medio de cultivo bajo condiciones aeróbicas más piruvato y NADH son producidos del que las mitocondrias pueden oxidar. Por lo que el exceso de piruvato es convertido a acetaldehído por la enzima piruvato descarboxilasa y después es reducido a etanol convirtiendo NADH a NAD⁺ por acción del alcohol deshidrogenasa (Alcázar, 2011)

De acuerdo a lo que ocurre en la respiración y fermentación, la formación aeróbica de etanol puede ser el resultado de la competencia entre el piruvato deshidrogenasa y el piruvato descarboxilasa por el sustrato común piruvato que tiene diferentes formas de asimilación. Para usar glucosa como fuente de energía las células deben mantener su balance NAD⁺/NADH, y si la fuente energética es etanol se regenera NADPH (Alcázar, 2011).

6.2.2 Levaduras: Fermentación alcohólica

Las levaduras son organismos quimiótrofos debido a que obtienen su energía por oxidación de los compuestos químicos, además son organismos heterótrofos debido a que oxidan moléculas orgánicas de las cuales el tipo más común son los azúcares (Alcázar, 2011).

Las levaduras son las responsables de los procesos de fermentación siendo la *Saccharomyces cerevisiae* la especie que se utiliza en la mayoría de las fermentaciones de bebidas alcohólicas para producir etanol, dióxido de carbono y volátiles (Alcázar, 2011).

Durante las primeras horas de la fermentación, la población de levaduras no se incrementa. En este periodo, llamado fase de latencia, es necesario para las células adaptarse a las nuevas condiciones ambientales. Una vez que las levaduras se han adaptado a las condiciones ambientales, su población crece. Esta etapa denominada fase exponencial, es altamente influenciada por la temperatura, la concentración de nitrógeno con grupos amonio, aminoácidos y otros nutrientes, además por la presencia de oxígeno. Después de esta etapa, las levaduras detienen su crecimiento debido a que algunos nutrientes comienzan a ser deficientes. Durante esta nueva etapa llamada fase “cuasi-estacionaria” la población de levaduras gradualmente decrece hasta casi desaparecer. Durante este periodo las levaduras mueren debido a la falta de nutrientes, además del etanol y otras sustancias producidas durante la fermentación que son tóxicas para las levaduras (Alcázar, 2011).

6.3 Levaduras

6.3.1 Importancia y concepto

Según el microbiólogo estadounidense Tanner, “ninguna clase de microorganismo ha estado más íntimamente asociada con el progreso y el desarrollo de la raza humana como las levaduras”. Gran verdad encierra estas palabras, pues es bien sabido que el hombre en tiempos remotos aprovechó prácticamente las fermentaciones efectuadas por dichos microorganismos, aunque no llegó a conocer el aspecto microscópico de las levaduras antes del siglo XVII (Herrera y Ulloa, 1998).

La palabra levadura en muchos idiomas se basa en palabras que significan “espuma” y “levantar”, referencias directas a los procesos de fermentación que producen cerveza y pan. Por esta razón, las levaduras son a menudo conocidos como los hongos ascomicetos fermentativos similares a *Saccharomyces cerevisiae*. De hecho, no es raro que en algunas áreas de la biología molecular para el tratamiento de las palabras “levadura” y *Saccharomyces* sea usado como sinónimos. El descubrimiento de que algunos grupos taxonómicos son basidiomicetos ha ampliado nuestra percepción de la naturaleza de las levaduras. Como consecuencia, hemos llegado a ver a las levaduras como los hongos que se reproducen asexualmente por gemación o fisión, lo que resulta en el crecimiento que se compone principalmente de células individuales (Kurtzman et al., 2011).

Muchos años antes de nuestra era, los griegos y los egipcios se dedicaban al cultivo de la vid y a la fermentación del jugo de uva para obtener los vinos; por otra parte, la fabricación de la cerveza la practicaban los germanos, los galos y los españoles, y antes que ellos, varios siglos antes de Cristo, los caldeos, los asirios y los egipcios. La influencia de estas bebidas alcohólicas, y muchas otras más que se fermentan por levaduras, ha sido de enorme importancia en la economía y la civilización de todos los pueblos (Herrera y Ulloa, 1998).

El término levadura se aplicó por primera vez a la porción de masa fermentada que se mezclaba con otra para hacerla fermentar y lograr así una de las operaciones en la elaboración del pan, que es el levantamiento de la masa. Posteriormente se dio este nombre a toda masa destinada a levantar el pan o fermentar los líquidos azucarados. En el momento en que se observaron y descubrieron los microorganismos que constituyen esa masa llamada levadura, este término se aplicó a los mismos (Herrera y Ulloa, 1998).

La primera manifestación visible que provocan las levaduras en la fermentación de los líquidos azucarados es el desprendimiento de gas carbónico, lo que conduce a la formación de espuma, y al mismo tiempo, a la elevación de partículas sólidas que son llevadas a la superficie del medio. Durante el proceso se forma un sedimento o “levadura” en el fondo del medio (Herrera y Ulloa, 1998).

En 1680, Leeuwenhoek, observando al microscopio el sedimento que provoca la fermentación de la cerveza, fue el primero que vio las levaduras en gemación, a las que parece ser denominó fermento *cerevisiae*, indicando que dicho sedimento estaba formado de gran número de cuerpos de forma globular. En 1826 Desmazières expresó que estos microorganismos eran de

naturaleza vegetal, los incluyó en el género *Mycoderma cervisiae*. Unos años después diversos autores confirmaron las observaciones anteriores, y demostraron claramente que las levaduras de la cerveza y de los vinos estaban formadas por células vegetales organizadas, en los que se distinguían una membrana delimitante y contenido viscoso y granuloso. Hicieron constar, también, que dichas células podían reproducirse por brotes y por la formación en su interior de sus cuerpos pequeños o esporas, los cuales podían quedar libres por la ruptura de la pared de las células madres. Pero lo más importante que se hizo constar en esa época fue la relación de causa y efecto que existe entre las levaduras y los jugos azucarados, indicándose que las células de estas levaduras eran las que producían la fermentación, y que sin ellas este fenómeno no se efectuaba. La conclusión de que las levaduras son seres vivos y, además, las causantes de la fermentación fueron publicada casi simultáneamente por Cagniar Latour en Francia (1836) y por Schwann y Kützing en Alemania (1837). Este último descubrió el núcleo de las levaduras, consideró que estas eran pleomórficas, pues podían tener una fase micelial y, aunque ya había comunicado antes (1834) de manera informal (en una carta dirigida a Ehrenberg), la relación que tienen las levaduras con la fermentación, su trabajo fue el último publicado entre los trabajos de los tres investigadores mencionados. Debido a dicha eventualidad, Cagniard Latour tiene prioridad en la publicación tan importante descubrimiento. Este último investigador también descubrió la gemación en las levaduras e indicó que el tamaño de las levaduras de cerveza era semejante al de las levaduras de los vinos (1/50 mm); demostró que las levaduras secas, o sometidas a temperaturas de -0.5°C en CO_2 líquido, eran aun activas y consideró que la transformación del azúcar en alcohol etílico y CO_2 se debía a la acción vital de dichos microorganismos, debido precisamente a su capacidad para fermentar los azúcares, se dio a las levaduras el nombre de **sacaromicetes** o y posteriormente les agrupó taxonómicamente en la familia *Saccharomycetaceae* (Herrera y Ulloa, 1998).

Sin embargo. El papel de las levaduras no quedó bien definido hasta la época en que Pasteur (1859) inició sus memorables investigaciones sobre fermentaciones. Desde ese momento hasta nuestros días, numerosos investigadores se han dedicado a estudiar estos interesantes microorganismos, y han demostrado la significación tan importante que tienen en las actividades humanas. Son las levaduras las que fermentan y levantan la masa en la elaboración del pan; las que esencialmente se utilizan en la fabricación de la inmensa mayoría de las bebidas alcohólicas. Dando lugar al establecimiento de industrias de gran poder

económico en los países, y las que se emplean en las enormes fábricas de alcohol etílico y de otros productos. Por su alto contenido de vitaminas del complejo B, y su riqueza de proteínas, varias especies de levaduras se emplean con éxito como complemento alimenticio del hombre y los animales; otras se utilizan como fuente de grasas, glicerina y ácido succínico. Asimismo, algunas intervienen en la fermentación del cacao, contribuyendo a proporcionar el sabor y el olor tan exquisitos de este producto, por otro lado, pueden ser perjudiciales, pues las hay que producen olores y sabores desagradables en las bebidas fermentadas, echan a perder la leche y sus derivados, así como mariscos, carnes, frutos y muchos otros alimentos. Varias especies parasitan a ciertos animales y al hombre, ocasionando a veces graves enfermedades, y hay algunas que se han encontrado parasitando plantas (Herrera y Ulloa, 1998).

Desde que se descubrieron las levaduras, y con los primeros estudios de las mismas, numerosos autores trataron de dar un concepto de estos microorganismos, pero conforme avanzaron los conocimientos acerca de ellas, ese concepto se hizo más difícil, pues constituyen un grupo de microorganismos que no estaba bien definido ni es homogéneo. Los límites de posición taxonómica son vagos y sujetos a decisiones arbitrarias. Filogenéticamente constituyen un grupo muy heterogéneo, lo que se puede observar al estudiar su clasificación, ya que se incluyen en un grupo de hongos muy diversos. Así, las levaduras que forman ascosporas se colocan en los Ascomycotina; las que generan esporas exógenas, semejantes a las basidiosporas a los conidios, se sitúan entre los Basidiomycotina o en los Deuteromycotina (levaduras imperfectas); en este último grupo se clasifican también las que no se producen ninguno de estos tipos de esporas y que sólo se reproducen por gemación. Aun en el grupo de los Zigomicetes hay hongos que bajo ciertas condiciones forman levaduras en algunas especies del género *Mucor* (*M. rouxianus* y *M. racemosus*) (Herrera y Ulloa, 1998)

De acuerdo con las ideas dominantes, y de una manera esencial y general, se puede expresar que las levaduras no constituyen una entidad taxonómica definida y que son hongos unicelulares, generalmente con células pequeñas, pero que en ocasiones pueden formar pseudomicelio y aun micelios verdaderos, se reproducen por fisión o, en la mayoría de los casos, por gemación; muchas especies forman ascas y ascosporas; otras generan diversos tipos de esporas de origen asexual, como las que reciben los nombres de balistosporas y artrosporas; aunque es común que efectúen fermentación alcohólica, las hay que no producen este fenómeno (Herrera y Ulloa, 1998).

6.3.2 Distribución y medios en que viven

Las levaduras son organismos cosmopolitas, probablemente de los más ampliamente distribuidos en la Tierra. Se encuentran en todos los continentes, en climas húmedos y secos, en los cálidos, templados y fríos, desde la orilla del mar hasta las alturas donde todavía se desarrollan los últimos vegetales superiores. Abundan en el aire, en el agua y en el suelo. Se presentan en los sustratos más diversos y variados, pudiéndose asegurar que casi no hay sustancia orgánica fermentada o en vías de degradación en la que se haya encontrado. Así, se han aislado, por ejemplo, de los suelos, de los restos de vegetales y animales en desintegración, de raíces, tallos, hojas, flores (nectarios), frutos, granos, semillas, cortezas de árboles y exudaciones vegetales; pus de las heridas y de órganos como los pulmones, tumores y úlceras; piel sana y lesionada; tubo digestivo del hombre y de los animales y excrementos de los mismos, esputos de personas sanas y enfermas; jugos de frutas, conservas, jaleas, jarabes, mieles diversas, salchichas, jamones y todo tipo de carnes expuestas en un ambiente contaminado; leche y sus derivados, salsas, cuerpos fructíferos de hongos superiores silvestres y cultivados; materias vegetales utilizadas en la industria, como tabaco y cacao en la fermentación; pero sobre todo son abundantes en los jugos azucarados y en otros sustratos que están en fermentación y a partir de los cuales se elaboran muy diversos tipos de bebidas alcohólicas, muchas de ellas típicas de cada país y aun de ciertas regiones. En México fácilmente se puede observar en los jugos o mostos en fermentación, con los que se elaboran la cerveza, los vinos y las sidras, así como en los sustratos de los que se elaboran ciertos alimentos y bebidas típicos de nuestro país (pozol, tesgüino, tepache, colonche, mezcal, tequila, charanda, comiteco y sotol) (Herrera y Ulloa, 1998).

6.3.3 Morfología y estructura

Las levaduras son unicelulares, sus células tienen formas y dimensiones muy diversas. Pueden ser esféricas, ovales, elípticas, cilíndricas, cortas o alargadas, claviformes, triangulares y con los extremos redondeados o apiculados. Como son polimorfas adoptan distintas formas dentro de la misma especie y aun en el mismo cultivo, lo cual depende de diversos factores, especialmente del sustrato en que viven y de la edad de los cultivos. Debido a esta circunstancia la forma no siempre puede tomarse como carácter taxonómico (Herrera y Ulloa, 1998).

En muchos casos, al reproducirse las células quedan unidas formando pequeñas o largas cadenitas que son los pseudomicelio; asimismo, algunas de ellas pueden desarrollar largos filamentos que constituyen un micelio verdadero (Herrera y Ulloa, 1998).

Las dimensiones más comunes de las células varían entre 2 y 4 μm de ancho y 2 a 8 μm de largo; sin embargo, se encuentran levaduras alargadas que tienen 10, 15 o 25 μm de longitud, y aquellas que constituyen filamentos llegan a tener hasta 50, 70 y más micrómetros (Herrera y Ulloa, 1998).

Las levaduras presentan las partes de una célula completa: pared celular y protoplasma; este último comprende la membrana fundamental, el citoplasma y el núcleo. La pared celular o cápsula de secreción es delgada o gruesa según la edad de las células y la especie de la levadura, puede contener sustancias diversas: está formada principalmente de polisacáridos constituidos por mananas, β -glucanas y algo de quitina; la pared primaria, cuando la célula de una levadura se divide, casi siempre es quitinosa, pero después, en las células maduras o viejas, son más abundantes los otros dos polisacáridos mencionados. En algunas levaduras, la pared celular es muy gruesa y se modifica en su porción externa constituyendo una cápsula mucosa o gelatinosa, semejante a la cápsula que presentan muchas bacterias (Herrera y Ulloa, 1998).

La membrana fundamental tiene estructura, constitución y funciones semejantes a las de otras células, y en los fenómenos de plasmólisis se retrae junto con el citoplasma. El citoplasma es transparente y presenta diversas estructuras metaplasmáticas, así como granulaciones paraplasáticas. Entre las primeras están las mitocondrias, el retículo endoplásmico y las vacuolas; a las segundas corresponden el glucógeno, los glóbulos de grasa y los gránulos metacromáticos (Herrera y Ulloa, 1998).

Las mitocondrias son corpúsculos refringentes constituidos por lípidos o grasas y nucleoproteínas que contienen ácidos ribonucleicos y desoxirribonucleico. La gran actividad secretora y fermentativa de muchas levaduras está ligada al desarrollo de estos corpúsculos.

El retículo endoplásmico, como en otras células eucarióticas, está constituido por numerosas membranas tubulares lisas, o bien granulosas cuando tienen gránulos de ribosomas en la superficie (Herrera y Ulloa, 1998).

Las vacuolas pueden estar presentes en número de una o varias; contienen el jugo celular, que está formado principalmente por agua con diversas sustancias de reserva, de secreción y excreción, así como cristales de sales y de ácidos orgánicos. Es frecuente el desarrollo de una gran vacuola en el interior de las células (Herrera y Ulloa, 1998).

El glucógeno es casi siempre abundante en las levaduras que se desarrollan en medios óptimos ricos en glúcidos, y disminuye en medida que estos se agotan; se encuentra localizado en vacuolas especiales, llamadas vacuolas de glucógeno (Herrera y Ulloa, 1998).

Los glóbulos de grasa, pocos o numerosos, pequeños o grandes, homogéneos o muy refringentes, se encuentran dispersos en el citoplasma; son más abundantes en las células bien nutridas y desaparecen cuando se agotan las sustancias alimenticias en el medio (Herrera y Ulloa, 1998).

Los gránulos metacromáticos constituidos por la volutina (polimetafosfatos) representan la sustancia de reserva más importante del núcleo. Estos gránulos también pueden encontrarse en el citoplasma, principalmente en las vacuolas, como inclusiones con movimiento browniano, por lo que reciben el nombre de cuerpos danzantes (Herrera y Ulloa, 1998).

La estructura y posición del núcleo de las levaduras fue un problema muy discutido, pero en la actualidad, con las técnicas de microscopía electrónica, que han permitido estudiar cortes ultra delgados de las células de estos microorganismos, se sabe que, como todos los eucariontes, dicho núcleo está delimitado por una doble membrana que presenta numerosos poros y que en su interior contienen el nucleoplasma o jugo nuclear, a veces muy abundante, por lo cual se le consideró como una gran vacuola a la que se le denominó vacuola nuclear (Herrera y Ulloa, 1998).

La membrana nuclear permanece intacta durante la mitosis, a diferencia de lo que sucede durante este fenómeno en las células de los vegetales y de los animales superiores, en los que la membrana nuclear se desintegra. Este problema se complica porque la estructura del núcleo de las levaduras puede variar según el grupo taxonómico al que pertenecen las mismas y, además, en los hongos dimórficos con fase micelial y de levadura, puede ser diferente la estructura nuclear, según la fase en que se encuentren dichos hongos (Herrera y Ulloa, 1998).

Las células de las levaduras cuando son observadas en el microscopio pueden presentar cierta coloración si están agrupadas, pero individualmente son incoloras, más o menos

transparentes; cuando se desarrollan en medios de cultivo sólidos, originan colonias que pueden ser de color blanco, crema y aun ligeramente moreno; en algunos casos los cultivos tienen colores rojizos, rosados, anaranjados o amarillentos, lo que se debe generalmente a presencia de pigmentos carotenoides(Herrera y Ulloa, 1998).

6.4 Reproducción de las levaduras

6.4.1 Reproducción asexual

Las levaduras se reproducen asexualmente por dos métodos esenciales: gemación y división transversal o fisión.

La gemación es el procedimiento más común de la multiplicación de las levaduras. Consiste en la formación de una o varias yemas que aparecen como pequeñas prominencias en la superficie de las células; al crecer estos brotes o yemas se separan de la célula madre por una constricción en la base. En ocasiones, las células hijas dan yemas antes de separarse de las células madre, por lo que las células quedan unidas unas con otras, formando cadenas que llegan a constituir pseudomicelio y aun micelios verdaderos. Durante la gemación, el núcleo se divide por mitosis; un núcleo pasa al brote y otro queda en la célula madre, según se explicó; las levaduras, en su gran mayoría, se reproducen por gemación, por ejemplo, todas las del género *Saccharomyces*, que comprende muchas de las especies más interesantes desde el punto de vista industrial (Herrera y Ulloa, 1998).

En la fisión o división transversal, la célula se alarga un poco, su núcleo se divide en dos, y se forma un tabique transversal más o menos en la parte media, separando a célula madre en dos células hijas uninucleadas. Como en el caso anterior, las células resultantes pueden separarse o quedar unidas; en este último caso se llegan a formar pseudomicelio y micelios. Este tipo de reproducción se representa en diversas especies de levaduras especialmente en las del género *Schizosaccharomyces* (Herrera y Ulloa, 1998).

6.4.2 Reproducción sexual

La reproducción sexual puede realizarse entre dos células somáticas o entre dos ascosporas, ambas haploides, que actúan como gametangios.

La fecundación, copulación, o conjugación puede efectuarse por isogamia o por anisogamia, esta última también llamada heterogamia (Herrera y Ulloa, 1998).

La isogamia se realiza entre dos células de aspecto semejante, por simple contacto de las mismas o por emisión de tubos de conjugación. En el primer caso, observado en las especies del género *Saccharomyces*, las células después de ponerse en contacto, rompen sus paredes, se fusionan los protoplasmas y los núcleos, y se obtiene un cigoto con un núcleo diploide; esto sucede, por ejemplo, en las especies del género *Schizosaccharomyces* (Herrera y Ulloa, 1998).

Cualquiera que sea los tipos de fecundación después de la formación de cigoto, este experimenta meiosis en su núcleo, formándose dos o más núcleos haploides; a expensas de cada uno, que se rodea del citoplasma, de una membrana y de una pared, se constituye una ascospora; el cigoto se transforma en asca, generalmente con dos a cuatro, en ocasiones una, o bien, por el contrario, con varias ascosporas (Herrera y Ulloa, 1998).

Por lo común las ascosporas se desarrollan y constituyen células vegetativas haploides, pero en ciertos casos, como ya se indicó, se conjugan y forman cigotos, que a su vez forman células vegetativas diploides.

En muchas levaduras faltan por completo los fenómenos sexuales típicos, y entonces las ascas y ascosporas se desarrollan partenogenéticamente a partir de células somáticas. Lo mismo sucede con levaduras que normalmente tienen fenómenos sexuales, porque en ocasiones las células vegetativas dan, por partenogénesis, ascas y ascosporas.

Las formas de las ascosporas de las levaduras son muy diversas: esféricas, ovoides, reniformes, angulares, hemisféricas con un reborde en la cara plana que les da el aspecto de sombrero, esféricas u ovoides rodeadas de un anillo que les da la apariencia del planeta Saturno, esféricas u ovoides con erizaciones en la membrana, y a veces presentan otras formas como la de huso y la acicular. En muchos casos, las formas de las ascosporas

constituyen caracteres taxonómicos bien definidos, que caracterizan a ciertos géneros y aun a diversas especies (Herrera y Ulloa, 1998).

Al madurar, las ascosporas quedan libres por rompimiento o por desintegración de la pared del asca; si caen en medio propicio, se transforman en células vegetativas; en caso contrario, como son capaces de soportar condiciones ambientales adversas, resisten un tiempo más o menos largo en vida latente. En esta forma es como son diseminadas por aire, agua, animales y otros agentes, a medios y a sitios muy diversos y aun lejanos. A esto se debe, en gran parte, que las levaduras sean cosmopolitas (Herrera y Ulloa, 1998).

6.5 Ciclos biológicos

Las levaduras poseen, según Guilliermond, tres tipos de ciclos biológicos, que se pueden llamar haplobióntico, diplobióntico y haplodiplobióntico (Herrera y Ulloa, 1998).

El ciclo **haplobióntico** es el más común entre los hongos; puede ser ejemplificado con los ciclos de vida del hongo levaduriforme *Dipodascopsis uninucleatus* y de la levadura típica *Schizosaccharomyces octosporus* (Herrera y Ulloa, 1998).

En este tipo de ciclo, todas las células somáticas y de reproducción asexual, así como los gametangios, tienen núcleos haploides y solo el cigoto es diploide (Herrera y Ulloa, 1998).

En el ciclo **diplobióntico** las células vegetativas son diploides, y la fase haploide es muy corta. El ejemplo representante de este ciclo es *Saccharomyces ludwigii*. Las células somáticas diploides, de forma de limón o salchicha, se reproducen durante muchas generaciones por gemación, generando numerosas células diploides. En condiciones propicias para la esporulación, muchas células suspenden su reproducción por gemación, y dividen su núcleo por meiosis, obteniéndose cuatro núcleos haploides, alrededor de los cuales se delimitan sendas ascosporas, mientras que las células forman ascas. Después de las cuatro ascosporas haploides de cada asca se conjugan por pares para formar así dos cigotos (diploides). Estos germinan por un tubo que sale del asca y constituye un pequeño micelio, que por gemación forma células diploides, que son las levaduras; estas inician su reproducción por brote y así completa el ciclo (Herrera y Ulloa, 1998).

El ciclo haplodiplobióntico se llama así porque durante el mismo se forman células vegetativas haploides y diploides. El tipo representante del mismo es la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Existe una generación de células diploides, grandes y vigorosas y de formas esféricas u ovales, que se reproducen muchas veces por gemación, originando células también diploides. En condiciones especiales cesa la gemación y el núcleo de estas células se divide por meiosis, se forman cuatro núcleos haploides, y a expensas de ellos se constituyen cuatro ascosporas haploides dentro de cada asca. Dos de las ascosporas llevan carácter sexual -, y otras dos llevan carácter sexual +. Al quedar libres las ascosporas, y en el medio propicio, se transforman en células vegetativas haploides, también esféricas u ovales, pero más pequeñas que las diploides. Estas células se reproducen por gemación dando muchas generaciones de levaduras haploides. En condiciones apropiadas, las células que tienen carácter – y + se aproximan, se fecundan y forman un cigoto diploide. Los cigotos diploides se multiplican por gemación y forman nuevamente células diploides (Herrera y Ulloa, 1998).

6.6 Necesidades nutritivas de las levaduras

Las levaduras para su crecimiento necesitan fuentes de carbono orgánico y nitrógeno mineral u orgánico. Algunas además necesitan de varias vitaminas (tiamina, biotina, inositol, ácido pantoténico, etc.) (Uribe, 2007).

El carbono es el compuesto mayoritario de la célula de levadura: alrededor del 50% del peso seco; a su vez los compuestos carbonados son utilizados por las levaduras como fuente de carbono y energía (Uribe, 2007).

Todas las levaduras utilizan la D-glucosa, la D-fructosa y la D-manosa. El carbono se puede suministrar en forma de azúcares, aldehídos, sales de algunos ácidos orgánicos, glicerina o etanol y ocasionalmente, en otra forma dependiendo del tipo de levadura (Uribe, 2007).

Entre las levaduras, la capacidad de utilizar ciertos compuestos carbonados varía; algunas pueden utilizar una amplia gama de compuestos, pero otras asimilan solamente un número pequeño de ellos. Las fuentes de carbono como los glúcidos simples como las hexosas, los disacáridos y los trisacáridos son metabolizados por un gran número de levaduras (Uribe, 2007).

Todas las levaduras son capaces de utilizar nitrógeno en forma de ion amonio. Los iones amonio pueden ser aportados en el medio por el cloruro de amonio, y sobre todo el sulfato de amónico. También se puede adicionar urea, peptona u otros derivados proteínicos solubles (Uribe, 2007).

El fósforo es un elemento particularmente importante en el proceso vital de levaduras, desempeña un papel muy importante en la producción de etanol a partir de azúcares, interviene en formación de fosfatos, hexosa y triosa. Se encuentra en los ácidos nucleicos en la lecitina y en otros componentes de las células de la levadura (Uribe, 2007).

El potasio es el elemento mineral cualitativamente más importante en la levadura ya que tiene papeles fisiológicos muy importantes. Actúa como catión regulador, estimula la fermentación y la respiración, y actúa como efector de numerosas enzimas (Uribe, 2007).

6.7 Biotecnología de levadura

Las levaduras han beneficiado a la humanidad durante milenios. Tienen una amplia importancia fundamental e industrial en las disciplinas científicas, alimentarias, médicas y agrícolas (Figura 1). Los atributos industriales tradicionales de las levaduras incluyen sus funciones principales en muchas fermentaciones de alimentos, como cervezas, sidra, vinos, sake, licores destilados, productos de panadería, queso, salchichas y otros alimentos fermentados. Otros procesos industriales de larga data que involucran levaduras son la producción de etanol combustible, proteína de células individuales (SCP), alimentos y forraje, enzimas industriales y metabolitos de pequeño peso molecular. Más recientemente, *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Ogataea* (*Hansenula*) *polymorpha* y algunas otras especies de levaduras se han desarrollado como organismos industriales para la producción heteróloga de enzimas y proteínas, incluidos los productos farmacéuticos proteicos. Las levaduras, especialmente *S. cerevisiae*, se utilizan cada vez más como hospedadores para la expresión de biocatalizadores de proteínas y vías de múltiples enzimas para la síntesis de productos químicos finos y compuestos de pequeño peso molecular de importancia medicinal y nutricional. Las levaduras tienen un papel importante en la agricultura como agentes de biocontrol, biorremediación y como indicadores de la calidad del medio ambiente. Varios de estos procesos y productos han alcanzado utilidad comercial, mientras

que otros están en desarrollo. Debido a los avances en genómica funcional y biología de sistemas, *S. cerevisiae* es actualmente el principal organismo modelo para el estudio de la biología eucariota y la enfermedad humana (Kurtzman et al., 2011).

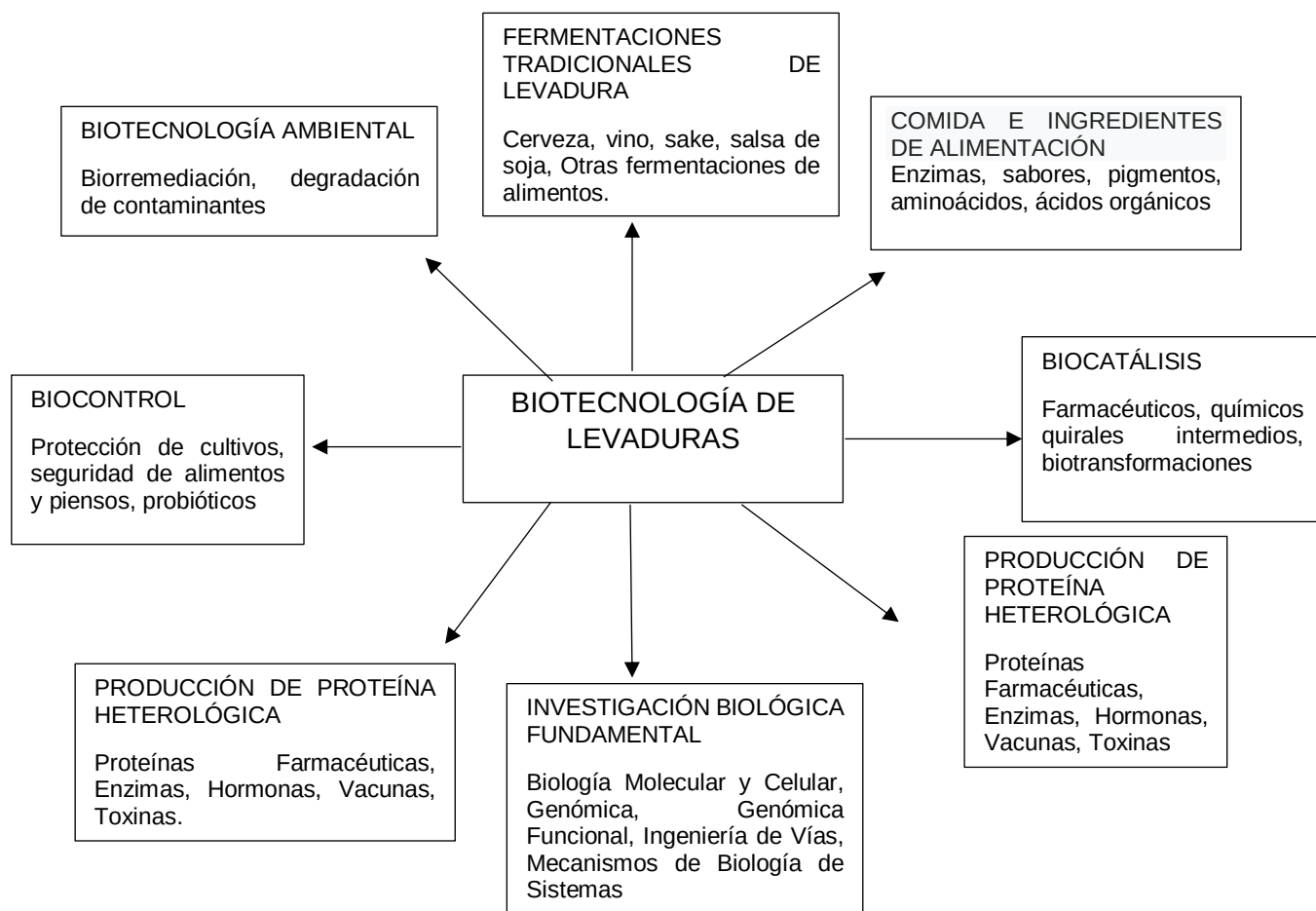


Figura 1 Biotecnología de levaduras en diferentes áreas (Kurtzman et al., 2011)

6.8 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es la principal levadura utilizada en biotecnología en todo el mundo, debido en gran parte a su fisiología única y funciones clave asociadas en muchas fermentaciones de alimentos y otros procesos industriales. También es el principal organismo eucariota modelo utilizado para la investigación fundamental. Los *Saccharomycetales* comprenden un grupo diverso de levaduras ascomicetas y los estudios de clasificación, filogenia, fisiología y ecología han proporcionado valiosos conocimientos y oportunidades de este grupo de levaduras para aplicaciones industriales y como organismos modelo Vaughan. Irónicamente, a pesar de la tremenda importancia de *S. cerevisiae*, se sabe relativamente poco sobre sus orígenes y estilo de vida natural. Las cepas industriales "domesticadas" generalmente difieren de las cepas de laboratorio, así como de las cepas "salvajes", en propiedades genéticas y fisiológicas- Robert Mortimer (1927 2007), pionero en genética de levadura, realizó una investigación en los últimos años de su carrera para estudiar los orígenes y la ecología de las levaduras de vino, y sus conclusiones complementan los de otros laboratorios, que concluyen que las cepas industriales de *S. cerevisiae* utilizadas en procesos industriales han evolucionado principalmente en el entorno industrial. Si bien las cepas de laboratorio de *S. cerevisiae* se pueden cultivar de manera estable en estados haploides o diploides, las cepas industriales suelen ser diploides o aneuploides y a menudo se esporulan pobremente. Esto crea dificultades para realizar procedimientos de apareamiento clásicos y otras manipulaciones genéticas (Kurtzman et al., 2011).

Las secuencias del genoma y la arquitectura genética también pueden diferir dentro de *S. cerevisiae*, como se demostró recientemente para una cepa oportunista patógena de *S. cerevisiae*. Las cepas de laboratorio (p. Ej., La cepa S288C para la cual se ha analizado el genoma) también difieren de las cepas industriales en varias respuestas fenotípicas a cambios ambientales, limitaciones de nutrientes, desecación y estrés por frío, y otras propiedades de considerable importancia para el desempeño exitoso de la industria. Las cepas industriales de *S. cerevisiae* expresan fenotipos importantes en procesos comerciales, tales como fermentación rápida y completa de azúcar, aumento de la producción y tolerancia del alcohol, formación de sabores y aromas deseados, floculación mejorada, capacidad para utilizar disacáridos y trisacáridos, baja propensión a la formación de espuma y otros rasgos. La diversidad genética y fenotípica de las cepas comerciales de *S. cerevisiae* probablemente

representa adaptaciones dentro de entornos industriales, como cervecerías, bodegas y panaderías, así como el uso repetido en procesos industriales. Debido a sus propiedades fisiológicas deseables y a los métodos establecidos para la manipulación genética, *S. cerevisiae* seguirá siendo, sin duda, el organismo deseado para muchas aplicaciones industriales, incluidas aquellas que se extienden más allá de la biotecnología de levadura "clásica" de los procesos de alimentos, bebidas y piensos. Debido a su larga historia de uso y consumo seguro, y la falta de producción de toxinas, la mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* generalmente se han considerado como generalmente reconocidas como seguras (GRAS) para su uso en alimentos y como un organismo de producción de productos nativos y recombinantes (Kurtzman et al., 2011).

6.9 *Schizosaccharomyces pombe*

Schizosaccharomyces pombe no tiene la utilidad industrial de *S. cerevisiae*, pero se ha utilizado con elegancia para estudios fundamentales de biología eucariota y para la producción y usos de proteínas heterólogas. *S. cerevisiae* y *Schiz. Pombe* se encuentran entre los sistemas eucarióticos modelo más ampliamente explotados para estudios en biología básica, y estos estudios se han extendido a la biotecnología. El Premio Nobel de Medicina 2001 fue otorgado a Lee Hartwell y Paul Nurse por sus estudios sobre la genética y la biología molecular de *S. cerevisiae* y *Schiz. Pombe*, respectivamente. Estas dos levaduras comparten más de 200 genes homólogos a los genes humanos involucrados en la enfermedad, incluidos 23 genes involucrados en el cáncer humano. Estas levaduras continuarán utilizándose para dilucidar problemas fundamentales en la biología eucariota y para comprender la biología y las enfermedades humanas (Kurtzman et al., 2011).

6.10 *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces marxianus*

La genética y la sistemática de *Kluyveromyces spp.* Se han extendido estudiado exhaustivamente, particularmente por dos prominentes biólogos de levadura. *Kluyveromyces* es un ascomiceto micénico que forma fácilmente ascos. Varias técnicas genéticas han sido desarrolladas para la manipulación de *K. lactis* para estudios básicos y desarrollo industrial. La disponibilidad de herramientas genéticas y moleculares y datos genómicos para *K. lactis* y *K.*

marxianus han facilitado El desarrollo de la levadura para la producción de proteínas heterólogas y potencialmente otras aplicaciones industriales. Las especies de *Kluyveromyces* producen β -galactosidasa (lactasa) que permite la utilización de lactosa, un atributo de importancia particular para la industria láctea. *Kluyveromyces spp.* Puede ser cultivado en sustratos económicos y corrientes de desechos que contienen lactosa como el suero de queso. Este género de levadura también tiene industrial potencial para la producción de proteínas unicelulares, ex polisacáridos, y productos químicos finos. *Kluyveromyces lactis* ha sido investigado para la producción de proteínas heterólogas, y tiene la capacidad de expresión eficiente secreción de una variedad de péptidos y proteínas de alto peso molecular con buenos rendimientos. Se han obtenido altas densidades celulares en fermentaciones, logrando aproximadamente 100 g de peso de células secas por litro con secreción de albúmina sérica humana recombinante en varios gramos por litro. Un inconveniente del uso de *K. lactis* para la producción de proteínas heterólogas es que la glucosilación de proteínas no se ajusta al patrón humano. Puede ser posible para adaptar un sistema de glucosilación "humanizado" a *K. lactis*, como los desarrollados para *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* y *S. cerevisiae*. *K. lactis* forma la toxina asesina zimocina que es activo contra ciertas levaduras ascomicetas. Dado que *K. lactis* está presente en muchos productos lácteos que son consumidos por humanos, se considera GRAS y ella levadura se puede utilizar para la producción de ingredientes alimenticios y como una dieta suplemento (Kurtzman et al., 2011).

6.11 Ruta metabólica y rendimiento teórico máximo

Conocer la ruta metabólica de los géneros de levaduras es importante para conocer los productos que se obtienen de su metabolismo

6.11.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Una caracteriza que es común dentro del metabolismo de las levaduras es la conversión de la glucosa 6- fosfato o fructosa 6-fosfato a piruvato esto a través de la glucolisis. El piruvato tiene destinos diferentes, como es el caso de producción de etanol en la cepa de *Saccharomyces Cerevisiae*.

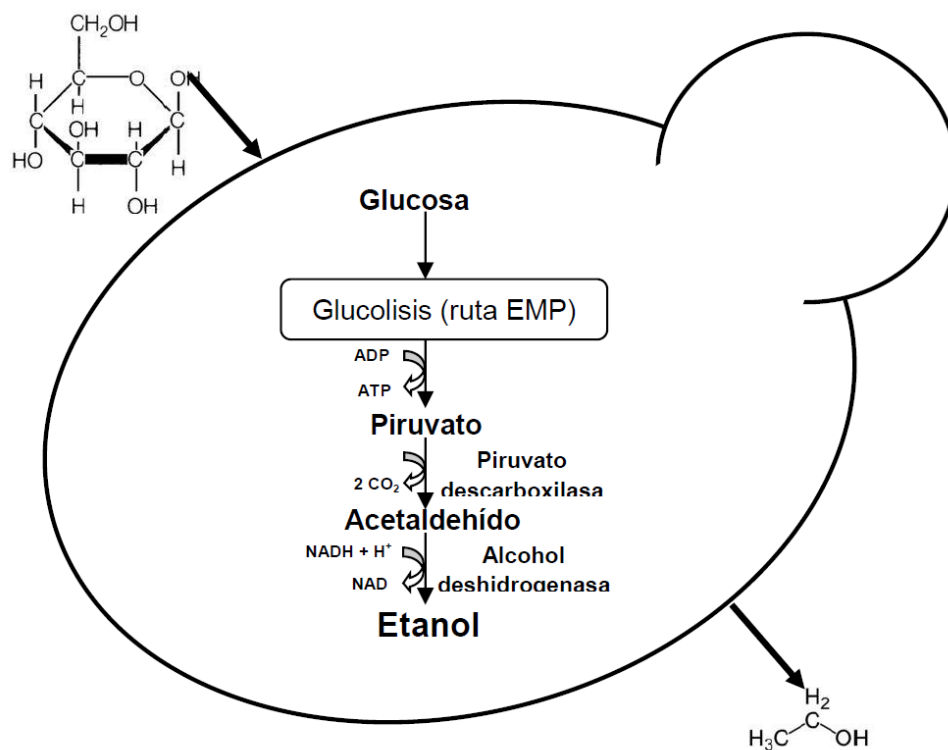


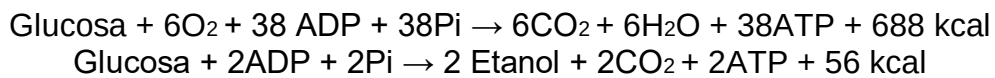
Figura 2 Metabolismo de *S. cerevisiae* para la producción de etanol.

Aunque muchos investigadores estudiaron el fermento de etanol con *S. cerevisiae*, en algunos casos falta el reconocimiento de su vía metabólica condujo a enfoques que es poco probable que produzcan mejoras significativas. La vía metabólica principal implicada en la fermentación de etanol es la glucólisis (Embden – Meyerhof – Parnas o Vía EMP), a través de la cual una molécula de la glucosa se metaboliza y dos moléculas de piruvato son producidos.

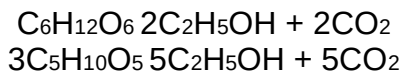
Dos ATP producidos en la glucólisis se utilizan para impulsar la biosíntesis de células de levadura que implica una variedad de biorreacciones que requieren energía. Por lo tanto, la producción de etanol está estrechamente unida al crecimiento de células de levadura, lo que significa que la levadura debe producirse como un coproducto. Sin el consumo continuo de ATP por el crecimiento de las células de levadura, el metabolismo glucolítico de la glucosa se interrumpirá inmediatamente, debido a la acumulación intracelular de ATP, que inhibe la fosfofructoquinasa (PFK), una de las enzimas reguladoras más importantes en la glucólisis (Bai et al., 2008).

Este principio muy básico contradice la fermentación de etanol con las células de levadura inmovilizadas por materiales de soporte, particularmente por atrapamientos de gel, que restringen físicamente las células de levadura y retardan significativamente su crecimiento (Bai et al., 2008).

Si el oxígeno funciona como último aceptor de electrones provenientes de la oxidación del sustrato, el metabolismo se dirige hacia la respiración, lo que trae derivada de la degradación del sustrato que funciona como aceptor final de electrones se lleva a cabo un metabolismo fermentativo (Castañón, 2014).



El rendimiento teórico de estas reacciones es 0.51 g etanol por g de glucosa y 0.49 g de CO₂ por cada g de glucosa y el rendimiento de biomasa es de 0.12 gg⁻¹, por cada molécula de hexosa se producen dos moléculas de etanol y por cada tres moléculas de pentosa se producen cinco moléculas de etanol (Castañón, 2014).



Dos moléculas de ATP producidas en la glucólisis son usadas para llevar a cabo la biosíntesis de células. Además del etanol y CO₂ varios subproductos son también producidos durante la fermentación. El glicerol se produce en un nivel de cerca del 1.0% (pv⁻¹) en la mayoría de las fermentaciones alcohólicas (Castañón, 2014).

6.11.2 Rendimiento teórico de Schizosaccharomyces

La secuencia de transformaciones para degradar la glucosa hasta dos moléculas de alcohol y dos moléculas de bióxido de carbono es un proceso muy complejo, pues al mismo tiempo la levadura utiliza la glucosa y nutrientes adicionales para reproducirse. Para evaluar esta transformación, se usa el rendimiento biomasa/producto y el rendimiento producto/ sustrato (Vázquez y Dacosta, 2007).

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

El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO_2 por 1 g de glucosa. Este valor fue cuantificado por Gay Lussac. En la realidad es difícil lograr este rendimiento, porque como se señaló anteriormente, la levadura utiliza la glucosa para la producción de otros metabolitos. El rendimiento experimental varía entre 90% y 95% del teórico, es decir, de 0.469 a 0.485 g/g. Los rendimientos en la industria varían entre 87 y 93% del rendimiento teórico. Otro parámetro importante es la productividad (g/h/l), la cual se define como la cantidad de etanol producido por unidad de tiempo y de volumen (Vázquez y Dacosta 2007).

7 Materiales y métodos

7.1 Material biológico

El aislamiento de las cepas de levaduras se realizó en palenque artesanal ubicado en San Dionisio Ocotepec, Tlacolula de Matamoros, Oaxaca. A partir de mosto de *Agave angustifolia* (Espadín) en el cuarto día del proceso de fermentación. Se aislaron 3 cepas de levaduras de los géneros *Saccharomyces sp*, *Schizosaccharomyces sp* y *Kluyveromyces sp*.

7.2 Recuperación, conservación y tinción con azul de metileno de las cepas de levaduras

Se recuperaron tres cepas de levaduras las cuales han sido identificadas hasta género como *Saccharomyces sp*, *Schizosaccharomyces sp* y *Kluyveromyces sp*. Cada una de estas cepas está identificada con la siguiente codificación mostrada en la tabla 2:

Tabla 2 Codificación empleada por cepa.

CEPA	CODIFICACIÓN
<i>Kluyveromyces sp</i>	ITOYI002
<i>Saccharomyces sp</i>	ITOYI003
<i>Schizosaccharomyces sp</i>	ITOYI008

Para la recuperación de las cepas se sembraron por estría simple en cajas de Petri utilizando agar dextrosa y papa (PDA) adicionando 0.5 g de cloranfenicol por cada litro de medio de cultivo de acuerdo a lo escrito por Laboratorios Micro kit y se incubaron a 30°C durante 48 horas, al término de este tiempo se conservaron en refrigeración, como se muestra en la figura 3.

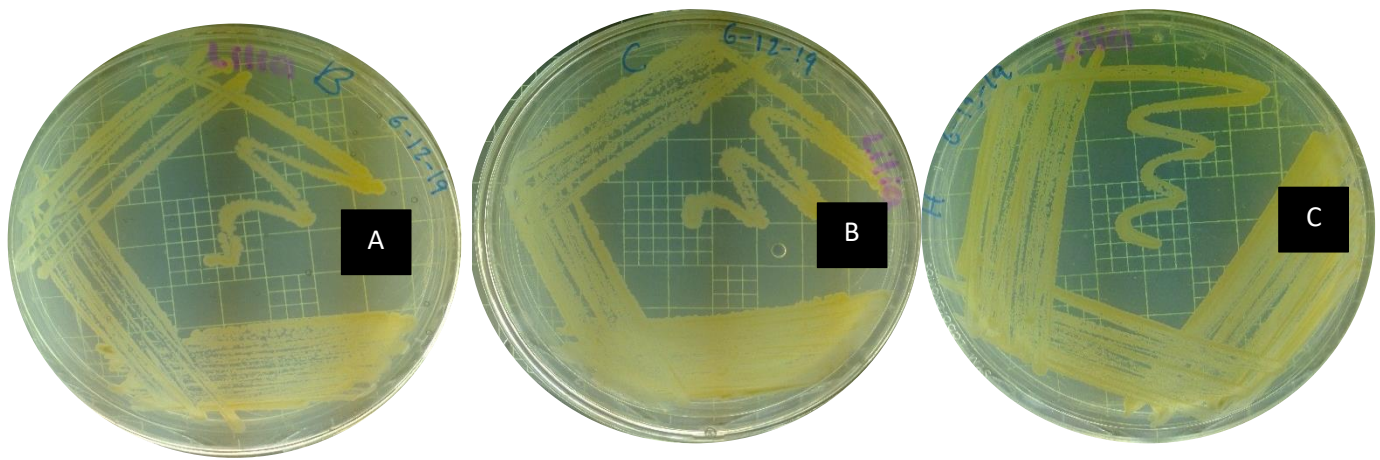


Figura 3 Cepas conservadas en PDA A: *Kluveromyces sp* (ITOYI002) B: *Saccharomyces sp* (ITOYI003) y C: *Schizosaccharomyces sp* (ITOYI008).

Para observar la forma de las levaduras identificadas fue necesario realizar tinciones con azul de metileno como se muestra en la figura 4 y siguiendo los pasos mostrados en el anexo II:

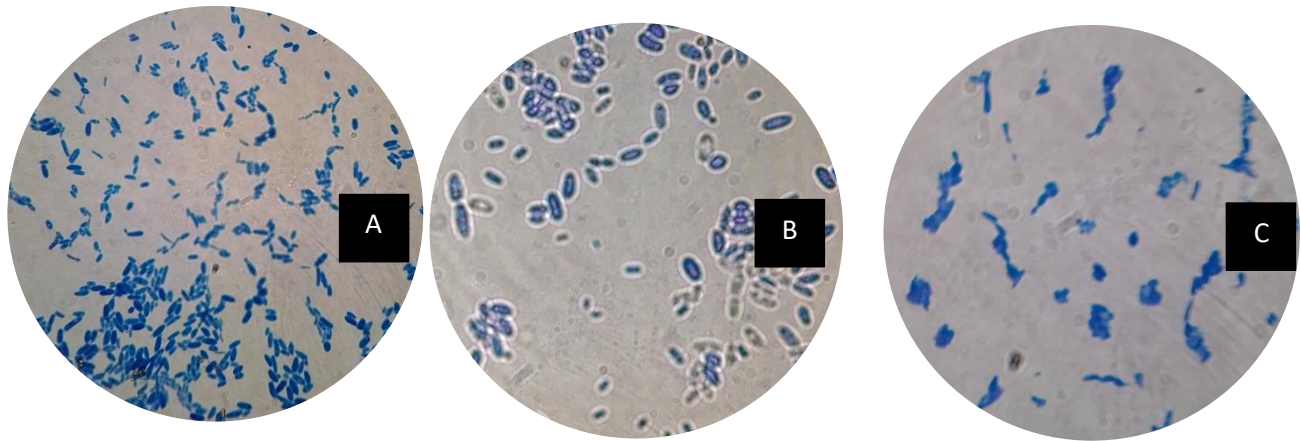


Figura 4 Tinciones con azul de metileno por cepa. A: *Kluveromyces sp* (ITOYI002), B: *Saccharomyces sp* (ITOYI003), C: *Schizosaccharomyces sp* (ITOYI008).

7.3 Caracterización fisiológica

7.3.1 Conservación de las cepas y prueba de medio de cultivo óptimo de crecimiento

Para la conservación de las levaduras se realizó en tubos inclinados con agar con el medio de cultivo PDA (figura 5), se incubaron a 30°C durante 48 horas posteriormente se mantuvieron en refrigeración.



Figura 5 Conservación de cepas de levaduras en tubos inclinados con agar

Se comparó el crecimiento en medio de cultivo sólido en dos medios diferentes, como lo son Agar Dextrosa y Papa (PDA) y Agar extracto de levadura, peptona y glucosa (YPG) los cuales son aptos para el crecimiento de las levaduras, a estos medios sólidos se les adicionó cloranfenicol en una relación de 0.5g/L. Las cepas de levaduras fueron sembradas por estriado en cajas de Petri, fueron incubados a 30°C durante 48 horas, posteriormente se observó su crecimiento en cada uno de las cajas como se muestra en la figura 6.

Así también se hizo la comparación entre los nutrientes que contienen los dos medios de cultivo y observando cuales de estos favorece el crecimiento de las levaduras.

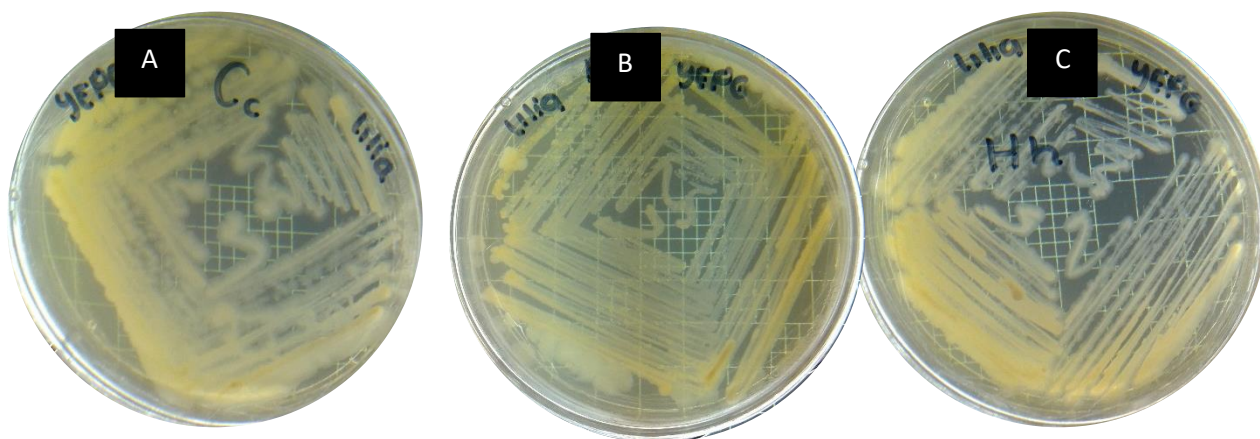


Figura 6 Cajas de Petri con crecimiento de cada cepa en medio YPG para observar su crecimiento. A: *Kluyveromyces sp* (ITOYI002), *Saccharomyces sp* (ITOYI003), C: *Schizosaccharomyces sp* (ITOYI008).

7.3.2 Planteamiento del diseño de pH y temperatura

Para determinar el pH y temperatura se estableció un diseño experimental por bloques aleatorizados. Este diseño fue aplicado por cada cepa las cuales fueron 3 que son, *Kluyveromyces sp* (ITOYI002), *Saccharomyces sp* (ITOYI003) y *Schizosaccharomyces sp* (ITOYI008). Para la realización del diseño experimental se identificaron los matraces de acuerdo al pH y temperatura del diseño como se muestra en la tabla 3

Tabla 3 Planteamiento del diseño de pH y temperatura.

MATRAZ	CODIFICACIÓN	pH	TEMPERATURA
1	1A	4	32
2	1B	4	32
3	2A	4	30
4	2B	4	30
5	3A	6	32
6	3B	6	32
7	4A	6	30
8	4B	6	30
9	5A	5	27
10	5B	5	27
11	6A	5	27
12	6B	5	27
13	7A	5	27
14	7B	5	27
15	8A	5	27
16	8B	5	27
17	9A	5	27
18	9B	5	27

7.3.3 Elaboración del preinóculo

Para la realización de la experimentación se utilizó un matraz de 500 mL en el cual se le adicionó 200 mL de medio de cultivo líquido YPG con la concentración que se muestra en la tabla 4 después se esterilizó en la autoclave a 121°C a 15lb/plg² durante 15 minutos, posteriormente se le añadió 0.25 g de cloranfenicol y se inoculó con tres asadas de la cepa de levadura correspondiente (figura 7) y se incubó de 24 a 48 horas.

Tabla 4 Composición del medio YPG con concentración modificada.

COMPOSICION	CANTIDAD
Extracto de levadura	3 g/L
Peptona de caseína	20 g/L
Glucosa	20 g/L

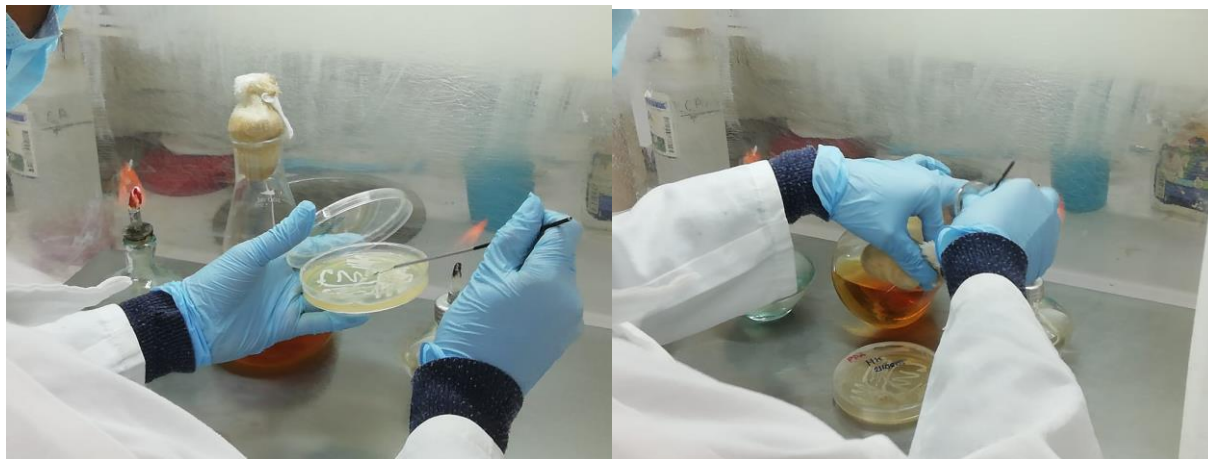


Figura 7 Inoculación del preinóculo para el diseño de pH y temperatura.

7.3.4 Elaboración de azul de metileno y conteo de células vivas en la cámara de Neubauer

Se prepararon 100 mL de azul de metileno a 2 diferentes concentraciones a 0.05 g/100 mL y a 0.02g/100 mL para esto se prepararon en matraces aforados con las cantidades de agua destilada correspondientes, se vertieron en matraces Erlenmeyer y se sometieron en agitación durante un día para su homogeneización, posteriormente se vertieron en frascos y se hicieron pruebas en la cámara de Neubauer para observar la concentración adecuada como se muestra en la figura 8.



Figura 8 Azul de metileno preparado y prueba en la cámara de Neubauer.

Acabado el tiempo de incubación del preinóculo se tomaron dos muestras del matraz con crecimiento homogeneizándolo previamente esto para la realización del conteo en la cámara de Neubauer como se muestra en la figura 9, utilizando 4 cuadrantes esto para obtener el número de células vivas presentes en un ml. Para obtener las cél/mL se debe hacer uso de la ecuación 1:

$$\frac{cel}{mL} = \frac{num.celulas\ contadas \times 10,000}{num.cuadrantes} \times dilución$$

Ecuación 1

Para el conteo en la cámara de Neubauer se realizaron los pasos que se muestran en el anexo III:

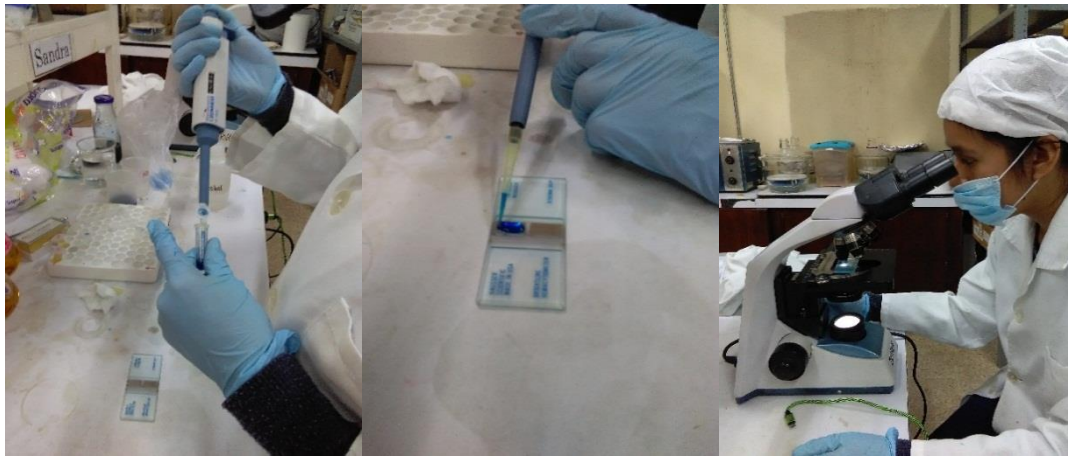


Figura 9 Preparación de la muestra para el conteo en la cámara de Neubauer.

7.3.5 Preparación de matraces para diseño

Se prepararon 1800 mL del medio líquido YPG con la concentración indicada en la tabla 4 posteriormente se les añadió 100 mL a 18 matraces de 250 mL y se le ajustó el pH a cada uno de los matraces como se puede ver en la figura 10, adicionándole ácido clorhídrico 1:1 o hidróxido de sodio 0.1N según los requerimientos. Después se esterilizó a 121°C a 15lb/plg² durante 15 minutos. A los matraces se les pusieron tapones de algodón y gasa poniendo a cada uno el capuchón y sellándolos con cinta para asegurar su esterilidad. Cada matraz se marcó con la codificación de pH y temperatura, identificando cada matraz según la numeración establecida en la tabla 3.



Figura 10 Ajuste del pH de cada matraz del diseño.

7.3.6 Inoculación e incubación de matraces para el diseño

Al término del conteo en la cámara de Neubauer se realizó el cálculo de los μL necesarios para inocular $1 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ a cada uno de los matraces del diseño. Antes de inocular se adicionó 0.05g de cloranfenicol. Al término de la inoculación los matraces se incubaron por 24 horas de acuerdo a las temperaturas indicadas por el diseño las cuales fueron 27°C 30°C y 32°C , el proceso para la inoculación e incubación es mostrado en la figura 11.

La tabla 5 muestra el volumen del preinóculo añadido a cada matraz del diseño planteado

Tabla 5 Cantidad añadida por cepa para la inoculación de cada matraz del diseño.

CEPA	Volumen añadido (μL)
<i>Kluyveromyces</i> (ITOYI002)	10
<i>Saccharomyces</i> (ITOYI003)	6150
<i>Schizosaccharomyces</i> (ITOYI008)	20



Figura 11 Inoculación de cada matraz del diseño e incubación.

7.3.7 Conteo de las células en la cámara de Neubauer

Al término de las 24 horas de incubación, se tomaron 2 muestras de cada matraz (previamente homogeneizado) en microtubos esto para la realización del conteo de las células en cuatro cuadrantes de la cámara (figura 12) y obtener los datos para los resultados de pH y temperatura óptima.

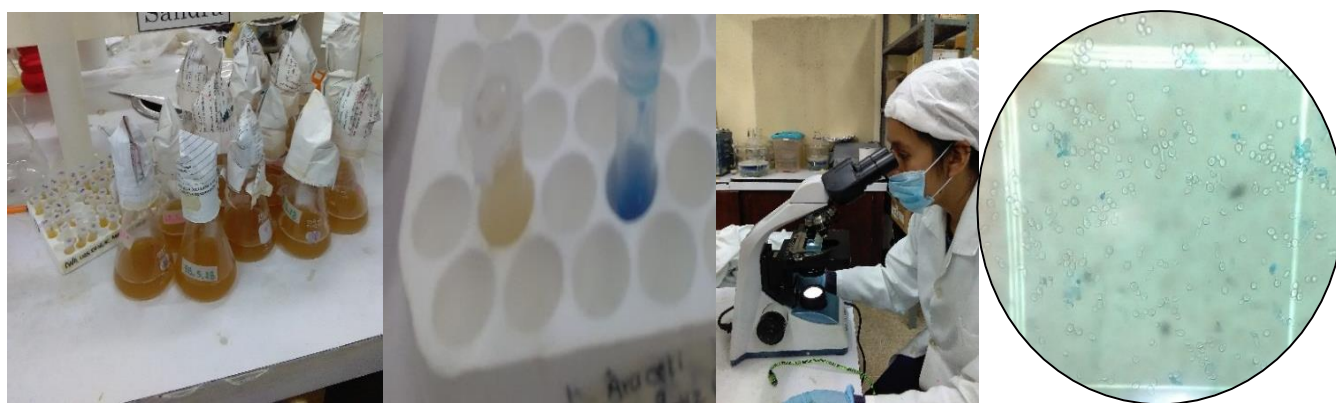


Figura 12 Preparación de muestras por matraz para conteo en la cámara de Neubauer.

7.3.8 Tiempo de incubación

Para el tiempo de incubación de las cepas fue determinado de acuerdo al crecimiento del preinóculo de cada experimento, se realizaron toma de muestras a las 24 y 48 horas de crecimiento y se realizó el conteo de células en la cámara de Neubauer para determinar si tenía el crecimiento necesario para inocular 1×10^6 cél/mL a cada matraz del diseño y de acuerdo a este experimento se observó el tiempo necesario para obtener un crecimiento notable.

7.4 Caracterización cinética

Para la elaboración de la cinética de crecimiento para cada una de las cepas se realizaron dos procedimientos uno en el cual se midió la densidad óptica con ayuda de un espectro marca POINTE180 CHEMYTRY ANALIZER a una longitud de onda de 600 nm y a la par se manejó el conteo de células viables haciendo uso de la cámara de Neubauer esto para la obtención de la curva de crecimiento con 12 puntos tomados cada 2 horas.

7.4.1 Elaboración de medio de cultivo para la cinética de crecimiento

Para la elaboración del medio de cultivo para el preinóculo se utilizó un matraz de 500 mL donde se adicionó 200 mL de medio de cultivo YPG con las concentraciones modificadas antes utilizadas y se le ajustó el pH de acuerdo a los resultados del diseño experimental mostrado en la tabla 6 esto para cada una de las cepas. El matraz con el medio de cultivo se esterilizó a 121°C a 12lb/plg² durante 20 minuto.

Tabla 6 Ajuste de pH de acuerdo a la cepa.

CEPA	pH
Saccharomyces	4
Kluyveromyces	6
Schizosaccharomyces	4

Para la preparación del medio de cultivo para la cinética de crecimiento se utilizaron 3 matraces Nefelométricos y 12 matraces Erlenmeyer por cada cepa, en cada uno de ellos se vertió 100 ml de medio de cultivo YPG con la concentración modificada que se manejó en el diseño de pH y temperatura, así también al medio de cultivo se le ajustó el pH de acuerdo a los resultados del diseño en cada cepa y como se mostró en la tabla 6. Para su esterilización los matraces fueron tapados con 3 capas de papel aluminio y se aseguraron con ligas, así mismo se le pusieron capuchones y se sellaron con cinta como se muestra en la figura 13. Las condiciones de esterilización fueron a 12 lb/plg² durante 20 minutos. Cada matraz se marcó para identificar los puntos de la cinética.



Figura 13 Preparación de medio de cultivo para la cinética con las condiciones de pH y esterilización.

7.4.2 Elaboración del preinóculo

Para la realización del preinóculo de cada cepa se utilizaron los matraces Erlenmeyer con el medio de cultivo, se le adicionaron 0.1g de cloranfenicol y posteriormente se inocularon con 4 asadas de la cepa correspondiente en cada matraz. El matraz del preinóculo de cada cepa se incubó como se muestra en la figura 14 siguiendo las condiciones descritas en la tabla 7.

Tabla 7 Condiciones para incubación de las cepas.

Cepa	Temperatura (°C)	Tiempo de incubación (h)
<i>Saccharomyces</i> (ITOYI002)	28	24
<i>Schizosaccharomyces</i> (ITOYI008)	30	48



Figura 14 Incubación del preinóculo con las condiciones indicadas.

7.4.3 Conteo de células vivas en la cámara de Neubauer

Después del tiempo de incubación del preinóculo, se tomaron 2 muestras en microtubos, esto en la campana, cuidando la esterilidad del medio. Teniendo las muestras se procedió al conteo en la cámara de recuento, el conteo se realizó en 4 cuadrantes de la cámara el cual se puede ver en la figura 15, sumando lo de los cuatro cuadrantes se utilizó la fórmula para obtener la cantidad de cél/mL. Esto se realizó para las 2 cepas de levaduras mostradas en la tabla anterior.

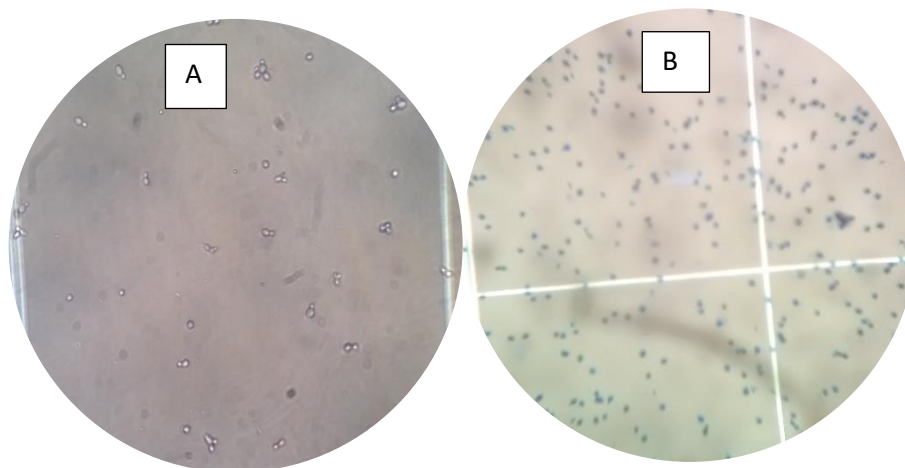


Figura 15 Células vistas en la cámara de Neubauer de la cepa *Saccharomyces* (ITOYI003) A: Células vivas B: Células muertas.

7.4.4 Inoculación e incubación de los matraces para la cinética

Al tener la cantidad necesaria de crecimiento para inocular 1×10^6 cél/mL del preinóculo de la cepa correspondiente, se procedió a calcular la cantidad en μL que se añadieron a cada uno de los matraces, a continuación en la campana de siembra se le añadieron 0.05g de cloranfenicol a cada uno de los matraces de la cinética de crecimiento, después de esto se inocularon los matraces con ayuda de una micropipeta como se observa en la figura 16, dejando un matraz nefelométrico sin inocular ya que este sirvió de blanco para la cinética de crecimiento.



Figura 16 Inoculación de los matraces utilizados en la cinética de crecimiento.

Después de la inoculación de los matraces se incubaron en 2 incubadoras en la temperatura marcada por el diseño, indicada en la tabla 6 estos matraces fueron incubados durante 24 horas para la realización de la cinética, utilizando cada matraz en orden dado.

7.4.5 Realización de la cinética de crecimiento

Para la realización de la cinética punto a punto, se utilizaron los matraces Nefelométricos; un matraz que fue el blanco y dos que se inocularon e incubaron en las condiciones adecuadas antes especificadas.

La cinética de crecimiento inició con cuatro horas de incubación, los puntos fueron leídos en el espectrofotómetro con ayuda de los matraces Nefelométricos como se puede ver en la figura 17. Para iniciar las lecturas de absorbancia se utilizó uno de estos matraces que contenía el blanco y a continuación se ocuparon los matraces con crecimiento para obtener los valores por duplicado, al término de las lecturas los matraces Nefelométricos se incubaban nuevamente para continuar el crecimiento por dos horas más, este procedimiento se utilizó para cada uno de los puntos de la cinética, en los últimos puntos fue necesario diluir para la cepa *Saccharomyces* (ITOYI003) ya que cuando el espectrofotómetro marcaba 0.98 se estableció que se realizarían diluciones, entonces, se utilizaron los matraces Erlenmeyer de acuerdo a las horas de crecimiento y a la numeración dada, para esto, en la campana de siembra se tomó una muestra en un vaso de precipitados, a continuación en la tabla 8 se muestra las diluciones utilizadas para su uso en la celda del espectrofotómetro.

Tabla 8 Dilución realizada para lectura en el espectrofotómetro.

DILUCIÓN	CANTIDAD DE MUESTRA (mL)	CANTIDAD DE AGUA DESTILADA (mL)
2	2	2
4	1	3
8	0.5	3.5



Figura 17 Lectura de la absorbancia en la cinética de crecimiento.

7.4.6 Realización de la cinética de crecimiento con conteo de células viables

La cinética de crecimiento por medio del conteo de células viables fue realizada de forma paralela al método espectrofotométrico. Para esto fue necesario utilizar los matraces Erlenmeyer incubados, la cinética se inició con 4 horas de crecimiento, a partir de ese punto, se tomaron dos muestras en microtubos del matraz correspondiente (previamente homogeneizados), y la cantidad sobrante se vertió en frascos de plástico previamente desinfectados y puestos al UV (figura 18), estos frascos se guardaron en congelación para su posterior uso cada frasco fue identificado según el punto de la cinética.

De las muestras tomadas por cada punto se llevaron a conteo en la cámara de Neubauer para tener la cantidad de cél/mL de acuerdo a la fórmula establecida y así obtener los puntos de la cinética de crecimiento.

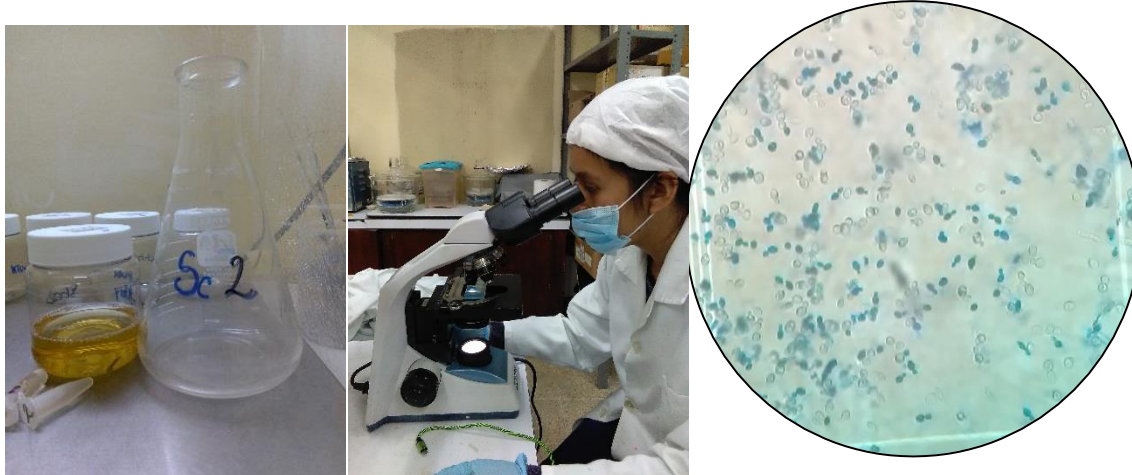


Figura 18 Vaciado en frascos del medio con crecimiento y toma de muestras para conteo en la cámara de Neubauer.

7.5 Gasto de sustrato

7.5.1 Azúcares reductores directos

Para obtener los datos sobre el consumo de azúcares en la cinética de crecimiento fue necesario realizar el procedimiento de determinación de azúcares reductores directos para ello se utilizaron las muestras congeladas de los puntos de la cinética, como primer paso se descongelaron las muestras para su manejo en el anexo IV se muestra el procedimiento que se realizó para cada una de las muestras, en las figuras 19 y 20 se pueden observar los pasos para la determinación de los azúcares reductores directos.



Figura 19 Preparación de muestras por punto para la determinación de azúcares reductores directos.



Figura 20 Titulación para obtener resultados de azúcares reductores directos.

El procedimiento se basó en el método de Lane-Eynon (método de Fehling) conforme a la AOAC 2002 que se basa en determinar si el azúcar posee poder reductor, debido a que los azúcares reductores tienen una coloración rojiza debido al óxido cuproso que se forma por oxidación del azúcar por medio del catión Cu^{2+} y en la norma para determinación de azúcares reductores directos la cual es la NMX-F-312-1978. Determinación de reductores directos y totales en alimentos.

Para los cálculos para obtener los azúcares reductores directos se hizo uso de la ecuación 2 basada en la norma:

$$\% \text{ de azúcares reductores directos} = \frac{10000 \cdot T}{V \cdot P} \quad \text{Ecuación 2}$$

7.6 Producción de etanol

Para la obtención de la producción de etanol, se realizó por medio del rendimiento teórico máximo de cada cepa analizada, para ello se hizo uso de los resultados de los azúcares reductores directos.

Para la cepa *Saccharomyces* sp (ITOY1002) se utilizó la ecuación 3 de acuerdo al rendimiento teórico máximo

$$g \text{ etanol} = \frac{0.51(X \text{ g glucosa})}{1 \text{ g glucosa}} \quad \text{Ecuación 3}$$

Para la cepa *Schizosaccharomyces sp* (ITOYI008) se utilizó la ecuación 4 de acuerdo a los datos del rendimiento teórico máximo

$$g\ etanol = \frac{0.485(X\ g\ glucosa)}{1\ g\ glucosa}$$

Ecuación 4

8 Resultados y discusión

8.1 Medio de cultivo óptimo y método de conservación de las cepas

De acuerdo a la metodología realizada, se pudo identificar que el medio de cultivo óptimo es el medio YPG puesto que contiene 2 fuentes de nitrógeno y 1 fuente de carbono lo que hace más enriquecido a este medio a comparación con el medio de cultivo PDA el cual solo tiene una fuente de nitrógeno y una fuente de carbono, esto es mostrado en la tabla 9.

Tabla 9 Nutrientes contenidos en cada medio probado.

MEDIO DE CULTIVO	FUENTE CARBONO	DE FUENTE NITRÓGENO
PDA	Dextrosa	-----
YPG	Glucosa	Peptona y extracto de levadura

De acuerdo con la metodología empleada para la conservación de las cepas se obtuvo que la manera más efectiva es en tubos con agar inclinado ya que por medio de este método existe menos contaminación y el tiempo de duración de la cepa es mayor que en las cajas de Petri. El medio de cultivo seleccionado es adecuado para conservar las cepas puesto que aporta lo mínimo necesario para que las levaduras puedan crecer.

8.2 Caracterización fisiológica

8.2.1 Obtención de pH y temperatura óptima.

De acuerdo a los datos obtenidos en el diseño de experimentos se tienen los siguientes resultados:

8.2.1.1 Cepa *Kluyveromyces sp* (ITOYI002)

Para la obtención del pH y temperatura óptima de crecimiento se obtuvieron como primer paso los resultados de cél/mL de acuerdo al diseño, los cuales son mostrados en la tabla 10

Tabla 10 Resultados de cél/mL de acuerdo al diseño de pH y temperatura para la cepa *Kluyveromyces*.

MATRAZ	pH	TEMPERATURA (°C)	Cél/mL 1×10^6
1	4	32	12
2	4	32	83
3	4	30	37
4	4	30	80
5	6	32	76
6	6	32	82
7	6	30	259
8	6	30	96
9	5	27	147
10	5	27	144
11	5	27	105
12	5	27	161
13	5	27	119
14	5	27	48
15	5	27	56
16	5	27	114
17	5	27	85
18	5	27	115

De acuerdo con los resultados de las cél/mL se utilizó el programa Minitab para obtener el análisis de varianza para obtener la variable que influye en el crecimiento de la cepa de levaduras.

Donde la hipótesis nula es la siguiente:

H_0 = Existe diferencia significativa entre las variables pH y temperatura para obtener el mejor crecimiento de las levaduras de la cepa *Kluyveromyces sp.*

En la tabla 11 se muestran los resultados de ANOVA realizado teniendo un nivel de confianza del 95% y un $\alpha = 0.05$

Tabla 11 Análisis de varianza para la cepa *Kluyveromyces sp.*

Parámetro	G. L	S.C	C.M	Fcal	P
Regresión	4	1.13843E+16	2.84606E+15	3.57	0.123
Lineal	2	5.73038E+15	1.53275E+15	1.92	0.260
pH	1	5.64921E+15	2.79706E+13	0.04	0.861
T	1	8.11678E+13	3.03753E+15	3.81	0.123
Cuadrático	1	3.7397E+15	3.7397E+15	4.68	0.096
pH ²	1	3.7397E+15	3.7397E+15	4.68	0.096
Interacción	1	1.91417E+15	1.91417E+15	2.40	0.196
pH-T	1	1.91417E+15	1.91417E+15	2.40	0.196
Residuales	4	3.19309E+15	7.98273E+14		
Error	4	3.19309E+15	7.98273E+14		
Total	8	1.45773E+16			

G.L: Grados de libertad, S.C: Suma de Cuadrados, C.M: Cuadrados medios, Fcal: F calculada
P: probabilidad

De acuerdo a los datos arrojados en la tabla, podemos observar que las variables no presentan una diferencia significativa ya que el pH representa un valor de $P = 0.861$ y la temperatura con un valor de $P = 0.123$, entonces al ser $P > 0.05$ significa que el crecimiento de la cepa no se ve afectada por el pH y la temperatura por lo que se puede manejar más rangos, lo que significa que la cepa es termotolerante.

Ahora con los datos de los coeficientes mostrados en la tabla 12 podemos establecer el modelo que representa la interacción del pH y la temperatura de acuerdo al crecimiento de las células (Y)

Tabla 12 Coeficientes para el modelo cuadrático de la cepa *Kluyveromyces sp.*

Término	Coeficientes
Constante	-656478000
pH	649462500
T	-81821250
pH*pH	-129002625
pH*T	21875625

De acuerdo a los coeficientes obtenidos, se realiza la ecuación del modelo cuadrático siguiendo la ecuación 5

$$X_1 + X_2 + X_1^2 + X_2^2 + X_1X_2 + C \quad \text{Ecuación 5}$$

Conforme a esto se tiene:

$$6.5 \times 10^8 pH + 8.2 \times 10^7 T - 1.3 \times 10^8 pH^2 + 2.18 \times 10^7 pHT - 6.56 \times 10^8 \quad \text{Ecuación 6}$$

Para obtener el pH y la temperatura óptima de crecimiento se hizo uso de las gráficas de superficie de respuesta obtenidas del programa Minitab que se muestran en las figuras 21 y 22 en donde se pueden observar los valores de pH y temperatura y el crecimiento de las levaduras según estas condiciones

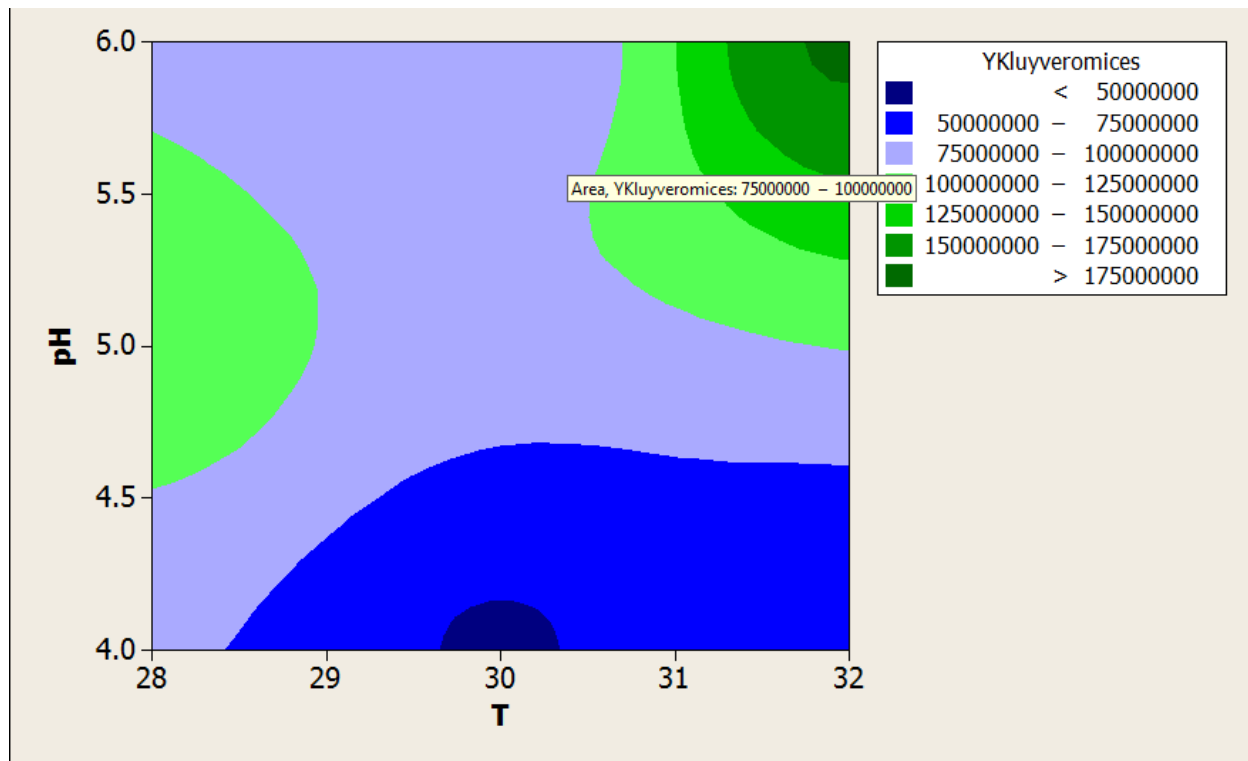


Figura 21 Gráfica de contornos para la cepa *Kluyveromyces sp.*

En la figura 21 se observa la gráfica de superficie de respuesta de la cepa *Kluveromyces sp* donde se puede apreciar de acuerdo a los colores de cada contorno el crecimiento que obtiene con los diferentes pH y temperaturas probadas en el diseño, obteniendo el menor crecimiento en un pH de 4 y una temperatura de 30°C lo cual está indicado en color azul rey, también nos marca el pH y la temperatura en la que hubo mayor crecimiento el cual está marcado con un color verde oscuro, estos valores corresponde a un pH de 6 y una temperatura de 32°C, estas son las condiciones óptimas de crecimiento de la cepa de levadura analizada.

En estudios realizados por Hashem *et al.*, 2013 empleando dos cepas *Kluyveromyces sp* ZMS1 y ZMS3 empleadas en la industria de los biocombustibles determinaron que los rangos de pH óptimos se encuentran entre 5- 5.5 a 35°C. En estudios reportados por Pilap *et al.*, 2018 con *Kluyveromyces marxianus* DBKKUY-103 estimaron que la mayor producción en jugo de sorgo dulce se obtuvo a temperaturas entre 37°C y 40°C. Este tipo de cepas fue probada por Castro y Roberto, 2014 por Fermentación Líquida a 45°C con glucosa y por Fermentación sólida (SSF) en paja de arroz a 30°C y 45°C obteniendo por fermentación líquida 21.5 g/L de Etanol a partir de 51.44 g/L de glucosa y en SSF un rendimiento de etanol de 0.24 g/g de sustrato; lo que demuestra la termotolerancia de esta cepa en diversos estudios

En la figura 22 se observa la gráfica de superficie donde se tiene como ejes a Y (crecimiento de las células) contra el pH y la temperatura en °C, se puede observar el área que presenta mayor crecimiento.

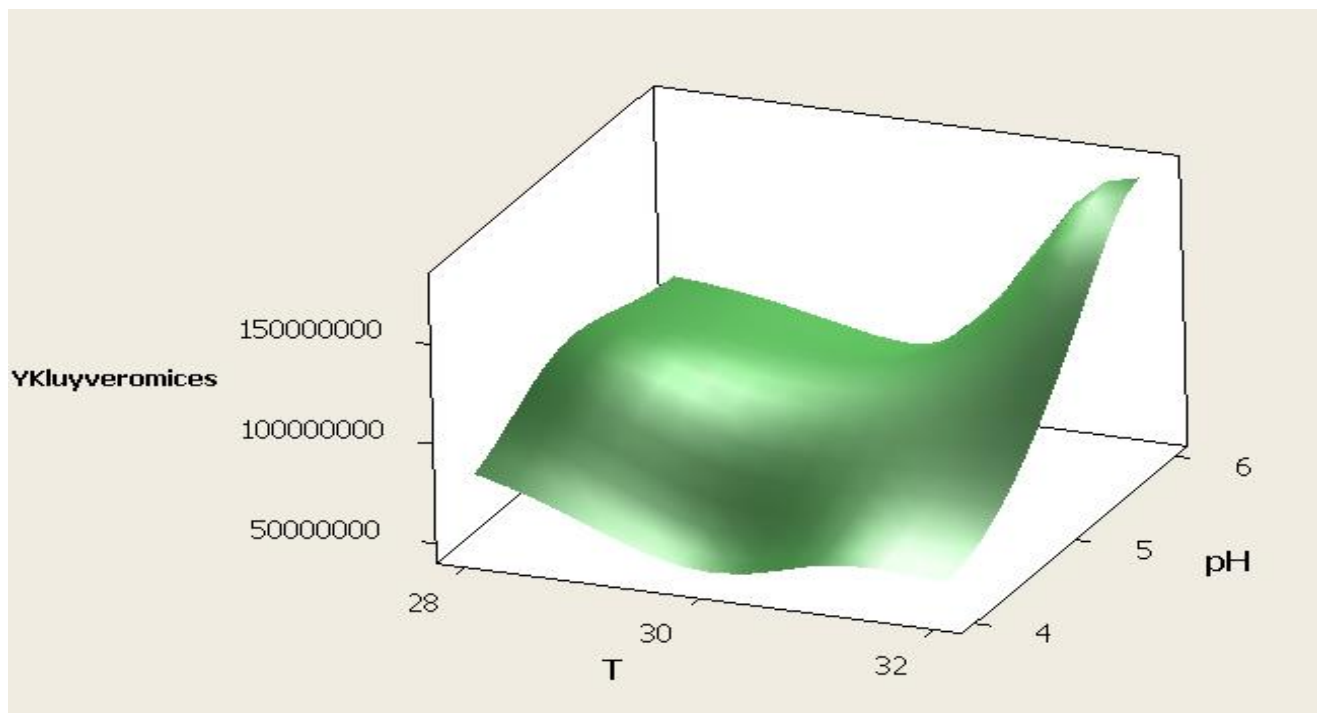


Figura 22 Superficie de respuesta de la cepa *Kluyveromyces* sp. Y (cél/mL) contra temperatura °C y pH.

8.2.2 Cepa *Saccharomyces* sp (ITOYI003)

En la tabla 13 se muestran los resultados obtenidos de células/mL con el pH y la temperatura ajustada a cada matraz.

Tabla 13 Resultados de cél/mL de acuerdo al diseño de pH y temperatura para la cepa *Saccharomyces*.

MATRAZ	pH	Temperatura (°C)	Cél/mL 1×10^6
1	4	32	164
2	4	32	203
3	4	30	108
4	4	30	57
5	6	32	145
6	6	32	84
7	6	30	44
8	6	30	76
9	5	27	65
10	5	27	50
11	5	27	49
12	5	27	112
13	5	27	80
14	5	27	112
15	5	27	71
16	5	27	88
17	5	27	78
18	5	27	54

De acuerdo a la cantidad de cél/mL se pudo obtener los datos necesarios para la elaboración del diseño en el programa Minitab conforme a esto se tienen los siguientes datos mostrados en la tabla 14 que contiene el análisis de varianza

Tabla 14 Análisis de varianza para la cepa *Saccharomyces*.

Parámetro	G.L	S.C	C.M	Fcal	P
Regresión	4	2.81810E+15	7.04525E+14	0.95	0.518
Lineal	2	8.65546E+14	4.32773E+14	0.59	0.599
pH	1	8.655460E+14	7.4086E+14	1.00	0.374
T	1	1.24685E+14	1.24685E+14	0.17	0.702
Cuadrático	1	1.00415E+15	1.00415E+15	1.36	0.309
pH ²	1	1.00415E+15	1.00415E+15	1.36	0.309
Interacción	1	9.48409E+14	9.48409E+14	1.28	0.321
pH-T	1	9.48409E+14	9.48409E+14	1.28	0.321
Residuales	4	2.95876E+15	7.39689E+14		
Error	4	2.95876E+15	7.39689E+14		
Total	8	5.77686E+15			

G.L: Grados de libertad, S.C: Suma de Cuadrados, C.M: Cuadrados medios, Fcal: F calculada
P: probabilidad

La hipótesis nula es:

H_0 = Existe diferencia significativa entre las variables pH y temperatura para obtener el mejor crecimiento de las levaduras de la cepa *Saccharomyces sp.*

Al analizar los datos del ANOVA y al basarnos con el nivel de confianza del 95%, es decir $\alpha=0.05$ podemos ver que el pH presenta un valor de $P= 0.374$ y la temperatura con un valor de $P=0.702$ y al tener ambas variables un valor de $P>0.05$ nos dice que no existe diferencia significativa, es decir, el crecimiento de la cepa no se ve afectado por las variables de pH y temperatura.

Ahora de acuerdo a los datos obtenidos con el programa podemos establecer el modelo que representa la interacción entre el pH y la temperatura, para esto tenemos la tabla 15 donde se pueden observar los coeficientes calculados de la regresión de acuerdo a Y promedio el cual simboliza el crecimiento de las células.

Tabla 15 Coeficientes para el modelo cuadrático.

Constante	-1246501566
pH	189568758
T	71407503
pH ²	21257126
pH*T	-15398126

De acuerdo a los coeficientes de la tabla 15 se obtiene el modelo cuadrático, el cual obedece a la ecuación 5:

Conforme a esto tenemos:

$$1.9 \times 10^8 \text{pH} + 7.14 \times 10^7 T + 2.12 \times 10^7 \text{pH}^2 - 1.53 \times 10^7 \text{pH}T - 1.24 \times 10^9 \quad \text{Ecuación 7}$$

Para obtener los datos de pH y temperatura óptima de crecimiento se hizo uso de las gráficas mostradas en las figuras 23 y 24 obtenidas del programa Minitab, en el cual tenemos primero el gráfico de superficie de contornos:

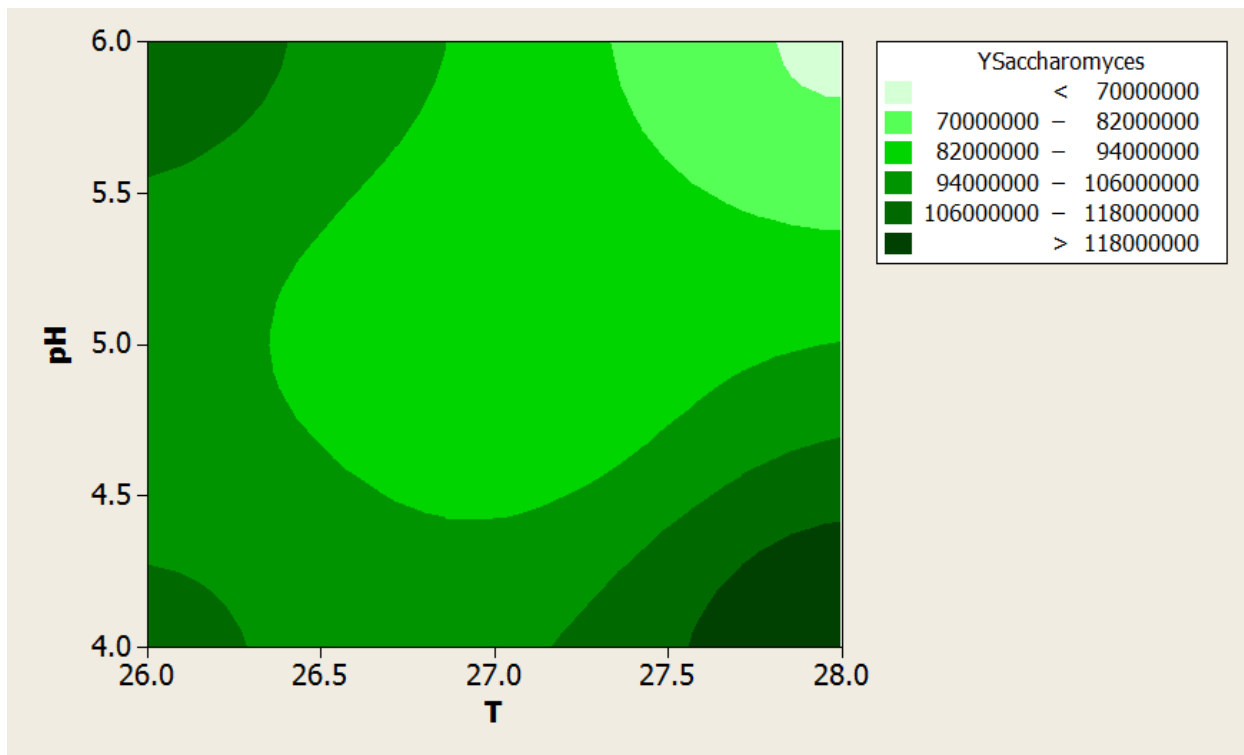


Figura 23 Superficie de respuesta para la cepa *Saccharomyces*.

En la gráfica mostrada en la figura 23 se puede apreciar de forma clara que el tono verde oscuro representa el área en donde se tiene mayor crecimiento, entonces de acuerdo al gráfico el pH óptimo de crecimiento es 4 con una temperatura óptima de 28°C, con estos valores se obtiene el mayor crecimiento de la cepa *Saccharomyces sp.*

Los resultados también pueden apreciarse en la figura 24 donde se tiene un gráfico de tercera dimensión que nos muestra el pH, la temperatura y el crecimiento máximo obtenido

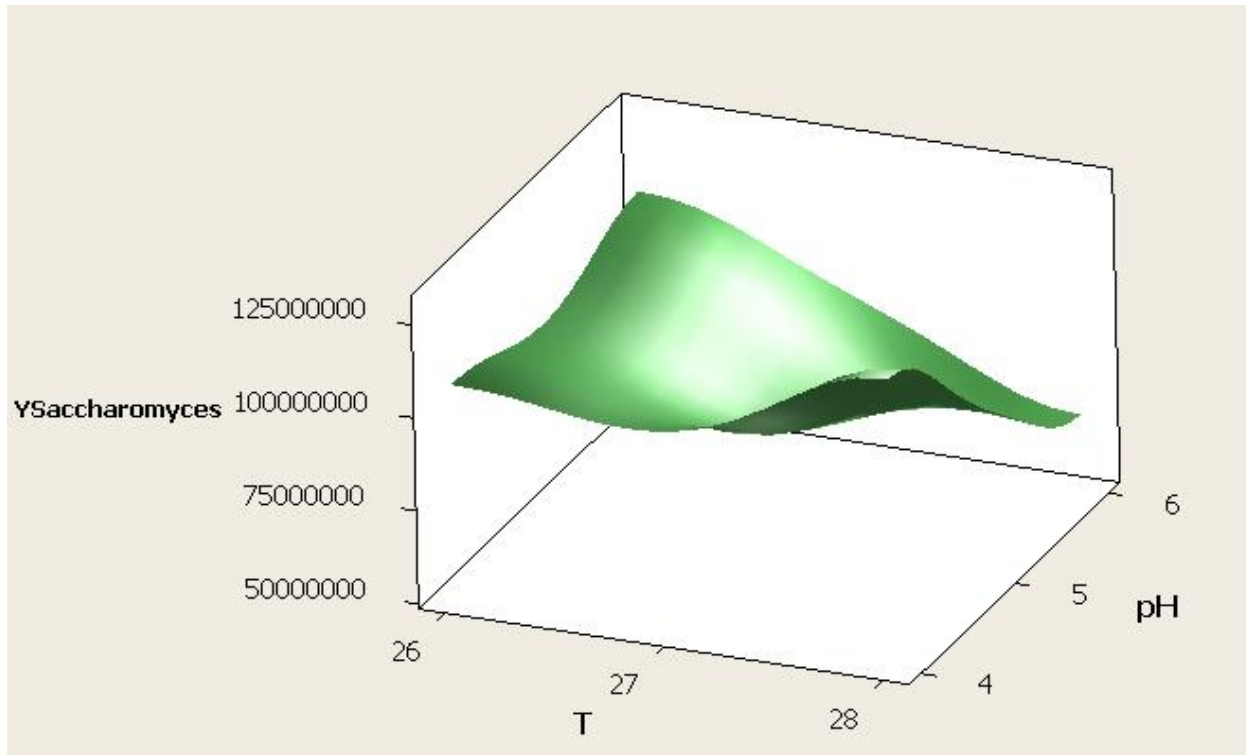


Figura 24 Superficie de respuesta. Y promedio (cél/mL) contra Temperatura (°C) y pH de la cepa *Saccharomyces sp.*

En contraste algunos estudios han aportado pruebas de que el dominio de *S. cerevisiae* sobre especies de levaduras no *Saccharomyces*, que generalmente tienen lugar en las primeras etapas de fermentación espontánea dependen no solo de la mayor tolerancia al etanol, sino también a la temperatura (Salvadó *et al.*, 2011; Alonso del Real *et al.*, 2017).

De acuerdo a lo encontrado por González et al., 2012 los cuales aislaron y caracterizaron molecularmente dos levaduras del género *Saccharomyces Cerevisiae*, tuvieron como resultado que la temperatura tiene influencia sobre el crecimiento y la obtención de biomasa y producción de etanol; para la producción de biomasa la temperatura intermedia es de 30°C y para la producción de etanol la temperatura favorable fue de 28°C. Encontraron que Para obtener mayores cantidades de etanol, el proceso debe acercarse a temperaturas más altas (30-32 ° C), y un pH alto (5.0-5.5)

8.2.3 Cepa *Schizosaccharomyces sp* (ITOYI008)

En la tabla 16 se muestran los resultados de la cantidad de cél/ml obtenidos de acuerdo al diseño planteado para obtener el pH y temperatura óptima de crecimiento

Tabla 16 Resultados de cél/mL de acuerdo al diseño de pH y temperatura de la cepa *Schizosaccharomyces sp*.

MATRAZ	pH	TEMPERATURA (°C)	Cél/mL 1×10^6
1	4	32	92
2	4	32	30
3	4	30	150
4	4	30	15
5	6	32	22
6	6	32	15
7	6	30	12
8	6	30	7
9	5	27	11
10	5	27	13
11	5	27	4
12	5	27	4
13	5	27	4
14	5	27	6
15	5	27	6
16	5	27	13
17	5	27	11
18	5	27	13

A partir de estos resultados se planteó el diseño en el programa Minitab para obtener el pH y temperatura óptima de crecimiento. Se obtuvo el análisis de varianza mostrado en la tabla 17, esto de acuerdo a los datos dados al programa.

Tabla 17 Análisis de varianza para la cepa *Schizosaccharomyces sp.*

Parámetro	G. L	S.C	C.M	Fcal	P
Regresión	4	6.16899E+15	1.54225E+15	118.09	0.000
Lineal	2	5.39100E+15	9.04104E+14	69.23	0.001
pH	1	3.11029E+15	1.74048E+15	133.27	0.000
T	1	2.28071E+15	6.77329E+13	5.19	0.085
Cuadrático	1	6.10027E+14	6.10027E+14	46.71	0.002
pH ²	1	6.10027E+14	6.10027E+14	46.71	0.002
Interacción	1	1.67962E+14	1.67962E+14	12.86	0.023
pH-T	1	1.67962E+14	1.67962E+14	12.86	0.023
Residuales	4	5.22391E+13	1.30598E+13		
Error	4	5.22391E+13	1.30598E+13		
Total	8	6.22123E+15			

G.L: Grados de libertad, S.C: Suma de Cuadrados, C.M: Cuadrados medios, Fcal: F calculada
P: probabilidad

El nivel de confianza utilizado para el análisis de varianza fue del 95% es decir el valor de α es igual a 0.05

Con los resultados de la columna de P en el cuadro anterior se observa que existe diferencia significativa en la variable de pH puesto que $P < 0.05$, esto nos indica que esta variable tiene efecto sobre el crecimiento de las levaduras.

La producción de biomasa se ve afectada por el pH, pero no por la temperatura ya que $P > 0.05$

En base a los datos de los coeficientes mostrados en la tabla 18 podemos establecer el modelo que representa la interacción del pH y la temperatura de acuerdo al crecimiento de las células (Y)

Tabla 18 Coeficientes para el modelo cuadrático de la cepa *Schizosaccharomyces* sp.

Término	Coeficiente
Constante	2566178000
pH	-749785000
T	-36515000
pH*pH	52102000
pH*T	6480000

Conforme los datos obtenidos se realizan la ecuación del modelo cuadrático basándonos en la ecuación 5

Entonces tenemos que el modelo cuadrático que representa la interacción entre el pH y la temperatura es la siguiente:

$$-7.5 \times 10^8 \text{pH} - 3.6 \times 10^7 T + 5.2 \times 10^7 \text{pH}^2 + 6.48 \times 10^6 \text{pH}T + 2.56 \times 10^9 \quad \text{Ecuación 8}$$

Para la obtención del pH y temperatura óptima de crecimiento se utilizaron las gráficas de superficie de respuesta (figura 25 y 26) proporcionadas por el programa Minitab, a continuación, se presenta la figura 25 con los datos presentados en una gráfica de contornos:

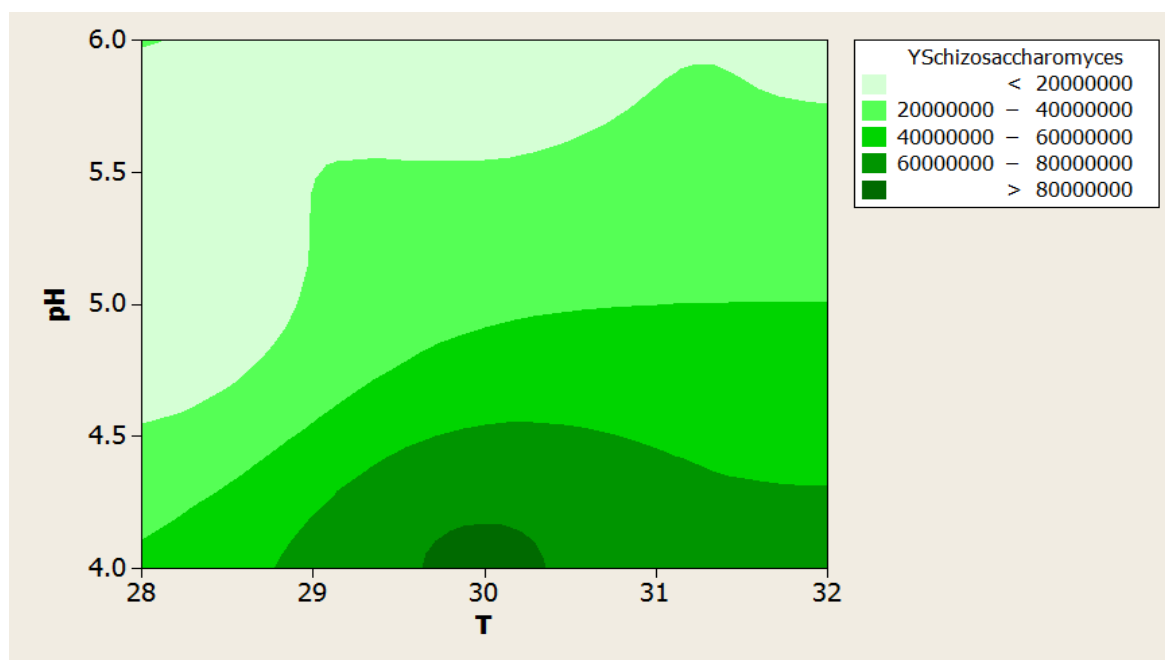


Figura 25 Superficie de respuesta para la cepa *Schizosaccharomyces*

En base a lo observado en la figura 25 nos podemos dar cuenta que en la zona con color verde claro representa el pH y la temperatura en la cual hubo la menor cantidad de crecimiento esto en cél/mL, la zona en donde marcó mayor crecimiento es en tono verde oscuro con un pH de 4 y una temperatura de 30°C, estos datos pertenecen a los óptimos para lograr un mayor crecimiento.

Otra visualización del pH y la temperatura con respecto al crecimiento (Y promedio) se muestra en el gráfico de superficie observado en la figura 26 cuyos ejes son Y promedio contra temperatura (°C) y pH.

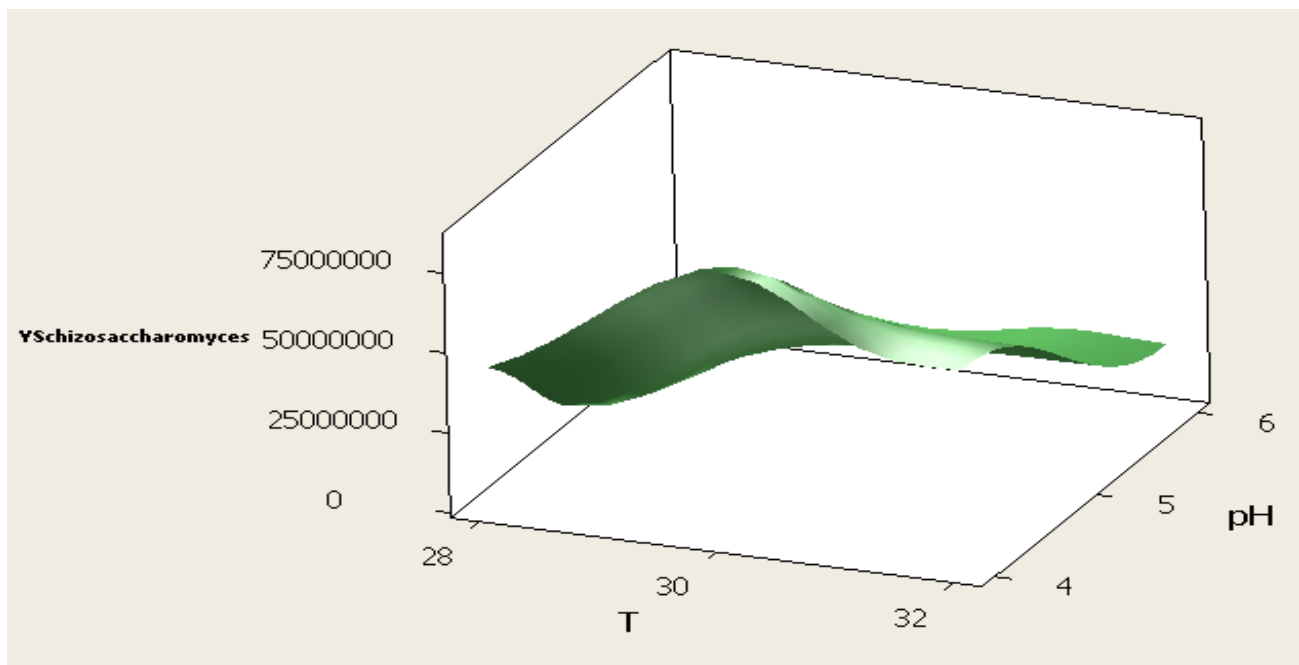


Figura 26 Superficie de respuesta de la cepa *Schizosaccharomyces* sp con ejes Yprom (cél/mL) contra temperatura (°C) y pH.

8.2.4 Tiempo de incubación

De acuerdo a lo realizado en la metodología los resultados de tiempo de incubación de cada cepa se muestran en la tabla 19 donde se puede observar que tanto la cepa *Saccharomyces* como *Schizosaccharomyces* necesitan de un tiempo de 48 horas de incubación para obtener la mayor cantidad de células viables y que la cepa que alcanza el mayor número de células viables en el medio de cultivo YPG es la cepa de *Kluyveromyces* con un tiempo de incubación de 24 horas.

Tabla 19 Tiempo de incubación adecuada para cada cepa.

CEPA	TIEMPO DE INCUBACIÓN
<i>Kluyveromyces</i> (ITOYI002)	24
<i>Saccharomyces</i> (ITOYI003)	48
<i>Schizosaccharomyces</i> (ITOYI008)	48

8.3 Caracterización cinética

Para la caracterización cinética se utilizaron las cepas ITOYI003 correspondiente a *Saccharomyces sp* y la cepa ITOYI008 que corresponde a *Schizosaccharomyces*, se omitió la cepa de *Kluyveromyces* (ITOYI002) puesto que las condiciones de crecimiento no fueron satisfactorias para su crecimiento, pues al realizar el preinóculo no presentaba el suficiente crecimiento para su posterior uso.

8.3.1 Cepa *Saccharomyces sp* (ITOYI003)

8.3.1.1 Método espectrofotométrico y método por medio de células viables

A continuación, se muestra la tabla 20 con los resultados de absorbancia medida en cada punto de la cinética, en la cual se tomaron 2 lecturas por punto, obteniendo con estos datos la absorbancia promedio y la desviación estándar la cual nos indica que tan dispersos se encuentra nuestros datos de la media para la cepa *Saccharomyces sp* la desviación estándar nos muestra que no existe mucha dispersión respecto al valor de la media principalmente en las primeras 10 horas de crecimiento de las levaduras, el punto donde se observa mayor dispersion de los datos es a las 22 horas de la cinética de crecimiento .

Tabla 20 Resultados de la cinética de crecimiento por el método espectrofotométrico y la desviación estándar de la cepa *Saccharomyces sp*.

Tiempo (h)	punto	absorbancia 1	absorbancia 2	absorbancia promedio	Desviación. Estándar
4	1	0.074	0.064	0.069	0.00707107

6	2	0.02	0.022	0.021	0.00141421
8	3	0.038	0.032	0.035	0.00424264
10	4	0.074	0.07	0.072	0.00282843
12	5	0.158	0.136	0.147	0.01555635
14	6	0.304	0.199	0.2515	0.07424621
16	7	0.573	0.37	0.4715	0.14354268
18	8	0.872	0.552	0.712	0.22627417
20	9	1.442	0.758	1.1	0.48366104
22	10	3.068	3.756	3.412	0.48648947
24	11	2.948	3.004	2.976	0.03959798
26	12	3.888	3.16	3.524	0.51477374

De acuerdo a la metodología para la cinética por medio de células viables se calcularon la cantidad de cél/mL en cada uno de los 12 puntos, los resultados se observan en la tabla 21

Tabla 21 Resultados de la cinética por medio del conteo en la cámara de Neubauer para la cepa *Saccharomyces sp.*

Punto	Tiempo (h)	Cél/mL $\times 10^5$
1	4	3.25
2	6	10.65
3	8	48.95
4	10	48.60
5	12	249.975
6	14	322.65
7	16	395.32
8	18	1114.08
9	20	1832.85
10	22	940.05
11	24	860.62
12	26	781.20

En la gráfica mostrada en la figura 27 se observa el comportamiento de los datos obtenidos tanto en la medición de absorbancia como en el crecimiento de las cél/mL

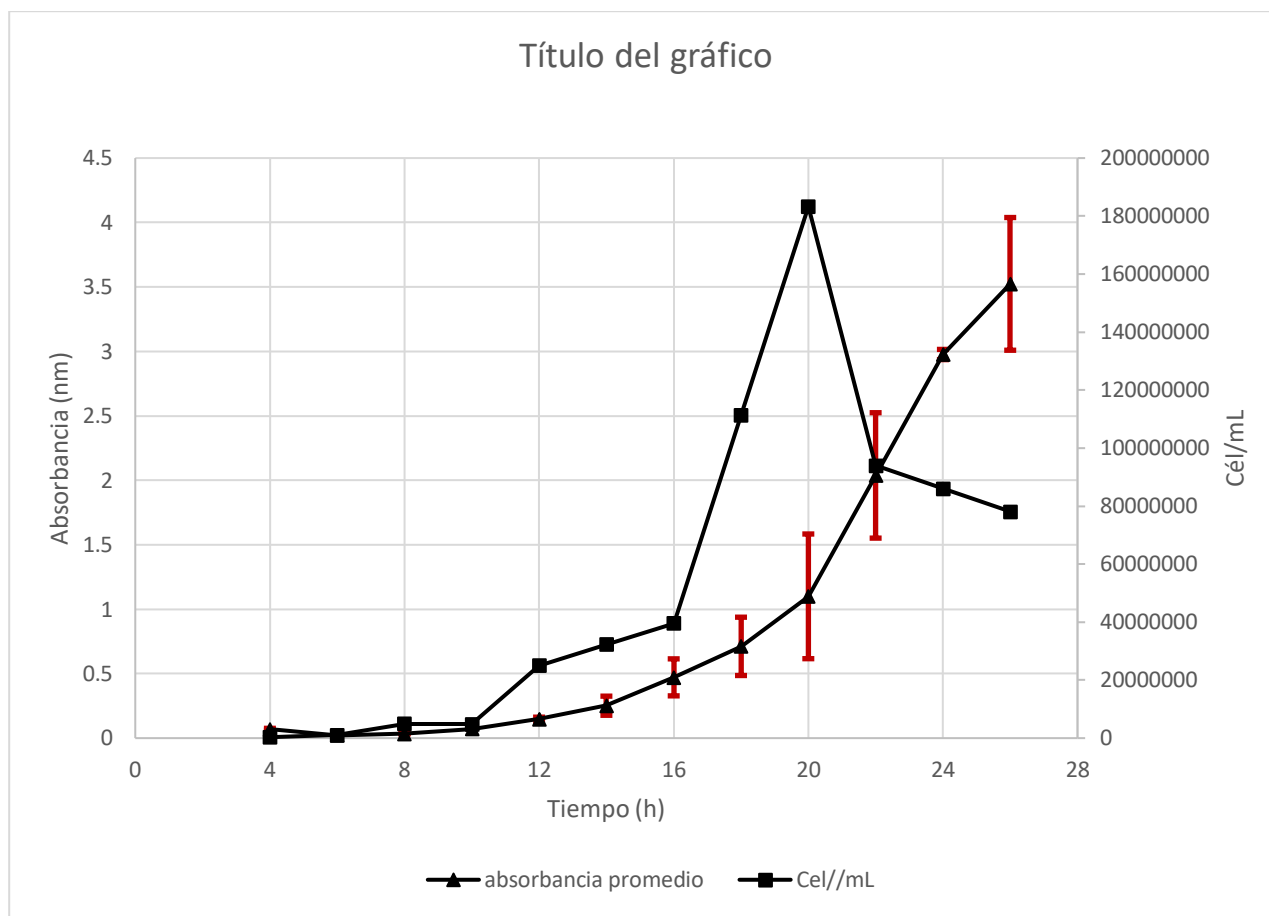


Figura 27 Comportamiento de los datos de la cinética de crecimiento por medio de la absorbancia como por cél/mL para la cepa *Saccharomyces*.

De acuerdo a la figura 27 que muestra el comportamiento de la cinética de crecimiento podemos observar que tanto la línea que representa la medición de la absorbancia y la que representa las cél/mL; presentan una fase de adaptación pequeña puesto que la cinética de crecimiento se empezó con 4 horas de incubación, también podemos observar que presentan un crecimiento exponencial lo cual se hace notorio en la línea correspondiente a la medición de la absorbancia, puesto que se observa de manera más pronunciada el cambio de la fase de adaptación a la fase exponencial sin llegar a la fase estacionaria. En el caso de la línea que representan las cel /mL se puede ver que a las 20 horas de crecimiento presentó la mayor cantidad de crecimiento, después de este punto la cantidad de cél/mLvivas decreció de forma significativa debido a que los nutrientes presentes en el medio se consumieron en las horas anteriores.

8.3.2 Cepa *Schizosaccharomyces sp* (ITOYI008)

8.3.2.1 Método espectrofotométrico y método por células viables

En la tabla 22 nos muestra los resultados de la absorbancia leída, por cada punto de la cinética se tienen 2 lecturas, con estos datos se obtuvo el valor de la absorbancia promedio, así como la desviación estándar de cada uno.

Tabla 22 Resultados de la cinética de crecimiento por el método espectrofotométrico de la cepa *Schizosaccharomyces sp*.

Punto	Tiempo (h)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia prom	Desviación. Estándar
1	4	0.007	0.003	0.005	0.002828427
2	6	0.012	0.009	0.0105	0.00212132
3	8	0.011	0.006	0.0085	0.003535534
4	10	0.014	0.02	0.017	0.004242641
5	12	0.022	0.021	0.0215	0.000707107
6	14	0.046	0.05	0.048	0.002828427
7	16	0.096	0.082	0.089	0.009899495
8	18	0.124	0.120	0.122	0.002828427
9	20	0.162	0.147	0.1545	0.010606602
10	22	0.219	0.237	0.228	0.012727922
11	24	0.254	0.249	0.2515	0.003535534
12	26	0.314	0.259	0.2865	0.038890873

De acuerdo a la metodología empleada en la cinética realizada por conteo de células viables se puede observar en la tabla 23 los resultados obtenidos de la cantidad de cél/mL presentes en cada uno de los puntos.

Tabla 23 Resultados de la cinética por medio del conteo en la cámara de Neubauer para la cepa *Schizosaccharomyces sp.*

Punto	Tiempo (h)	Cél/ml
1	4	55000
2	6	135000
3	8	400000
4	10	280000
5	12	2385000
6	14	4015000
7	16	2725000
8	18	2935000
9	20	12600000
10	22	16620000
11	24	20640000
12	26	24660000

En la gráfica presentada en la figura 28 se observa el comportamiento de los datos obtenidos tanto en la medición de absorbancia como en el crecimiento de las células/mL, en ambas líneas tanto la que representa la absorbancia como la de células/mL tienen una fase de adaptación corta, puesto que la cinética se empezó con 4 horas de incubación las cuales representan su fase de adaptación además de que al ocupar el preinóculo en la experimentación, se reduce el tiempo que tardan las levaduras a adaptarse al medio y a las condiciones. En ambos métodos de la cinética, en el gráfico se muestra el cambio de la fase de adaptación a la fase exponencial, sin llegar a la fase estacionaria.

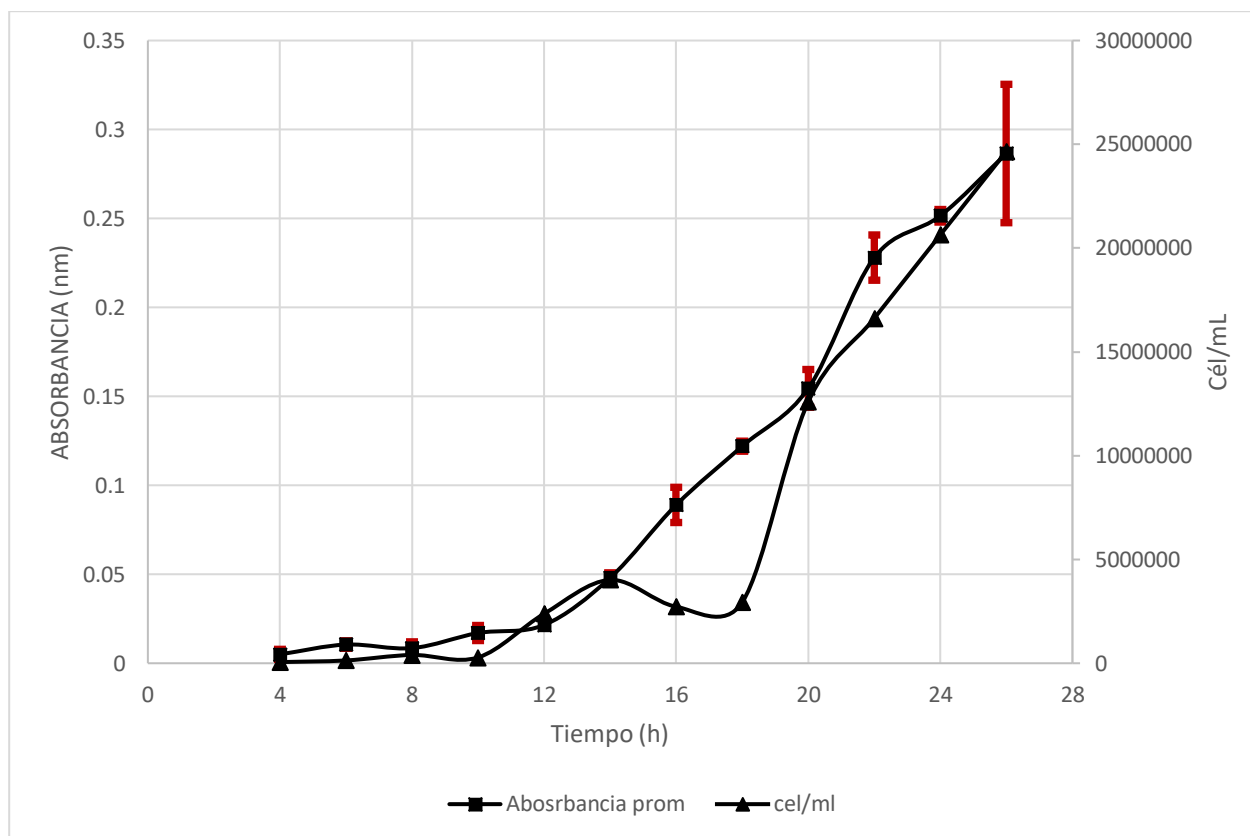


Figura 28 Comportamiento de los datos de la cinética de crecimiento por medio de la absorbancia y por cél/mL de la cepa *Schizosaccharomyces sp*

Comparando lo obtenido en la cinética de la cepa *Saccharomyces sp*(ITOYI003) y la cepa *Schizosaccharomyces sp* (ITOYI008) se hace notorio que la absorbancia leída fue mayor en el género *Saccharomyces sp* lo que representa mayor crecimiento de igual forma también se observa esto en la cantidad de cél/mL

8.4 Gasto de sustrato y producción de etanol

Para la obtención del gasto de sustrato se utilizó los resultados de los azúcares reductores directos calculado por cada punto de la cinética.

8.4.1 Cepa *Saccharomyces sp* (ITOYI003)

En la tabla 24, se muestran los resultados del gasto de glucosa durante el período de la realización de la cinética

Tabla 24 Azúcares presentes en cada punto de la cinética (ARD) y consumo de glucosa de la cepa *Saccharomyces sp*.

Punto	Tiempo(h)	ARD (%)	Consumo de glucosa (%)
1	4	2	0
2	6	2	0
3	8	2	0
4	10	1.92	0.08
5	12	1.82	0.18
6	14	1.71	0.29
7	16	1.54	0.46
8	18	1.31	0.69
9	20	1.17	0.83
10	22	0.922	1.078
11	24	0.714	1.286
12	26	0.555	1.445

En la tabla 24 se puede observar que en los azúcares reductores obtenidos van en disminución conforme avanzan los puntos en la cinética de crecimiento, esto representa que con el paso del tiempo las levaduras van consumiendo la fuente de carbono que es este caso es la glucosa. Además, en la columna de consumo de glucosa representa la cantidad de sustrato consumido respecto a la cantidad inicial.

Al tener el consumo se sustrato, se obtiene la producción de etanol en gramos, esto de acuerdo al rendimiento teórico presentado en la ecuación 3 dichos resultados son presentados en la tabla 25.

Tabla 25 Resultados de consumo de sustrato y producción de etanol durante la cinética de la cepa *Saccharomyces sp.*

Punto	Tiempo(h)	Consumo de glucosa (%)	Producción de etanol (g)
1	4	0	0
2	6	0	0
3	8	0	0
4	10	0.08	0.0408
5	12	0.18	0.0918
6	14	0.29	0.1479
7	16	0.46	0.2346
8	18	0.69	0.3519
9	20	0.83	0.4233
10	22	1.078	0.54978
11	24	1.286	0.65586
12	26	1.445	0.73695

Conforme a los resultados sobre azúcares reductores directos (sustrato presente) y la producción de etanol visto en las tablas 24 y 25 podemos observar la gráfica mostrada en la figura 29 con el comportamiento de los datos de la cepa *Saccharomyces sp.*:

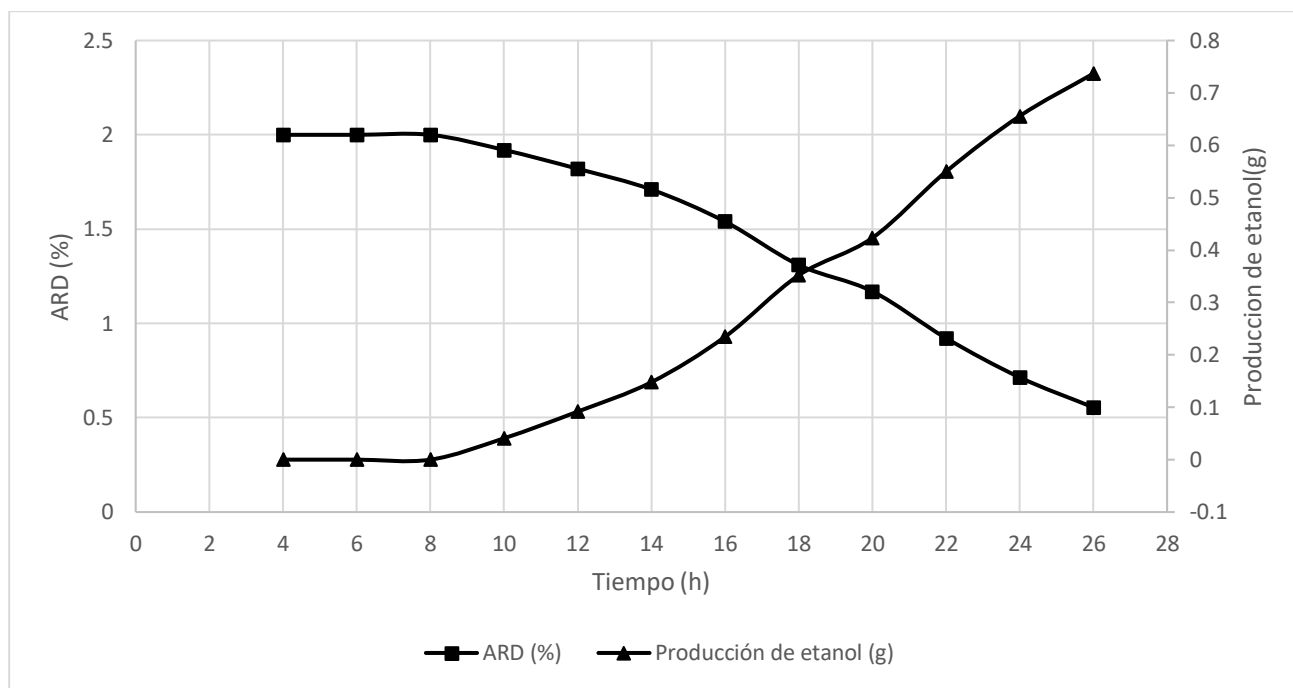


Figura 29 Comportamiento del consumo de glucosa y producción de etanol de la cepa *Saccharomyces sp*

En la figura 29 se observa que conforme se consume la glucosa se va produciendo etanol, la línea que representa los azúcares reductores directos (sustrato presente en cada punto) en la cual tiene como inicio una concentración de glucosa de 2% (2g/100ml) y al final una concentración de 0.55%(0.55g/100ml). Respecto a la línea que representa la producción de etanol se tiene que en las primeras 8 horas no hubo producción de etanol debido a que fue el tiempo de adaptación de las levaduras en el medio y no hubo consumo de sustrato por lo que en esos puntos aun no comienza la fermentación, la producción de etanol inició en la fase exponencial de la cinética que se muestra en el cuarto punto es decir a partir de las 10 horas de crecimiento siendo así que en el último punto se obtuvo una cantidad de 0.736 gramos de etanol.

Las células de *Saccharomyces cerevisiae* en la fase exponencial mantienen su crecimiento al producir ATP a través de la fermentación y/o respiración mitocondrial. La concentración de carbono fermentable regula principalmente cómo las células de levadura generan ATP; así, la variación en el nivel de carbohidratos fermentables impulsa el metabolismo energético de *S. cerevisiae* (Olivares-Marín *et al.*, 2018).

8.4.2 Cepa *Schizosaccharomyces* sp (ITOYI008)

En la tabla 2 se muestran los resultados de los cálculos de los azúcares presentes en cada punto de la cinética de crecimiento (ARD) además del consumo de sustrato (glucosa) de acuerdo a la cantidad inicial de glucosa la cual es 2g/100mL.

Tabla 26 Resultados de los azúcares presentes y consumo de glucosa en cada punto de la cinética de la cepa *Schizosaccharomyces*.

Punto	Tiempo(h)	ARD (%)	Consumo de glucosa (%)
1	4	1.82	0.18
2	6	1.78	0.22
3	8	1.70	0.30
4	10	1.68	0.32
5	12	1.68	0.32
6	14	1.61	0.39
7	16	1.55	0.45
8	18	1.50	0.5
9	20	1.34	0.66
10	22	1.09	0.91
11	24	0.917	1.083
12	26	0.812	1.188

Se puede observar que en los datos de azúcares reductores directos (cantidad de glucosa presente en cada punto de cinética) van disminuyendo conforme avanza el tiempo de la cinética, esto representa el consumo por parte de las levaduras para su crecimiento. En la columna de consumo de glucosa representa la cantidad de glucosa utilizada por las levaduras estas cantidades van incrementándose conforme avanza la cinética, ya que conforme pasa el tiempo las levaduras van consumiendo más sustrato para su crecimiento.

Teniendo los resultados de consumo de sustrato (glucosa) podemos obtener la cantidad en gramos de la producción de etanol esto de acuerdo al rendimiento teórico, los resultados son mostrados en la tabla 27:

Tabla 27 Resultados del consumo de glucosa y la producción de etanol para cada punto de la cinética de la cepa *Schizosaccharomyces* sp.

Punto	Tiempo(h)	Consumo de glucosa (%)	Producción de etanol (g)
1	4	0.18	0.0873
2	6	0.22	0.1067
3	8	0.3	0.1455
4	10	0.32	0.1552
5	12	0.32	0.1552
6	14	0.39	0.18915
7	16	0.45	0.21825
8	18	0.5	0.2425
9	20	0.66	0.3201
10	22	0.91	0.44135
11	24	1.083	0.525255
12	26	1.188	0.57618

De acuerdo a los resultados obtenidos en la columna de azúcares reductores directos (sustrato presente) y la producción de etanol vistos en las tablas 26 y 27 podemos obtener la gráfica presentada en la figura 30.

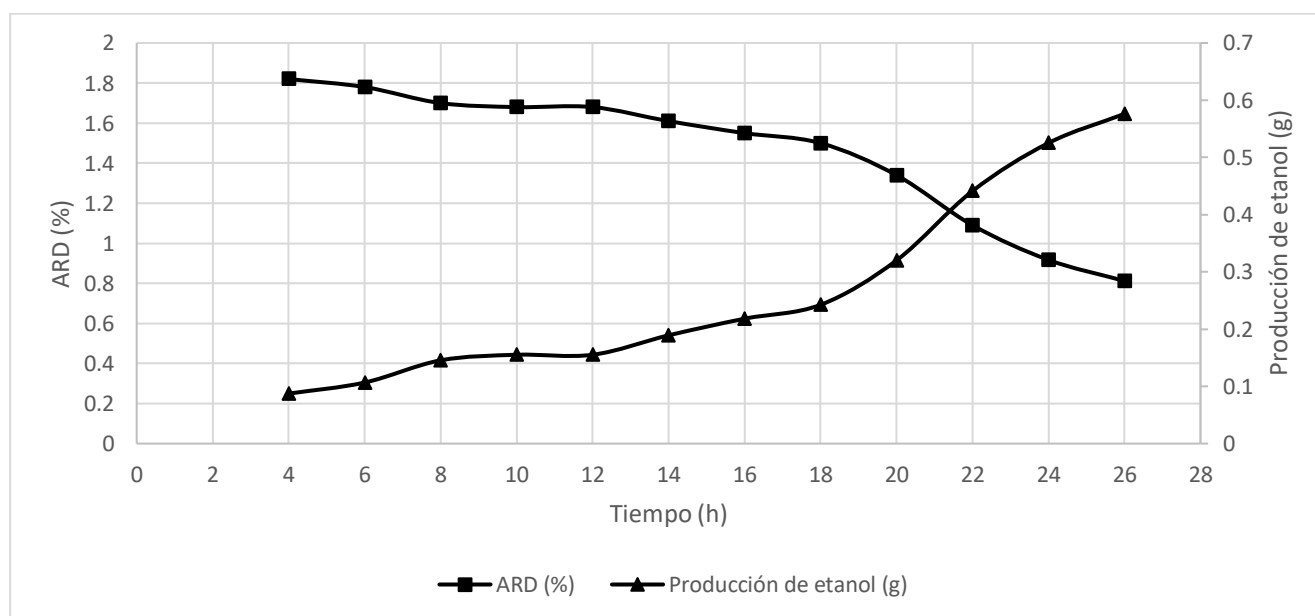


Figura 30 Comportamiento del consumo de glucosa y la producción de etanol de la cepa *Schizosaccharomyces*.

En la figura 30 se muestra el comportamiento del consumo de sustrato (glucosa) de acuerdo a la línea que representa a los ARD es decir el sustrato presente en cada punto, se observa que va decreciendo conforme avanza la cinética obteniéndose un valor al final de 0.812 % (0.812g/100mL) y a su vez la cantidad de etanol producido en gramos va en aumento teniendo en el final de la cinética una cantidad de 0.57618 g.

La capacidad fermentativa de *Schizosaccharomyces sp* se basa en la presencia de alcohol deshidrogenasa, *adh4* que complementa la fermentación alcohólica (Sakurai *et al.*, 2004).

Como datos encontrados en estudios sobre fermentación del mezcal podemos ver que Nevárez *et al.*, 2011 en estudios de compuestos producidos durante la fermentación de mezcal encontraron que la capacidad fermentativa en jugo de *Agave duranguensis* de *Hanseniaspora uvarum*, *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae* aumentaron a 28°C. Identificaron compuestos como alcohol etílico, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol, ácido acético, 1- (2-furanil) -etanona, furfural, α -terpineol, acetato de etilfenilo y fenil compuestos que proporcionan al mezcal su aroma característico. En producción de Etanol a partir de jugo de *Agave cupreata* *Kluyveromyces marxianus* presentó el mayor rendimiento de etanol (12.46%v/v), en concentraciones de azúcares de 12 °Brix y una temperatura de 28 °C; en contraste *Kluyveromyces marxianus var Drosophilarum* con 12 y 14° Brix a 25 y 30°C (12.42% v/v) a nivel matraz (Pérez *et al.*, 2013). La capacidad de *S. cerevisiae* para competir con otras especies microbianas durante los procesos de fermentación alcohólica, se ha atribuido tradicionalmente a su alto poder fermentativo y su capacidad para soportar las condiciones ambientales extremas, es decir, altos niveles de etanol y ácidos orgánicos, bajos valores de pH, escasa disponibilidad de oxígeno y agotamiento de ciertos nutrientes (Albergaria y Arneborg, 2016)

9 Conclusión

En base a la experimentación se puede concluir que el medio de cultivo que proporciona mejores condiciones de crecimiento para las cepas de levaduras es YPG puesto que contiene mayor cantidad de nutrientes indispensables para el crecimiento. De acuerdo al procedimiento realizado para obtener las condiciones óptimas de crecimiento de cada cepa se puede concluir que el pH y la temperatura son factores que no influyen directamente en el crecimiento de la cepa *Saccharomyces sp* pero se debe tener controladas estas condiciones para obtener mayor cantidad de biomasa. En el caso de *Schizosaccharomyces sp* la variable que tiene mayor influencia en el crecimiento de las levaduras es el pH, así mismo las gráficas de superficie de respuesta nos mostraron la temperatura y el pH para obtener mayor crecimiento estos resultados fueron utilizados para la caracterización cinética. La caracterización cinética nos mostró el comportamiento de las cepas *Saccharomyces* y *Schizosaccharomyces*. comparando las gráficas de cada cepa por el método espectrofotométrico se puede observar que la cepa *Saccharomyces sp* presentó un crecimiento más rápido pues la absorbancia iba en aumento en cada punto en comparación de la cepa *Schizosaccharomyces sp* que llegó a la fase exponencial con menor crecimiento mostrado a través de la absorbancia, de acuerdo a esto se puede concluir que la cepa que genera mayor cantidad de biomasa y mayor cantidad de células viables es la cepa *Sacharomyces sp*, cabe destacar que la cepa *Kluyveromyces sp* no se le realizó la caracterización cinética puesto que las condiciones del medio no resultaron adecuadas para obtener la cantidad suficiente para la inoculación de los matraces.

Para los resultados obtenidos en el consumo de sustrato y producción de etanol se puede concluir que la cepa *Saccharomyces* tiene mayor consumo de sustrato (glucosa) y también mayor producción de etanol que la cepa *Schizosaccharomyces*.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. Albergaria, H. y Arneborg, N. 2016. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1-12.
2. Alcázar, V.E.M. 2011. Capacidades fermentativas y generación de volátiles de cepas de levaduras aisladas en diferentes estados productores de mezcal. Tesis de maestría, Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica y Diseño del Estado de Jalisco, Jalisco, Mexico. Consultado en <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/91/1/Elba%20Montserrat%20Alcazar%20Valle.pdf>
3. Alonso-del-Real, J., Lairón-Peris, M., Barrio, B., y Querol, A. 2017. Effect of Temperature on the Prevalence of *Saccharomyces Non cerevisiae* Species against a *S. cerevisiae* Wine Strain in Wine Fermentation: Competition, Physiological Fitness, and Influence in Final Wine Composition. *Frontiers in Microbiology*. 8: 1-15.
4. Bai, F.W. Anderson, W.A. Moo-Young, M. 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology advances*. 26: 89-105.
5. Castañón, R.J.F. 2014. Producción secuencial de xilitol y etanol a partir de hidrolizado de bagazo de caña utilizando levaduras autóctonas. Tesis de doctorado. Instituto Tecnológico de Veracruz, Veracruz, Ver, México.
6. Castro, R.C.A., and Roberto, I.C. 2014. Selection of a Thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* Strain with Potential Application for Cellulosic Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*, 172:1553–1564.
7. González-Hernández, J.C., Pérez, E., Damián, R.M. y Chávez-Parga, M.C. 2012. Isolation, molecular and fermentative characterization of a yeast used in ethanol production during mezcal elaboration. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11:389-400.
8. Hashem, M., Zohri, A.N.A. y Ali, M.M.A. 2013. Optimization of the fermentation conditions for ethanol production by new thermotolerant yeast strains of *Kluyveromyces sp.* *African Journal of Microbiology Research*, 7(37):4550-4561.

9. Herrera, T. y Ulloa, M. 1998. El reino de los hongos: micología básica y aplicada. Fondo de cultura económica. México, UNAM.
10. Kurtzman, C.P. Fell, J.W. y Boekhout, T. 2011. The yeasts, a taxonomic study. Elsevier. Quinta edición. EUA.
11. Nevárez, M. A.M., Córdova, G.E.E., López, M.J., Soto, C.N.O., López, P.M.G., and Rutiaga QQ. U.M. 2011. Effect of fermentation temperature on chemical composition of mescals made from *Agave duranguensis* juice with different native yeast genera. *African Journal of Microbiology Research*, 4(22): 3669-3676.
12. Olivares-Marin, I.K., González-Hernández, J.C., Regalado-Gonzalez, C. and Madrigal-Perez, L.a. 2018. *Saccharomyces cerevisiae* Exponential Growth Kinetics in Batch Culture to Analyze Respiratory and Fermentative Metabolism. *Journal of Visualized Experiments*, 139: 1-10.
13. Pérez, E., González-Hernández, J.C., Chávez-Parga, M.C. y Cortés-Penagos, C. 2013. caracterización fermentativa de levaduras productoras de etanol a partir de jugo de *Agave cupreata* en la elaboración de mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(3): 451-461
14. Pérez, H.E. Chávez, P.M.C. y González, H.J.C. 2016. Revisión del agave y el mezcal. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 26: 148-164.
15. Pilap, W., Thanonkeo, S., Klanrit, P. y Thanonkeo, P. 2018. The potential of the newly isolated thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* for high-temperature ethanol production using sweet sorghum juice. *3 Biotech*, 8:1-10.
16. Sakurai, M., Tohda, H., Kumagai, H. y Giga-Hama, Y. 2004. A distinct type of alcohol dehydrogenase, adh4p, complements ethanol fermentation in an adh1-deficient strain of *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Research*, 4: 649–654.
17. Salvadó, Z., Arroyo-López, F.N., Barrio, E., Querol, A. y Guillamón, J.M. 2011. Quantifying the individual effects of ethanol and temperature on the fitness advantage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 28: 1155-1161.
18. Uribe, G.L.A. 2007. Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de Mora. Tesis de licenciatura, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Microbiología industrial, Bogotá D.C.

19. Vázquez,H,J. y Dacosta O. 2007. Fermentación alcohólica: una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. Ingeniería Investigación y Tecnología. 4: 249-259.
20. Verdugo, V.A., Segura, G.L., Kirchmayr.M., Ramírez, R.P., González, E.a., Coria, R.,y Gschaedler, M.A. 2011. Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from Agave salmiana. Antonie van Leeuwenhoek, 100:497–506.
21. Walker, G.M y Stewart, G.G.2016. *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. Beverages, 2,30.

11 Anexo I

NMX-F-312-1978. DETERMINACIÓN DE REDUCTORES DIRECTOS Y TOTALES EN ALIMENTOS. METHOD OF TEST FOR TOTAL AND DIRECT REDUCING SUBSTANCES IN FOOD. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.

PREFACIO

En la elaboración de esta Norma participaron los siguientes Organismos:

Anderson Clayton & Co., S.A.

Centro de Control Total de Calidades.

Compañía Nestlé, S.A.

Te Coca Cola Exporta Co.

Laboratorio Nacional de la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

Dirección General de Control de Alimentos, Bebidas y Medicamentos. Secretaría De Salubridad y Asistencia.

0. INTRODUCCIÓN

El método descrito es el volumétrico de Lane-Eynon que se basa en la determinación del volumen de una disolución de la muestra, que se requiere para reducir completamente un volumen conocido del reactivo alcalino de cobre. El punto final se determina por el uso de un indicador interno, azul de metileno, el cual es reducido a blanco de metileno por un exceso de azúcar reductor.

Este método es aplicable para los siguientes productos: leche evaporada y condensada, productos lácteos, néctares, jugos, mermeladas, cajetas, dulces, moles, jarabes y mieles. (ver 8.1)

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta Norma establece el método volumétrico de Lane-Eynon para determinar azúcares reductores directos y totales.

2. REFERENCIAS

Esta Norma se complementa con las siguientes Normas en vigor:

NMX-F-285. Muestreo y transporte de la muestra para análisis de alimentos.

NMX-BB-014. Clasificación y tamaños nominales para utensilios de vidrio usados en laboratorio.

NMX-F-277. Determinación de sustancias reductoras en muestras de jugo de caña de azúcar.

3. REACTIVOS Y MATERIALES

Los reactivos empleados en esta prueba, deben ser grado analítico a menos que se indique otra cosa. Cuando se hable de agua debe entenderse agua destilada.

Oxalato de sodio o de potasio.

Disolución desecante de acetato neutro de plomo. Preparar una disolución acuosa saturada de acetato neutro de plomo.

Disolución A: Disolver 34.639 g de sulfato de cobre pentahidratado en 500 ml de agua destilada y filtrar a través de lana de vidrio o papel.

Disolución B: Disolver 173 g de tartrato doble de sodio y potasio y 50 g de hidróxido de sodio en agua y diluir a 500 ml, dejar reposar dos días y después filtrar usando asbesto.

Disolución acuosa de azul de metileno al 0.2 %

Disolución de azúcar invertido al 1 %: P/V

Pesar 9.5 g de sacarosa y disolver en 50 ml de agua, añadir 5 ml de HCl concentrado y diluir con agua a 100 ml, guardar algunos días a temperatura ambiente después de esta inversión se completa el volumen a 1000 ml (ver 8.2).

Disolución de Glucosa al 1 %; P/V

4. APARATOS E INSTRUMENTOS

Todos los aparatos e instrumentos de vidrio empleados en esta prueba deben cumplir con los requisitos señalados en la Norma Mexicana NMX-BB-014.

- Placa eléctrica con control de temperatura.

- Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg.
- Material común de laboratorio.

5. PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

La preparación y conservación de las muestras se indica en cada Norma del producto de que se trate.

6. PROCEDIMIENTO

6.1 Titulación de la disolución A + B

6.1.1 Neutralizar 10 ml de la disolución de azúcar invertido con hidróxido de sodio 1N, en un matraz volumétrico de 100 ml y completar el volumen con agua.

6.1.2 Transferir la disolución a una bureta, dejar caer la disolución ml a ml a un matraz Erlenmeyer que contenga una mezcla de 5 ml de la disolución A, 5 ml de la disolución B y 50 ml de agua en ebullición (Ver 8.3). Agregar la disolución de azúcar invertido hasta un poco antes de la total reducción del cobre.

6.1.3 Agregar 1 ml de la disolución de azul de metileno y completar la titulación hasta decoloración del indicador; La titulación debe efectuarse en 3 minutos (ver 8.4). Cuando se emplea el reactivo de glucosa titular directamente.

6.1.4 El título de la disolución debe ser de 0.0505 a 0.0525 y de acuerdo con el cálculo siguiente: Multiplicar los ml de disolución requeridos en la titulación por la concentración de ésta en g/ml.

El título se expresa indicando que 10 ml de la disolución A + B corresponden a X gramos de azúcar invertido; este valor se utilizará en el cálculo de las disoluciones problema.

6.2 Determinación de los reductores directos

6.2.1 Defecación de la muestra

6.2.1.1 Pesar la muestra apropiada (de 5 a 10 g) y colocarla en un matraz volumétrico de 250 ml., añadir 100 ml de agua, agitar lo suficiente para que todo el material soluble en agua quede disuelto.

6.2.1.2 Añadir 2 a 10 ml de la disolución saturada de acetato neutro de plomo, agitar y dejar sedimentar.

6.2.1.3 Añadir poco a poco oxalato de sodio o potasio hasta la total precipitación del acetato de plomo. Completar el volumen con agua, agitar y filtrar.

6.2.2 Determinación

Transferir el filtrado obtenido de la defecación a una bureta y titular como se indicó en 6.1.2.

6.3 Determinación de reductores totales

6.3.1 Determinación de la muestra

6.3.1.1 Pesar una cantidad de muestra apropiada (de 5 a 10 g) y colocarla en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, añadir 100 ml de agua y agitar.

6.3.1.2 Añadir de 2 a 10 ml de disolución saturada de acetato neutro de plomo, agitar y dejar sedimentar.

6.3.1.3 Añadir poco a poco oxalato de sodio o de potasio hasta la total precipitación del acetato de plomo. Filtrar recibiendo el filtrado en un matraz volumétrico de 250 ml.

6.3.1.4 Lavar tres veces el matraz Erlenmeyer y el filtro con 20 ml de agua, recibir el agua de lavado en un matraz volumétrico.

6.3.2 Determinación

6.3.2.1 Añadir 10 ml de HCl concentrado al matraz volumétrico que contiene el filtrado obtenido en la defecación. Calentar a 65 °C durante 15 minutos y enfriar.

6.3.2.2 Neutralizar con hidróxido de sodio 1N y completar el volumen con agua. Transferir a una bureta y titular como se indica en 6.1.2.

7. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

7.1 Cálculos

$$\% \text{ de azúcares reductores directos} = \frac{25000 \cdot T}{V \cdot P}$$

En donde:

T = Título de la disolución A + B en gramos de azúcar invertido.

V = Volumen de la disolución problema, empleado en la titulación de 10 ml de la disolución A + B en mililitros.

P = Peso de la muestra, en gramos

8. APÉNDICE

8.1 Para determinar azúcares reductores en mieles y jarabes puede también aplicarse el método establecido en la NMX-F-277.

8.2 La disolución al 1 % de azúcares invertido, puede guardarse aproximadamente siete días a la temperatura de 12 a 15 °C o 3 días a 20 a 25°C o 15 minutos a 65°C.

8.3 Las disoluciones al 1 % de azúcar invertida acidificada, son estables por algunos meses en refrigeración.

8.4 El matraz Erlenmeyer que contiene la mezcla A + B debe estar colocado sobre una parrilla eléctrica.

8.5 Durante la titulación de la disolución A + B debe mantenerse continua la emisión de vapores para prevenir la reoxidación del cobre o del indicador.

9. BIBLIOGRAFÍA

Técnicas para el análisis fisicoquímico de alimentos. Dirección General de Investigaciones en Salud Pública. Secretaría de Salubridad y Asistencia.

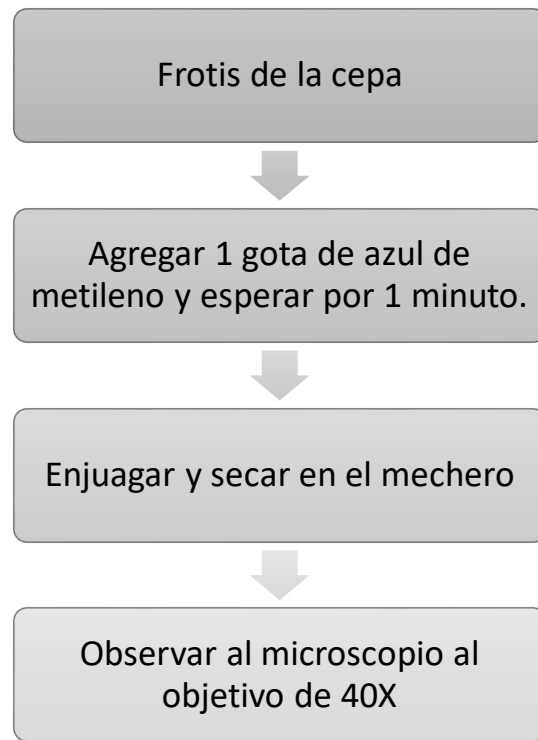
NMX-Z-013-1977. Norma Mexicana "Guía para la redacción estructuración y presentación de las Normas Mexicanas". Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.

10. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

No concuerda con ninguna Norma Internacional por no existir sobre el tema.

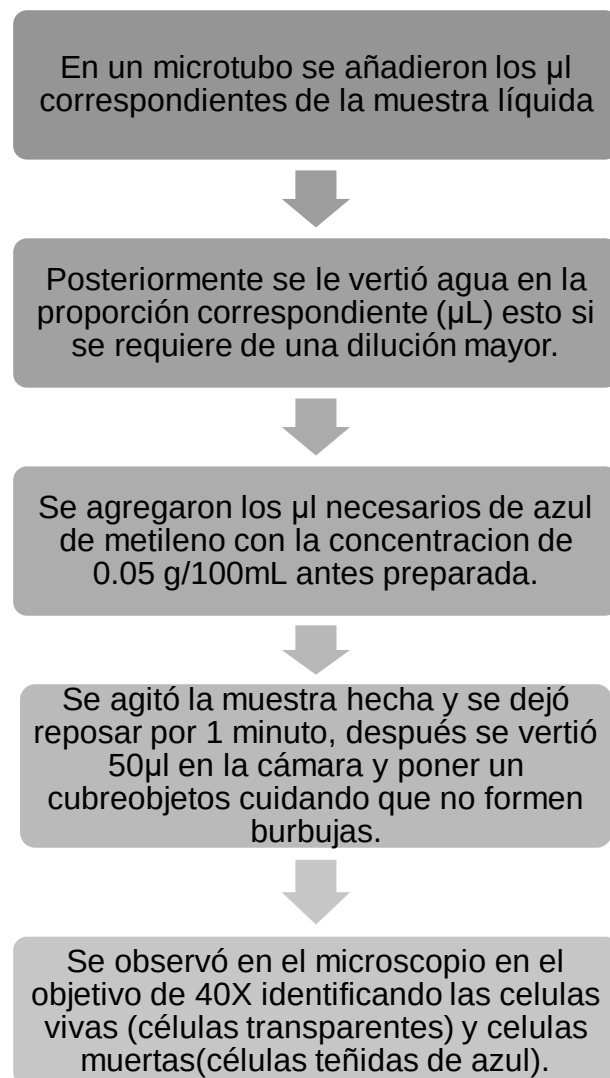
12 Anexo II

Procedimiento realizado para tinción con azul de metileno para levaduras.



13 Anexo III

Procedimiento seguido para el conteo en la cámara de Neubauer.



14 Anexo IV

Procedimiento para preparar muestras en la determinación de azúcares reductores directos.

Se tomaron 20 mL de la muestra y 80 ml de agua destilada colocandolos en un matraz Erlenmeyer de 250 mL.



Se agrega al matraz con la muestra diluida 2 mL de acetato de plomo para sedimentar sólidos.



En otro matraz se pesaron 0.8 g de oxalato de sodio y se le agregó la solución anterior para realizar la defecación y filtración.



Despues la muestra se aforó en un matraz de 100 mL

Titulación

Procedimiento para obtención de resultados de azúcares reductores directos

