



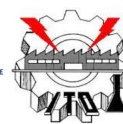
EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



TECNM
TECNOLÓGICO NACIONAL DE
MÉXICO



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN DESARROLLO REGIONAL Y TECNOLÓGICO

TESIS

Cepas nativas de *Saccharomyces* fructofílicas y tolerantes a altas concentraciones de etanol aisladas de mostos de la fermentación del mezcal artesanal de Oaxaca

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestra en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico

PRESENTA

Antonio Cruz Alma Lilia

DIRIGIDA POR

Dr. Felipe de Jesús Palma Cruz

Dra. Claudia López Sánchez

ASESOR

Dr. Margarito Abelardo Martínez Cruz

Oaxaca de Juárez, Oaxaca, junio de 2022.



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Oaxaca
División de Estudios de Posgrado e Investigación
Maestría en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico

Oaxaca de Juárez, Oax., 27/mayo/2022

Oficio No. DEPI/227/2022

Asunto: Autorización de impresión de tesis.

ING. HUITZILÍ DÍAZ JAIMES
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE SERVICIOS ESCOLARES.
P R E S E N T E.

Por este medio comunico a usted que, de acuerdo con las disposiciones establecidas en los Lineamientos para la operación de estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México, dependiente de la Secretaría de Educación Pública, la estudiante ALMA LILIA ANTONIO CRUZ con número de control M20161901, ha cumplido con todas las recomendaciones que el Comité Revisor hizo respecto a su tesis cuyo título es "Cepas nativas de *Saccharomyces fructofilicas* y tolerantes a altas concentraciones de etanol aisladas de mostos de la fermentación del mezcal artesanal de Oaxaca" para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico.

Por lo anterior, la División a mi cargo le concede la autorización para que proceda el trámite correspondiente y la impresión de la misma.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
"Tecnología Propia e Independencia Económica"

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

DR. MARCO ANTONIO SÁNCHEZ MEDINA
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN.

MASM/FBA/*cmh



Avenida Ing. Víctor Bravo Ahuja No. 125 Esquina Calzada Tecnológico, C.P. 68030. Tel. (951) 5015016. e-mail: tec_oax@itoaxaca.edu.mx | www.oaxaca.tecnm.mx



2022 Flores
Año de Magón
PRESENCIA DE LA REVOLUCIÓN MEXICANA



Oaxaca de Juárez, Oax., 27/mayo/2022

Oficio No. DEPI/231/2022

ASUNTO: Autorización de impresión de tesis.

C. ALMA LILIA ANTONIO CRUZ.
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN DESARROLLO REGIONAL Y TECNOLÓGICO.
P R E S E N T E.

De acuerdo con las disposiciones para la Operación de Estudios de Posgrado e Investigación del Tecnológico Nacional de México, dependiente de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo con respecto a su Tesis para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico, cuyo título es "Cepas nativas de *Saccharomyces fructofílicas* y tolerantes a altas concentraciones de etanol aisladas de mostos de la fermentación del mezcal artesanal de Oaxaca".

Los abajo firmantes de la Comisión Revisora le concedemos la Autorización para que proceda a la Impresión de la misma.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica
"Tecnología Propia e Independencia Económica"


DR. FELIPE DE JESÚS PALMA CRUZ
DIRECTOR


DRA. CLAUDIA LÓPEZ SÁNCHEZ
CO-DIRECTORA


DR. MARGARITO ABELARDO MARTÍNEZ CRUZ
ASESOR

Vo.Bo.

 **EDUCACIÓN** 
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN


DR. MARCO ANTONIO SÁNCHEZ MEDINA
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

MASM/PPA*cmh





CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS.

En la Ciudad de Oaxaca, el día 13 del mes de Junio del año 2022, el(la) que suscribe Alma Lilia Antonio Cruz estudiante del programa de Maestría en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico, con número de control M 20161901, manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis, que se desarrolló bajo la dirección de Dr. Felipe de Jesús Palma Cruz y cede los derechos del trabajo titulado: Cepas nativas de Saccharomyces fructofílicas y tolerantes a altas concentraciones de etanol aisladas de mostos de la fermentación del mezcal artesanal de Oaxaca

al TecNM/Instituto Tecnológico de Oaxaca para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información del presente trabajo no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido solicitándolo a la siguiente dirección: lili.antonio97@gmail.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Atentamente

Alma Lilia Antonio Cruz

Nombre y firma

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, por permitirme trabajar en el laboratorio de Control ambiental desde la carrera por compartirme sus conocimientos en todo momento guiándome en el proyecto y al Dr. Felipe de Jesús Palma Cruz, por estar siempre al pendiente de los avances del proyecto, así como compartirme de sus conocimientos en el área, por despejar todas mis dudas acerca del proyecto y guiarme en el procedimiento realizado,

Agradezco mucho a todos los que colaboran en el laboratorio, al equipo de Servicio Social por colaborar dentro de la experimentación de la cinética de crecimiento a mis compañeros de maestría y doctorado ya que la ayuda de cada uno fue indispensable para que este proyecto llegara a un buen término, en especial a la M.C.I. Emilene Reyes Rodríguez por brindarme su valioso apoyo durante todo el proceso experimental para lograr los objetivos establecidos, a la M.C Claudia Lizbeth Cruz Vásquez por su ayuda en las experimentaciones realizadas.

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

Resumen

El presente trabajo muestra el estudio cinético realizado a cepas nativas del mosto del mezcal del género *Saccharomyces*, con el fin de obtener las cepas que presenten afinidad hacia la fructosa, así como su tolerancia a etanol y a altas concentraciones de esta fuente de carbono. Para lograr la caracterización cinética se partió de la recopilación de datos de las cepas aisladas previamente de tres diferentes palenques del estado de Oaxaca, teniendo así cepas del palenque I , palenque III y el palenque IV que pertenecen a las comunidades de San Dionisio Ocotepec, Río las Palmas y San Pedro Teozacoalco respectivamente, a continuación de los palenques I Y IV se eligió una cepa las cuales son ITOYI003 e ITOYIV009, en el caso del palenque III se obtuvo la cepa ITOYIII002 del género mediante la realización de las pruebas de asimilación/fermentación de fuente de carbono así como por su morfología microscópica y macroscópica en base a lo reportado por Espinoza-Martínez y colaboradores en el 2020. El paso siguiente fue el estudio cinético de cada una de las cepas donde se inocularon en tres medios de cultivo, YPD, YPF y YPS cuyas fuentes de carbono son dextrosa, fructosa y sacarosa, en base a este estudio se observó que la cepa ITOYIII002 obtuvo mayor afinidad hacia la fructosa por lo tanto fue seleccionada para el estudio de tolerancia a etanol y a altas concentraciones de fructosa mediante un diseño experimental 2x3 donde la variable de respuesta fue el crecimiento utilizando la velocidad de crecimiento para la realización del análisis estadístico donde mostró las condiciones con las que la cepa tiene preferencia.

Abstract

The present work shows the kinetic study carried out on native strains of mezcal must of the genus *Saccharomyces*, in order to obtain the strains that have an affinity towards fructose, as well as their tolerance to ethanol and high concentrations of this carbon source. To achieve kinetic characterization, we started from the collection of data from the strains previously isolated from three different palenques of the state of Oaxaca, thus having strains of palenque I, palenque III and palenque IV that belong to the communities of San Dionisio Ocotepec, Río las Palmas and San Pedro Tezacoalco respectively, after the palenques I and IV a strain was chosen which are ITOYI003 and ITOYIV009, in the case of palenque III, the ITOYIII002 strain of the genus was obtained by carrying out the carbon source assimilation/fermentation tests as well as for its microscopic and macroscopic morphology based on what was reported by Espinoza-Martínez and collaborators in 2020. The next step was the kinetic study of each of the strains where they were inoculated in three culture media, YPD, YPF and YPS whose carbon sources are dextrose, fructose and sucrose, based on this study it was observed that the ITOYIII002 strain obtained greater affinity towards fructose using a 2×3 experimental design where the response variable was growth using growth rate for the performance of the statistical analysis where he showed the conditions with which the strain has preference.

Contenido

| | |
|--|----|
| Resumen | 3 |
| Abstract | 4 |
| 1 Introducción | 9 |
| 2 Planteamiento del problema | 10 |
| 3 Hipótesis | 11 |
| 4 Objetivos | 12 |
| 4.1 General | 12 |
| 4.2 Específicos | 12 |
| 5 Justificación | 13 |
| 6 Antecedentes | 14 |
| 6.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en la producción de bebidas fermentadas .. | 14 |
| 6.2 Evaluación cinética y molecular de levaduras fructofílicas aisladas de mezcal tamaulipeco | 14 |
| 6.3 Aislamiento, selección y caracterización de la cinética fermentativa de <i>Saccharomyces</i> (ITOSIV001) obtenida de mostos de fermentación del proceso de producción del mezcal artesanal de Oaxaca | 16 |
| 6.4 Comportamiento de un consorcio microbiano a partir de cepas aisladas de mosto procedente del estado de Oaxaca | 17 |
| 7 Marco teórico | 18 |
| 7.1 Fermentación | 18 |
| 7.1.1 Fermentación alcohólica y respiración | 19 |
| 7.1.2 Levaduras: Fermentación alcohólica | 19 |
| 7.2 Levaduras | 20 |
| 7.2.1 Importancia y concepto | 20 |
| 7.2.2 Distribución y medios en que viven | 23 |
| 7.2.3 Morfología y estructura | 24 |
| 7.3 Reproducción de las levaduras | 27 |
| 7.3.1 Reproducción asexual | 27 |
| 7.3.2 Reproducción sexual | 27 |
| 7.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 29 |
| 8 Metodología | 31 |
| 8.1 Recopilación de información de las cepas aisladas | 31 |
| 8.2 Recuperación y conservación de las cepas | 31 |

| | | |
|-------|--|----|
| 8.3 | Identificación de género de cepas de levaduras aisladas | 33 |
| 8.3.1 | Realización de pruebas de asimilación/fermentación para levaduras | |
| | 33 | |
| 8.4 | Cinética de afinidad de sustrato | 34 |
| 8.4.1 | Elaboración del medio de cultivo para la cinética y para el preinóculo | 35 |
| 8.4.2 | Inoculación del preinóculo y conteo de células viables | 36 |
| 8.4.3 | Inoculación de los frascos para la cinética de crecimiento | 37 |
| 8.4.4 | Método de crecimiento celular por conteo | 37 |
| 8.4.5 | Método de crecimiento por biomasa en peso seco | 38 |
| 8.4.6 | Consumo de sustrato | 39 |
| 8.5 | Cinética de tolerancia a etanol y a altas concentraciones de fuente de carbono | 39 |
| 8.5.1 | Inoculación del preinóculo y conteo de células viables | 41 |
| 8.5.2 | Inoculación de los matraces del diseño de experimentos | 42 |
| 8.5.3 | Método de crecimiento celular por conteo | 43 |
| 8.5.4 | Método de crecimiento por biomasa en peso seco | 44 |
| 9 | Resultados | 45 |
| 9.1 | Pruebas de asimilación/fermentación de fuente de carbono | 45 |
| 9.2 | Cinética de afinidad de sustrato para obtención de cepas de <i>Saccharomyces fructofílicas</i> | 45 |
| 9.2.1 | Cepa ITOYI003 | 46 |
| 9.2.2 | Cepa ITOYIII002 | 50 |
| 9.2.3 | Cepa ITOYIV009 | 53 |
| 9.3 | Cinética de tolerancia a etanol y a altas concentraciones de fuente de carbono | 58 |
| 9.3.1 | Análisis estadístico | 58 |
| 9.3.2 | Cinética de crecimiento por el método de biomasa | 64 |
| 10 | Conclusiones | 66 |
| 11 | Bibliografía | 67 |
| 12 | Anexo I | 69 |

| | |
|---|----|
| Figura 1 Siembra y conservación de las cepas de levaduras. | 31 |
| Figura 2 cepas de levaduras de los 3 palenques en medio de cultivo YPD. | 32 |
| Figura 3 Realización de pruebas de asimilación/fermentación de fuente de carbono. | 33 |
| Figura 4 Tinción simple de las cepas donde A: ITOYIII001, B: ITOYIII002, C: ITOYIII003, D: ITOYIII004, E: ITOYIII005, F: ITOYIII006, G: ITOYIII007, I: ITOYIII009 | 34 |
| Figura 5 Inoculación de los frascos para cinética de crecimiento. | 37 |
| Figura 6 Toma de muestra para conteo en la cámara de Neubauer. | 37 |
| Figura 7 Procedimiento de peso seco por cada punto. | 38 |
| Figura 8 Realización del método para obtención de consumo de azúcar. | 39 |
| Figura 9 Toma de muestra para conteo de células viables en la cámara de Neubauer. | 42 |
| Figura 10 Incubación de los matraces de la cinética de tolerancia a etanol y asimilación de fuente de carbono | 42 |
| Figura 11 Toma de muestra para conteo en la cámara de Neubauer. | 43 |
| Figura 12 Gráfica del ajuste de los datos al modelo de Gompertz para la cepa ITOYI003 en los tres medios de cultivo. | 46 |
| Figura 13 Gráfica de crecimiento por el método de biomasa dada en g/L de la cepa ITOYI003. | 48 |
| Figura 14 Gráfica del consumo de fuente de carbono de la cepa ITOYI003. | 49 |
| Figura 15 Gráfica del ajuste de los datos al modelo de Gompertz para la cepa ITOYIII002 en los tres medios de cultivo. | 50 |
| Figura 16 Gráfica de crecimiento por el método de biomasa dada en g/L de la cepa ITOYIII002. | 52 |
| Figura 17 Gráfica del consumo de fuente de carbono de la cepa ITOYIII002. | 53 |
| Figura 18 Gráfica del ajuste de los datos al modelo de Gompertz para la cepa ITOYIV009 en los tres medios de cultivo. | 54 |
| Figura 19 Gráfica de crecimiento por el método de biomasa dada en g/L de la cepa ITOYIV009. | 56 |
| Figura 20 Gráfica del consumo de fuente de carbono de la cepa ITOYIV009. | 57 |
| Figura 21 Gráfica de interacciones de los factores para la velocidad máxima de crecimiento. | 63 |
| Figura 22 Comportamiento cinético de la cepa ITOYIII002 en 2% v/v de etanol con las tres concentraciones de fructosa. | 64 |
| Figura 23 Comportamiento cinético de la cepa ITOYIII002 a 4%v/v de etanol con las tres concentraciones de fructosa. | 65 |
| Tabla 1 Ejemplos de fermentaciones comunes y algunos microorganismos que las realizan (Alcázar, 2011) | 18 |
| Tabla 2 Identificación de los palenques de origen de las cepas. | 31 |
| Tabla 3 Codificación de las cepas con el palenque al que pertenecen. | 35 |

| | |
|--|----|
| Tabla 4 Composición del medio de cultivo YPD..... | 36 |
| Tabla 5 Composición del medio de cultivo YPF. | 36 |
| Tabla 6 Composición del medio de cultivo YPS. | 36 |
| Tabla 7 Planteamiento del diseño de experimentos para tolerancia a etanol y asimilación de fuente de carbono. | 40 |
| Tabla 8 Volumen de medio añadido para la realización de preinóculos y para el diseño de experimentos. | 41 |
| Tabla 9 Volumen de etanol añadido en los preinóculos y en los matraces del diseño. | 41 |
| Tabla 10 Resultados de las pruebas bioquímicas por cepa. | 45 |
| Tabla 11 Parámetros cinéticos de la cepa ITOYI003 para los 3 medios de cultivo. | 47 |
| Tabla 12 Porcentaje de consumo de fuente de carbono de la cepa ITOYI003. | 49 |
| Tabla 13 Parámetros cinéticos de la cepa ITOYIII002 para los 3 medios de cultivo. . | 51 |
| Tabla 14 Porcentaje de consumo de fuente de carbono de la cepa ITOYIII002. | 53 |
| Tabla 15 Parámetros cinéticos de la cepa ITOYIV009 para los 3 medios de cultivo. . | 55 |
| Tabla 16 Porcentaje de consumo de fuente de carbono de la cepa ITOYIV009. | 57 |
| Tabla 17 Velocidades máximas de crecimiento de la cepa ITOYIII002 con las combinaciones del diseño. | 58 |
| Tabla 18 Prueba de homogeneidad de varianza con el valor de P | 59 |
| Tabla 19 ANOVA para la cinética de tolerancia a etanol y concentración de fructosa | 59 |
| Tabla 20 Prueba de efecto de porcentaje de etanol. | 60 |
| Tabla 21 Prueba de efecto de la concentración de fructosa dada en g/L. | 60 |
| Tabla 22 Prueba de interacción entre los factores de porcentaje de etanol y concentración de fructosa dado en g/L. | 61 |
| Tabla 23 Agrupaciones obtenidas para la interacción entre los factores. | 62 |

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 como son bacterias y levaduras que participan en el proceso para obtener las características del mezcal. Este trabajo se enfocará en el estudio de cepas nativas de levaduras, aisladas de mostos del mezcal del género *Saccharomyces*, seleccionando aquellas que sean fructofílicas y tolerantes a altas concentraciones de etanol.

El proyecto se basará en la selección de cepas del género *Saccharomyces* previamente aisladas de 3 palenques del estado de Oaxaca, así mismo se realizarán pruebas bioquímicas para la identificación de este género para las cepas de levaduras un palenque, posteriormente se realizarán estudios cinéticos para la obtención de las cepas fructofílicas del género *Saccharomyces*, así también se llevará a cabo la caracterización cinética por medio de pruebas de tolerancia a etanol para encontrar la mejor cepa con potencial biotecnológico.

2 Planteamiento del problema

Existe falta de información sobre cepas fructofílicas del género *Saccharomyces* nativas del proceso de fermentación del mezcal que presenten tolerancia a etanol con un potencial biotecnológico.

3 Hipótesis

Las cepas de levaduras del género *Saccharomyces* nativas de la fermentación del mezcal del presentan afinidad hacia la fructosa y son tolerantes al etanol.

4 Objetivos

4.1 General

Seleccionar las cepas del género *Saccharomyces* fructofílicas y tolerantes a etanol aisladas de mosto de mezcal artesanal.

4.2 Específicos

- Seleccionar las cepas del género *Saccharomyces* previamente aisladas de 3 palenques del estado de Oaxaca.
- Realizar pruebas de asimilación de fuente de carbono para la identificación del género *Saccharomyces*.
- Realizar cinéticas de crecimiento para probar su capacidad fructofílica.
- Realizar pruebas de tolerancia a etanol para encontrar la mejor cepa con potencial biotecnológico.

5 Justificación

En el estado de Oaxaca una de las actividades que tiene mayor importancia económica es la producción de mezcal, esta se lleva de forma artesanal por maestros mezcaleros 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* las cuales consumen los nutrientes que están presentes en el mosto de igual manera como fuente de carbono están presentes la fructosa y la glucosa, la cepa de levadura de *Saccharomyces* es por excelencia productora de alcohol lo que es de vital importancia dentro del proceso de obtención del mezcal, así también si se tienen cepas nativas que toleren altas concentraciones ayudará al proceso de fermentación puesto que resisten los cambios en las concentraciones de etanol, ya que en este proceso intervienen diferentes microorganismos.

6 Antecedentes

6.1 *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*. 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).

6.2 Evaluación cinética y molecular de levaduras fructofílicas aisladas de mezcal tamaulipeco

En el presente trabajo se analizaron 17 aislamientos que fueron obtenidos de una destilería llamada “el Palmar” la cual está en la localidad de San Carlos en el estado de Tamaulipas. La toma de las muestras se llevó a cabo en diferentes puntos del proceso como son: el horno de cocimiento, el molino (trapiche) entre otros. Como control se utilizó la cepa Fermichamp® (DSM) que es una cepa de vino industrial que presenta fructofilia. Dentro del proceso se identificaron por técnicas moleculares por la secuencia ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 y 26S cinco grupos de microorganismos, 10 aislados de *S. cerevisiae*, uno *Zygosaccharomyces bailii*, tres de *Torulaspora delbrueckii*, dos de *Kluyveromyces marxianus* y uno de *Pichia mexicana*, posteriormente se analizaron las cepas identificadas como *S. cerevisiae* en tres

medios diferentes con diferentes relaciones de concentración de azúcar los cuales son fructosa: glucosa 1:9 (M1), fructosa: glucosa 9:1 (M2) y glucosa: fructosa 1:1 (M3). Las cepas que destacaron por su consumo de fuente de carbono en M1 fueron 3Y4, 3Y8 y Fermichamp®, en el caso de M2 las cepas 3Y2, 3Y4 y 3Y8 obtuvieron los mejores resultados. Así también se llevaron a cabo pruebas de tolerancia a etanol en donde se encontró que la cepa 3Y8 tuvo el mayor porcentaje de viabilidad.

De acuerdo al análisis de los transportadores de hexosas de Hxt1 demostró que los segmentos transmembranales TM3, TM5 y TM6 se encuentran conservados en los aislados de mezcal y Fermichamp® con la secuencia de la clona S228c. con respecto a Hxt3 muestran que en TM5, las cepas provenientes del mezcal tamaulipeco presentan polimorfismo en S207L que se refiere al cambio de un aminoácido polar a uno no polar, respecto a la cepa S228c. Para TM7 en Hxt1 los aminoácidos que se encuentran conservados para todas las cepas son: Q275, G279 y D280, así también se encontró que en Fermichamp®, 3D6, 3Y2, 2Y3, 2Y4, 2Y5 y 3Y8 el polimorfismo K278T se encuentra adyacente. En Hxt1 se encontraron entre la región TM9, en el rizo externo y en la TM10 cambios de aminoácidos en la posición 418- 420 y 431, en Hxt3 los polimorfismos fueron hallados en la posición 418 y 419 solo para Fermichamp; los aislados de mezcal presentaron las sustituciones Y402L y C401S. Otro cambio reflejado en el estudio fue en la cepa 3D3 la cual presentó dentro de la región transmembranal 9 los polimorfismos Y405A, A406F, S407L. El polimorfismo L377F fue visto en Hxt1 del segmento TM10 y para la cepa para 3Y8 se presentó cerca de la posición F380. Además, en Hxt1 los polimorfismos encontrados en la cepa 3D3 fueron F406S; G408A; G411A. Para el caso del polimorfismo L439M en el TM12 este se encuentra presente en el transportador Hxt1. En base a lo encontrado en el estudio se consideran que los polimorfismos presentes en estos segmentos transmembranales pudieran modificar el tamaño del poro y la forma de señalización de la proteína con el azúcar, lo cual muestra su importancia en la formación de la cadena por lo que se pudiera considerar que estas modificaciones distorsionarían la conformación de la estructural exoficial provocando alteraciones entre los sitios alostéricos de la proteína, propiciando una diferente afinidad con las moléculas de hexosas, provocando que la

funcionalidad del transportador tenga cambios. Los resultados que se obtuvieron en este estudio sugieren la necesidad de realizar un análisis integral para determinar las capacidades fructofílicas y de producción de etanol en una cepa de *S. cerevisiae*; ya que los cambios observados en las tasas de consumo de azúcares y producción de etanol para estas cepas no están relacionados solo con la expresión y/o actividad de estos genes. (Oliva, 2012)

6.3 Aislamiento, selección y caracterización de la cinética fermentativa de *Saccharomyces* (ITOSIV001) obtenida de mostos de fermentación del proceso de producción del mezcal artesanal de Oaxaca.

En el trabajo de investigación realizado por Reyes-Rodríguez y colaboradores en 2021 donde por medio del aislamiento en mosto de mezcal seguido de una selección de las cepas de levaduras por medio de la siembra en agar rosa de bengala con cloranfenicol, se encontró una cepa del género *Saccharomyces* cuya codificación es ITOYISV001 la cual es prometedora a nivel industrial. En esta investigación cuyo objetivo fue caracterizar la cepa por medio de condiciones controladas a nivel laboratorio la cepa fue estudiada bajo dos niveles de pH, concentración de fuente de carbono (g/L) y etanol (%v/v). De acuerdo a la experimentación se obtuvo que la cepa presente mayor velocidad de crecimiento a pH 5, 70 g/L de dextrosa como fuente de carbono y etanol al 14% v/v. Los mostos generalmente se encuentran a un pH de 4 a 5, la concentración de azúcares iniciales depende de la madurez o de la especie de agave empleado, sin embargo para este estudio se determinó que a mayor concentración (g/L) menor velocidad de crecimiento al igual que al aumentar la concentración (v/v) de etanol se observa inhibición del crecimiento, esto debido a la cantidad de cél/mL inoculadas (preinóculo), se observa un tiempo de latencia superior a las 24 h, el cual podría disminuirse aumentando la concentración inicial de cél/mL.

6.4 Comportamiento de un consorcio microbiano a partir de cepas aisladas de mosto procedente del estado de Oaxaca

Cruz Vásquez en 2020 realizó un estudio que tuvo como determinar el comportamiento cinético de un consorcio microbiano establecido a partir de cepas previamente aisladas de un mosto procedente de un palenque artesanal de San Dionisio Ocotepéc. Realizó la cinética de crecimiento para cada una de las cepas seleccionadas previamente, empleando cepas de levaduras del género *Saccharomyces sp* y *Kluyveromyces sp* y cepas de bacterias una *Acetobacter sp.* y una cepa de *Lactobacillus sp* Para el estudio partió de preinóculos realizados en mosto y que fueron inoculados por cada cepa de igual forma para el diseño experimental 11 evaluó los factores que influyen en la fermentación : 1) temperatura de incubación: 27 °C y 29 °C; y 2) cantidad de fuente de nitrógeno (sulfato de amonio): 1 g/L y 0.5 g/L, para cada una de las levaduras y bacterias; así como para el consorcio microbiano diseñado, utilizando con estos datos dos tratamientos en el cal el tratamiento 1 utilizó una temperatura de incubación: 27 °C; y añadiendo 0.5 g/L de sulfato de amonio y para el tratamiento 2 la temperatura de incubación fue de 29 °C; y utilizó 1.0 g/L de sulfato de amonio, la duración de la cinética fue de 5 días. Para comportamiento del consorcio inoculó primero a las cepas de levaduras y después a las bacterias, contando los 5 días de fermentación en el momento que se inocularon las 4 cepas y posteriormente realizó el proceso de destilación de los mostos fermentados, así también realizó la determinación de los parámetros cinéticos. De acuerdo a la metodología encontró que las cepas tanto de levaduras, como de bacterias utilizadas para este trabajo, utilizan de una forma eficiente el sustrato en el que crecen, y lo transforman en las moléculas que son deseables que estén presentes en los destilados finales y *Kluyveromyces sp.* es más versátil que *Saccharomyces sp.* para crecer en las condiciones generadas por cada uno de los tratamientos con los que contó el experimento; y que *Acetobacter sp.* y *Lactobacillus sp.* tienen una reproducción y crecimiento que tampoco es influenciada por las condiciones de los tratamientos.

7 Marco teórico

7.1 Fermentación

La fermentación y la respiración son dos mecanismos de conservación de energía que se conocen para las levaduras. 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).

7.1.1 Fermentación alcohólica y respiración

Las levaduras en el inicio de la fermentación comienzan a metabolizar los azúcares y los nutrientes presentes tales como el nitrógeno y minerales que son usado para obtener energía y poder aumentar su población.

La fermentación alcohólica es llevada a cabo en presencia de una gran cantidad de glucosa que está presente en el medio de cultivo bajo condiciones aeróbicas más piruvato y NADH son producidos del que las mitocondrias pueden oxidar. Al tener un exceso de piruvato este es convertido a acetaldehído por la enzima piruvato descarboxilasa y después es reducido a etanol convirtiendo NADH a NAD⁺ por medio de la enzima alcohol deshidrogenasa (Alcázar, 2011)

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

7.1.2 Levaduras: Fermentación alcohólica

La población de levaduras no se incrementa durante las primeras horas de la fermentación, este periodo es conocida como fase de latencia este tiempo es necesario para que las células logren adaptarse a las nuevas condiciones ambientales. Posteriormente sigue la fase exponencial, donde las levaduras se han adaptado a las condiciones ambientales y su población crece, esta fase se ve influenciada de forma directa por la temperatura, la concentración de nitrógeno con grupos amonio, aminoácidos y otros nutrientes, además por la presencia de oxígeno. En la etapa llamada fase “cuasi-estacionaria”, las levaduras detienen su crecimiento debido a que algunos nutrientes comienzan a ser deficientes y es por esto que 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).

7.2 Levaduras

7.2.1 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”. 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)

7.2.2 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; 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; 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).

7.2.3 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 cadenas 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 granuladas 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).

7.3 Reproducción de las levaduras

7.3.1 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).

7.3.2 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).

7.4 *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).

8 Metodología

8.1 Recopilación de información de las cepas aisladas

Se llevó a cabo la recopilación de los datos de las cepas que han sido previamente aisladas de tres palenques del estado de Oaxaca identificándolos como se muestra en la tabla 2. Para el estudio se seleccionó una cepa de cada palenque que previamente fueron identificadas, tomando las cepas que correspondieran al género *Saccharomyces*, del palenque III se recopiló información sobre las levaduras aisladas para llevar a cabo la observación de la morfología microscópica y pruebas de asimilación/fermentación de fuente de carbono.

Tabla 2 Identificación de los palenques de origen de las cepas

| Codificación | Localidad |
|--------------|-----------------------|
| Palenque I | San Dionisio Ocotepec |
| Palenque III | Río las palmas |
| Palenque IV | San Pedro Teozacoalco |

8.2 Recuperación y conservación de las cepas

Al obtener la información se sembraron las cepas de cada palenque como se muestra en la figura 1 las técnicas empleadas en medio sólido fueron por medio de extensión en placa en medio de cultivo YPD, por medio de estriado en medio PDA y también se inocularon las cepas en medio de cultivo líquido YPD adicionándole al medio 0.5 g/L de cloranfenicol. Para conservación de las cepas se realizó por medio de glicerol al 30% en microtubos



Figura 1 Siembra y conservación de las cepas de levaduras.

Del palenque I se tomó la cepa ITOYI003 reportada por López et al., (2020), del palenque IV se utilizó la cepa con codificación ITOYIV009, el palenque III (Espinoza-Martínez et al., 2020) no contaba con cepas identificadas, se recuperaron las cepas previamente aisladas codificadas como ITOYIII001, ITOYIII002, ITOYIII003, ITOYIII004 ITOYIII005, ITOYIII006, ITOYIII007 e ITOYIII009 para realizar la identificación de los géneros con el fin de obtener la cepa de género *Saccharomyces* sp. La figura 2 muestra el crecimiento de las cepas de levaduras con su codificación de acuerdo al palenque.

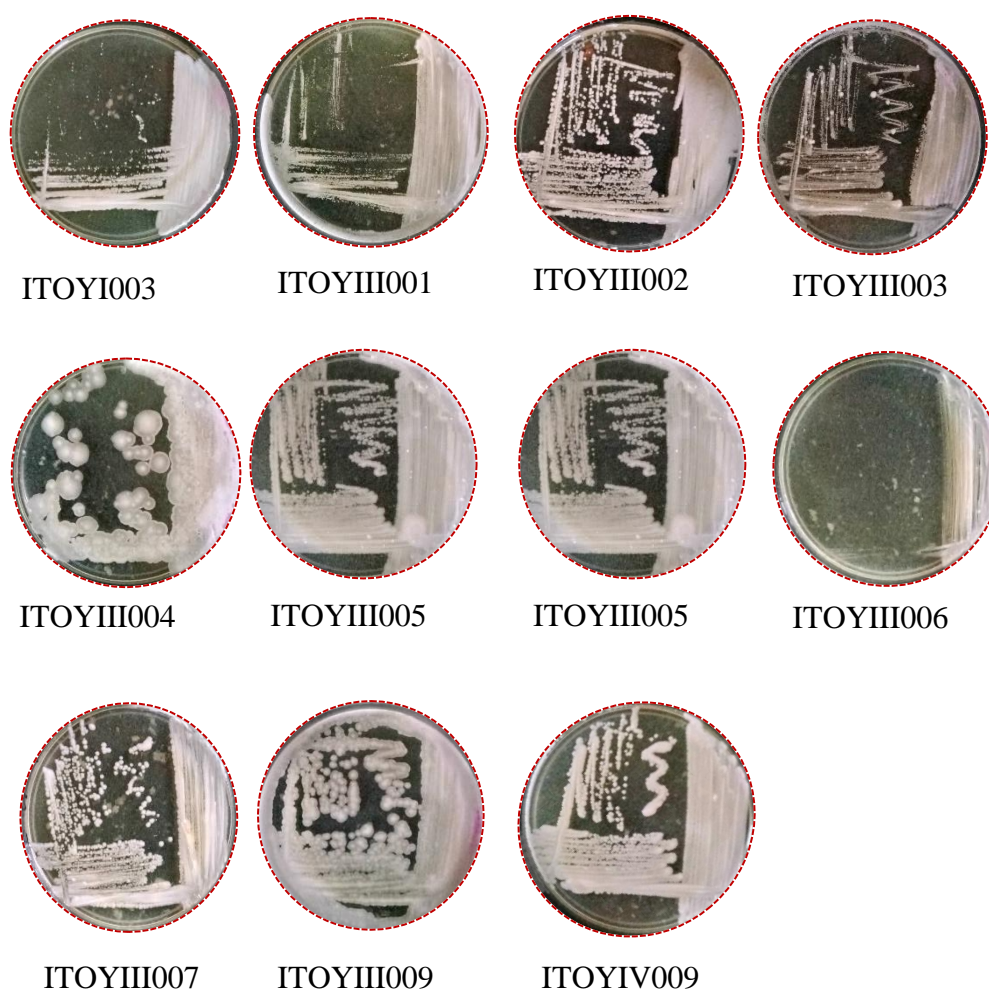


Figura 2 cepas de levaduras de los 3 palenques en medio de cultivo YPD.

8.3 Identificación de género de cepas de levaduras aisladas

Como primer paso se realizó la siembra por extensión en placa de las cepas conservadas del palenque III correspondiente a la localidad de Río las Palmas para poder trabajar las pruebas de asimilación de fuente de carbono.

8.3.1 Realización de pruebas de asimilación/fermentación para levaduras

Se realizaron las pruebas bioquímicas para levaduras para 8 cepas, para estas pruebas se prepararon tubos con medio de cultivo Caldo Base Rojo de Fenol los cuales se les añadió una campana Durham para observar que cepas producen CO_2 , para eso se utilizaron nueve azúcares los cuales son: Glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, manitol, inulina sorbitol, galactosa y lactosa. En la figura 3 se puede apreciar la realización de las pruebas.

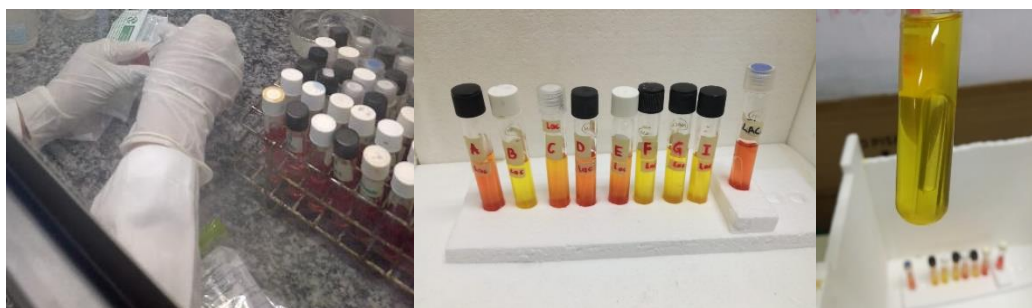


Figura 3 Realización de pruebas de asimilación/fermentación de fuente de carbono.

Al obtener los resultados de las pruebas se procedió a observar en el microscopio por medio de la realización de tinción simple con azul de metileno como se muestra en la figura 4 para observar sus características morfológicas.

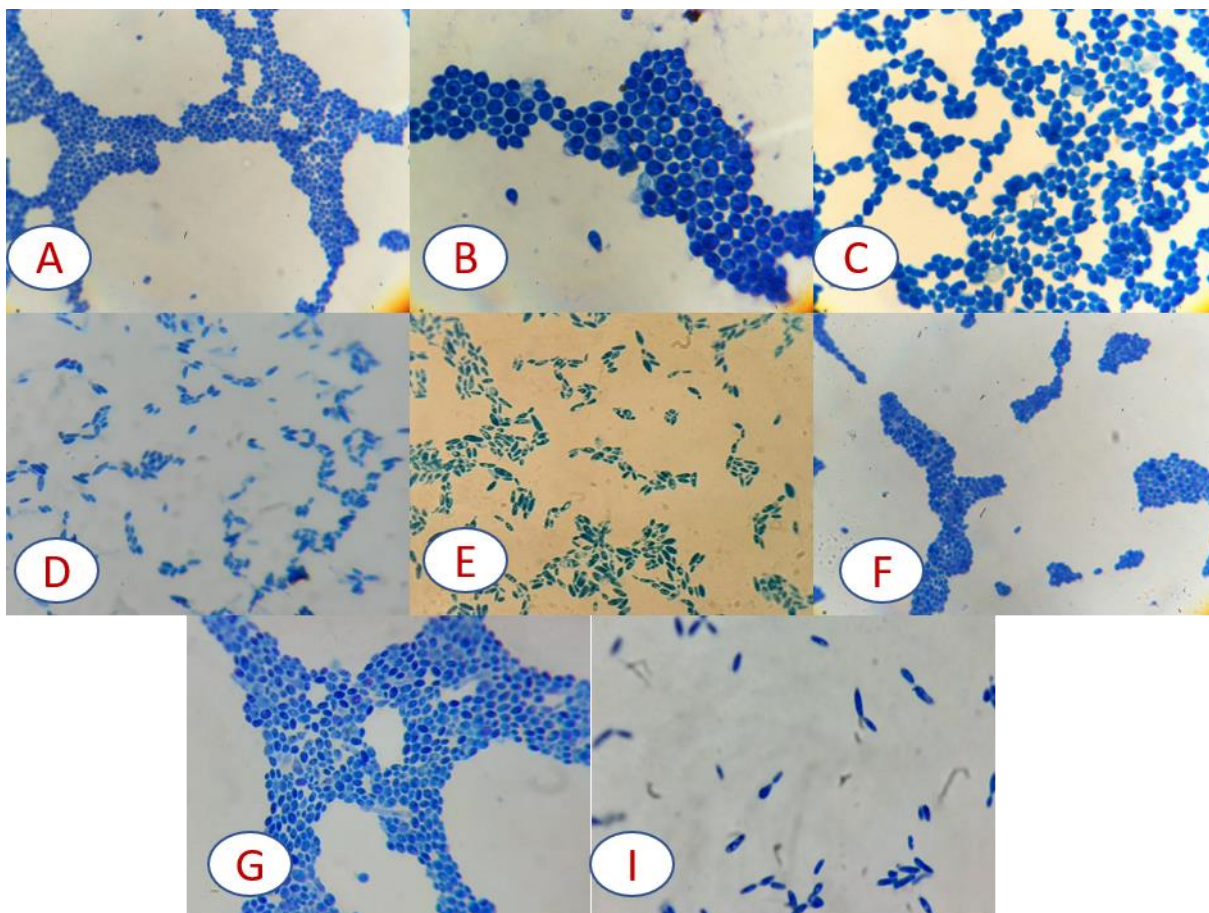


Figura 4 Tinción simple de las cepas donde A: ITOYIII001, B: ITOYIII002, C: ITOYIII003, D: ITOYIII004, E: ITOYIII005, F: ITOYIII006, G: ITOYIII007, I: ITOYIII009

De acuerdo a la observación en el microscopio, lo descrito de la caracterización morfológica realizada por Espinoza- Martínez et., al 2020 así como el resultado de fermentación/asimilación de los azúcares y lo descrito por Fundora et al., 2005 se obtuvo que la cepa que pertenece al género *Saccharomyces sp*, con esto se procedió a la realización de las siguientes pruebas.

8.4 Cinética de afinidad de sustrato

Para la realización del estudio cinético de afinidad de sustrato hacia la fructosa, se utilizaron 3 cepas, una de cada palenque, utilizando la codificación de acuerdo al palenque como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3 Codificación de las cepas con el palenque al que pertenecen.

| Cepa | LOCALIDAD |
|-------------------|-----------------------|
| ITOYI003 | San Dionisio, Ocotepc |
| ITOYIII002 | Río las Palmas |
| ITOYIV009 | San Pedro Teozacoalco |

8.4.1 Elaboración del medio de cultivo para la cinética y para el preinóculo

Para obtener las cepas del género *Saccharomyces* que tienen afinidad hacia la fructosa, se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento de 24 horas para cada una, para la preparación de la cinética se partió de un preinóculo por cada cepa en cada medio de cultivo, la composición de los medios de cultivo utilizados se muestran en las tablas 4,5 y 6, estos se ajustaron a un pH de 5, a cada frasco se le adicionó 80 mL de medio y las condiciones de esterilización fueron 12 lb/plg² por 20 minutos. Así mismo se preparó el medio de cultivo para la cinética de crecimiento, para esto se ocuparon los tres medios mencionados en las tablas 4,5 y 6, los cuales se ajustaron a pH 5 y posteriormente se utilizaron 18 frascos puesto que se realizó por duplicado, cada frasco se llenó con 30 mL del medio correspondiente, los frascos se esterilizaron a 12 lb/plg² durante 20 minutos, también se prepararon tubos de ensayo y microtubos para toma de muestras durante la cinética, se llevó a esterilización en el autoclave a 121°C a 15 lb/plg² durante 15 minutos.

Tabla 4 Composición del medio de cultivo YPD.

| MEDIO YPD | |
|----------------------|-----------------|
| Composición | Cantidad en g/L |
| Extracto de levadura | 10 |
| Peptona de caseína | 20 |
| Dextrosa | 20 |

Tabla 5 Composición del medio de cultivo YPF.

| MEDIO YPF | |
|----------------------|-----------------|
| Composición | Cantidad en g/L |
| Extracto de levadura | 10 |
| Peptona de caseína | 20 |
| Fructosa | 20 |

Tabla 6 Composición del medio de cultivo YPS.

| MEDIO YPS | |
|----------------------|-----------------|
| Composición | Cantidad en g/L |
| Extracto de levadura | 10 |
| Peptona de caseína | 20 |
| Sacarosa | 20 |

8.4.2 Inoculación del preinóculo y conteo de células viables

Para la realización del preinóculo de cada cepa se utilizaron los frascos con el medio de cultivo, se le adicionaron 0.04g de cloranfenicol y posteriormente se inocularon con la cepa correspondiente en cada frasco por cada medio, dichos preinóculos se incubaron a 30 °C durante 48 horas. Después del tiempo de incubación, 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 sumando lo de los cuatro cuadrantes se utilizó la fórmula para obtener la cantidad de cél/mL. Esto se realizó para las 3 cepas de levaduras mostradas en la tabla 3.

8.4.3 Inoculación de los frascos para la cinética de crecimiento

Los frascos fueron inoculados de acuerdo al medio de cultivo y con el cálculo para obtener la cantidad en μL para inocular 1×10^6 cél/mL partiendo de los preinóculos a la cepa correspondiente como se muestra en la figura 5 al término de la siembra se incubaron a una temperatura de 30°C durante 24 horas



Figura 5 Inoculación de los frascos para cinética de crecimiento.

8.4.4 Método de crecimiento celular por conteo

Por cada punto de la cinética, cada 3 horas se tomaron 2 muestras uno de cada frasco para el conteo de células utilizando la cámara de Neubauer como se muestra en la figura 6 cada 12 horas se tomaron fotos del crecimiento de cada cepa por cada medio.

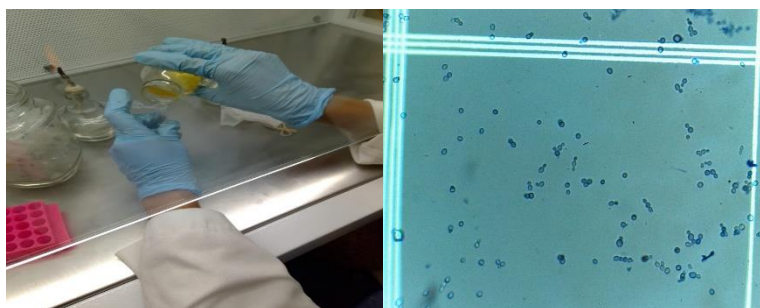


Figura 6 Toma de muestra para conteo en la cámara de Neubauer.

Al tener la gráfica de la cinética, los puntos fueron ajustados de acuerdo al modelo que se basa de la derivación para microbiología de la ecuación modificada de Gompertz, que viene dada por la siguiente ecuación.

$$\log(N) = A + C e^{-B(t-M)}$$

Log (N)= logaritmo decimal de los recuentos microbianos [log (UFC/ mL)] al tiempo t

A=logaritmo de los recuentos cuando el tiempo decrece indefinidamente; equivale, aproximadamente, al logaritmo decimal del nivel inicial de bacterias

C=Logaritmo de los recuentos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente.

M= Tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento [h]

B= Velocidad de crecimiento relativa al tiempo M [h]⁻¹

8.4.5 Método de crecimiento por biomasa en peso seco

Se pesaron los tubos de ensaye vacíos y se llevaron a secado durante 4 horas a una temperatura de 110°C después de este tiempo se volvieron a pesar los tubos y se metieron al desecador hasta lograr un peso constante, después para la cinética de crecimiento se tomó muestra en tubos de ensayo esto para realizar el método de peso seco como se muestra en la figura 6, empezando con la centrifugación de los tubos en cada medio y por cepa para posteriormente descartar el sobrenadante y llevar la biomasa obtenida a secado en la estufa a una temperatura de 110 °C durante 4 horas llevándolos al desecador y finalmente a pesar en la balanza analítica.

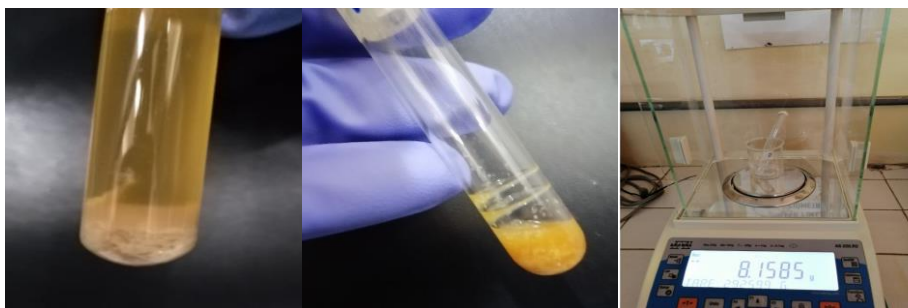


Figura 7 Procedimiento de peso seco por cada punto.

8.4.6 Consumo de sustrato

Para observar el consumo de sustrato en las cinéticas de crecimiento para cada medio de cultivo, se realizó por cada punto el análisis del azúcar presente que es mostrado en la figura 7, para esto se empleó el método colorimétrico para determinación de azúcares reportado por Dubois y colaboradores en 1956.

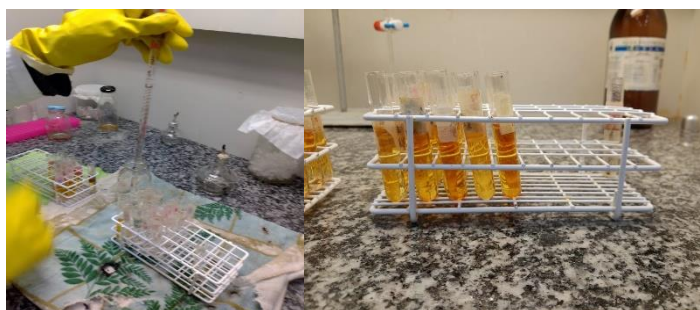


Figura 8 Realización del método para obtención de consumo de azúcar.

8.5 Cinética de tolerancia a etanol y a altas concentraciones de fuente de carbono

Para la realización de la cinética de crecimiento de tolerancia a etanol se seleccionó la cepa ITOYIII002 que obtuvo mayor afinidad hacia la fructosa, al tener la cepa se procedió a realizar el planteamiento del diseño de experimentos quedando un diseño factorial 2×3 el cual es mostrado en la tabla 7 haciendo el análisis de la combinación de 2 niveles de etanol (2 y 4% v/v) y 3 concentraciones de fructosa (40, 80 y 120 g/L) donde la respuesta a analizar fue el crecimiento en términos de velocidad máxima, el estudio cinético fue realizado por duplicado para el análisis estadístico.

Tabla 7 Planteamiento del diseño de experimentos para tolerancia a etanol y asimilación de fuente de carbono.

| Conc. Fructosa % EtOH | 40 g/L | 80 g/L | 120 g/L |
|--------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 2%v/v | $\mu_{\text{máx } 40,2\%}$ | $\mu_{\text{máx } 80,2\%}$ | $\mu_{\text{máx } 120,2\%}$ |
| 4%v/v | $\mu_{\text{máx } 40,4\%}$ | $\mu_{\text{máx } 80,4\%}$ | $\mu_{\text{máx } 120,4\%}$ |

Para la preparación de la cinética se partió de un preinóculo utilizando el medio de cultivo YPF con las 3 concentraciones de la fuente de carbono los cuales son 40, 80 y 120 g/L, estos se ajustaron a pH 5, a cada frasco se le adicionó el medio de cultivo con los volúmenes indicados en la tabla 8 partiendo de un volumen de 30 mL para los cálculos del volumen de etanol, las condiciones de esterilización fueron 12 lb/plg² por 20 minutos. Así mismo se preparó el medio de cultivo para la cinética de crecimiento para la tolerancia a etanol, para esto se utilizó de la misma manera el medio YPF con las tres concentraciones de sustrato y se ajustó a pH 5 que se vertieron en 6 matraces de 250 mL los cuales se ajustaron de acuerdo al volumen de etanol correspondiente como se muestra en la tabla 8 considerando 160 mL como volumen final al adicionar el etanol, los matraces se esterilizaron a 12 lb/plg² durante 20 minutos, también se prepararon tubos de ensayo y microtubos para toma de muestras durante la cinética, se llevó a esterilización en el autoclave a 121°C a 15 lb/plg² durante 15 minutos.

Tabla 8 Volumen de medio añadido para la realización de preinóculos y para el diseño de experimentos.

| Vol. Medio de cultivo %v/v EtOH | mL de medio para preinóculo | mL de medio para matraz del diseño |
|------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| 2% | 29.4 | 156.8 |
| 4% | 28.8 | 153.6 |

8.5.1 Inoculación del preinóculo y conteo de células viables

Para la realización del preinóculo de cada cepa se utilizaron los frascos con el medio de cultivo, se le adicionaron 0.04g de cloranfenicol y posteriormente se le añadió la cantidad correspondiente de etanol a cada frasco, como se muestra en la tabla 9 posteriormente se inocularon con la cepa ITOYIII002, dichos preinóculos se incubaron a 30 °C durante 48 horas.

Tabla 9 Volumen de etanol añadido en los preinóculos y en los matraces del diseño.

| Vol. EtOH añadido %v/v de EtOH | mL de EtOH para Preinóculo | mL de EtOH para matraces del diseño de experimentos |
|-----------------------------------|----------------------------|---|
| 2% | 0.6 | 3.2 |
| 4% | 1.2 | 6.4 |

Después del tiempo, se tomaron 2 muestras en microtubos, esto en la campana de siembra, cuidando la esterilidad del medio. Teniendo las muestras se procedió al conteo en la cámara de recuento (figura 9), el cual se realizó en 4 cuadrantes de la cámara, después del conteo se utilizó la fórmula para obtener la cantidad de cél/mL presentes y obtener el volumen para inocular 1×10^6 cél/mL. Esto se realizó para cada una de las combinaciones del diseño.

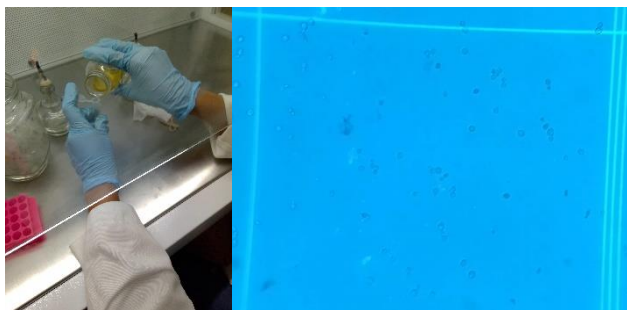


Figura 9 Toma de muestra para conteo de células viables en la cámara de Neubauer.

8.5.2 Inoculación de los matraces del diseño de experimentos

Al tener el volumen a inocular para cada matraz del diseño de experimentos se procedió a añadir el volumen correspondiente de etanol marcado en la tabla 9 así también se le añadió 0.06g de cloranfenicol posteriormente se realizó la inoculación de la cepa ITOYIII002 con la cantidad en μL correspondientes para tener 1×10^6 cél/mL, al terminar la inoculación se taparon los matraces con tela y encima hule para evitar la volatilización del etanol. Los matraces se llevaron a incubación durante 120 horas a una temperatura de 30 °C (figura 10) tomando muestra durante 120 horas para observar el crecimiento en cél/mL, biomasa y azúcares reductores totales.



Figura 10 Incubación de los matraces de la cinética de tolerancia a etanol y asimilación de fuente de carbono

8.5.3 Método de crecimiento celular por conteo

Por cada punto de la cinética, cada 24 horas se tomaron 2 muestras uno de cada frasco para el conteo de células utilizando la cámara de Neubauer como se muestra en la figura 11



Figura 11 Toma de muestra para conteo en la cámara de Neubauer.

Los puntos fueron ajustados de acuerdo al modelo que se basa de la derivación para microbiología de la ecuación modificada de Gompertz, que viene dada por la siguiente ecuación para la determinación de los parámetros cinéticos $X_{\text{máx}}$ y $\mu_{\text{máx}}$.

$$\log(N) = A + C e^{-B(t-M)}$$

Log (N)= logaritmo decimal de los recuentos microbianos [\log (UFC/ mL)] al tiempo t

A=logaritmo de los recuentos cuando el tiempo decrece indefinidamente; equivale, aproximadamente, al logaritmo decimal del nivel inicial de bacterias

C=Logaritmo de los recuentos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente.

M= Tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento [h]

B= Velocidad de crecimiento relativa al tiempo M $[\text{h}]^{-1}$

8.5.4 Método de crecimiento por biomasa en peso seco

Se pesaron los tubos de ensaye vacíos y se llevaron a secado durante 4 horas a una temperatura de 110°C después de este tiempo se volvieron a pesar los tubos y se metieron al desecador hasta lograr un peso constante, después para la cinética de tolerancia a etanol y asimilación de fructosa, se tomó muestra en tubos de ensayo esto para realizar el método de peso seco, empezando con la centrifugación de los tubos en cada medio y por cepa para posteriormente descartar el sobrenadante y llevar la biomasa obtenida a secado en la estufa a una temperatura de 110 °C durante 4 horas llevándolos al desecador y finalmente a pesar en la balanza analítica.

9 Resultados

9.1 Pruebas de asimilación/fermentación de fuente de carbono

De acuerdo a la realización de las pruebas de asimilación/fermentación y la observación morfológica en el microscopio, así como lo reportado por Fundadora et al.,2005 se obtuvo que la cepa ITOYIII002 correspondiente al palenque III Río las Palmas es del género *Saccharomyces* sp. Los resultados son mostrados en la tabla 10

Tabla 10 Resultados de las pruebas bioquímicas por cepa.

| | Cepas ITOYIII | | | | | | | |
|--------|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Código | 001 | 002 | 003 | 004 | 005 | 006 | 007 | 009 |
| Glu | +/- | +/+ | +/+ | +/+ | -/- | +/+ | +/+ | +/+ |
| Fruc | +/+ | +/+ | +/+ | -/- | +/- | +/+ | +/+ | +/+ |
| Sac | +/- | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | +/- |
| Mal | +/+ | +/+ | +/+ | +/- | +/- | +/+ | +/+ | +/+ |
| Man | +/- | +/+ | +/+ | +/+ | -/- | +/+ | +/+ | -/- |
| Inu | +/- | +/+ | +/+ | -/- | +/- | +/+ | +/+ | -/- |
| Sor | +/+ | +/+ | +/+ | -/- | -/- | +/+ | +/+ | -/- |
| Gal | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | -/- | +/+ | +/+ | -/- |
| Lac | +/- | +/+ | +/+ | +/- | +/- | +/+ | +/+ | +/+ |

9.2 Cinética de afinidad de sustrato para obtención de cepas de *Saccharomyces* fructofílicas

De acuerdo al procedimiento utilizado en la caracterización cinética se obtuvieron gráficas que muestran el comportamiento del crecimiento tanto en cél/ mL mediante el ajuste al modelo de Gompertz como por medio de biomasa, así también se tiene el consumo de cada fuente de carbono por cepa.

9.2.1 Cepa ITOYI003

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para la cepa ITOYI003 perteneciente al palenque I de la comunidad de San Dionisio Ocotepec, el comportamiento cinético se visualiza mediante gráficas de crecimiento celular con el modelo de Gompertz, biomasa y consumo de sustrato

9.2.1.1 Método de cél/mL con el ajuste al modelo de Gompertz

En la figura 12 se observa el crecimiento de la cepa en los tres medios de cultivo, tanto la gráfica del experimento representado con puntos como el ajuste en el modelo representado por las líneas punteadas. Se observa en la gráfica que los medios de cultivo por el que tiene afinidad es YPF el cual contiene fructosa, que está representado en color azul y YPS que contiene sacarosa que está representado por el color verde.

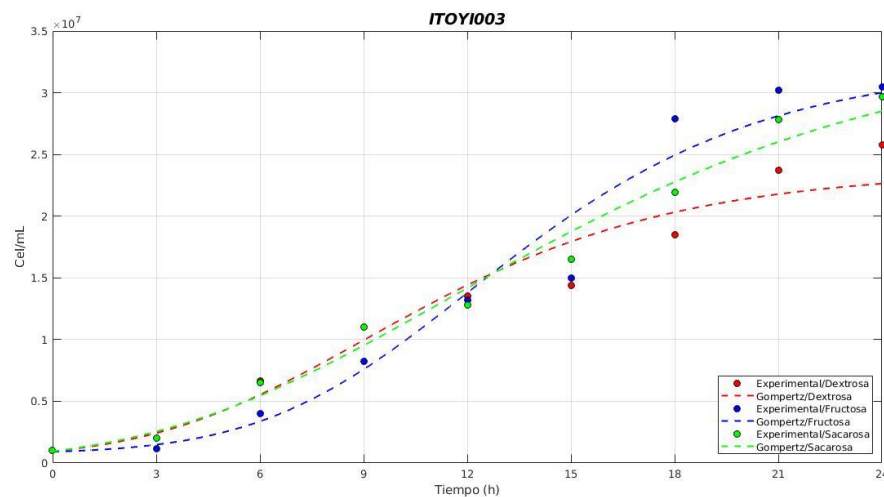


Figura 12 Gráfica del ajuste de los datos al modelo de Gompertz para la cepa ITOYI003 en los tres medios de cultivo.

En la realización de la modelación se obtuvieron los parámetros cinéticos de crecimiento máximo en cél/mL y la velocidad máxima de crecimiento dado en h⁻¹ las cuales se muestran en la tabla 11 por cada medio de cultivo

Tabla 11 Parámetros cinéticos de la cepa ITOYI003 para los 3 medios de cultivo.

| Medio de cultivo | Crecimiento máximo en cél/mL ($X_{\text{máx}}$) | Velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) |
|------------------|---|--|
| YPD | 2.37×10^7 | 0.1375 |
| YPF | 3.23×10^7 | 0.1260 |
| YPS | 3.46×10^7 | 0.2091 |

De acuerdo al crecimiento máximo y a la velocidad obtenida en cada medio para la cepa ITOYI003 se observa que utilizando el medio YPS se obtiene el mayor crecimiento y la mayor velocidad. Por su parte Peña y Arango en el 2009 realizaron un estudio donde evaluaron la producción de etanol, el crecimiento celular y el consumo de sustrato de tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae* una de control y dos recombinantes, dichas cepas estuvieron bajo el efecto de dos concentraciones de sacarosa en medio sintético a 170 y 250 g/L (YPS), observaron que las $\mu_{\text{máx}}$ se ve disminuida con respecto a la concentración de azúcares encontrándose en un promedio de 0.1729-0.0498 h

9.2.1.2 Método de biomasa por peso seco

EL crecimiento de la cepa ITOYI003 es mostrado en la figura 13 donde se observa que el medio de cultivo en el que se obtuvo mayor biomasa es YPD seguido del medio YPF que contiene fructosa y por último el medio YPS, al hacer la comparación con la gráfica de la figura 13 y con los parámetros cinéticos se puede observar que en el medio YPS es el que mayor número de células viables obtuvo a pesar de que la cepa generó menos biomasa en este medio a comparación de los otros dos, las células lograron adaptarse y asimilar la sacarosa teniendo afinidad hacia esta fuente de carbono así también conforme a la ruta metabólica de las levaduras al tener menor crecimiento en biomasa la cepa se condujo hacia la ruta de producción de etanol.

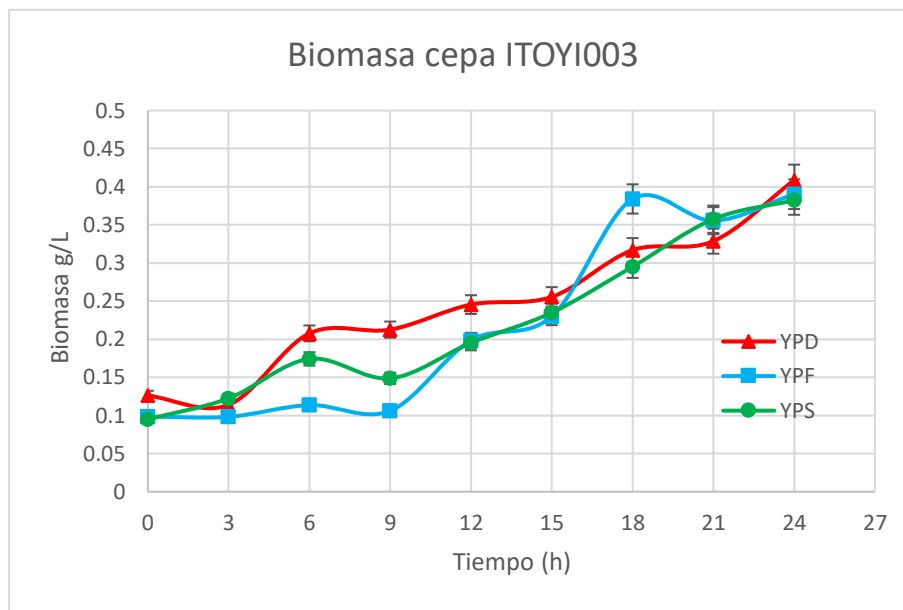


Figura 13 Gráfica de crecimiento por el método de biomasa dada en g/L de la cepa ITOYI003

9.2.1.3 Consumo de fuente de carbono

Por medio de la metodología realizada para obtener el consumo de la fuente de carbono en cada medio se puede observar en la figura 14 que los sustratos que se consumieron en mayor cantidad fueron la sacarosa y fructosa que corresponden a los medios YPS y YPF respectivamente esto se puede observar también en la tabla 12 que nos muestra que la sacarosa fue consumida en un 57.55% seguido de YPF con un valor de 55.385% y en tercer lugar el medio YPD con un valor de 36.574%

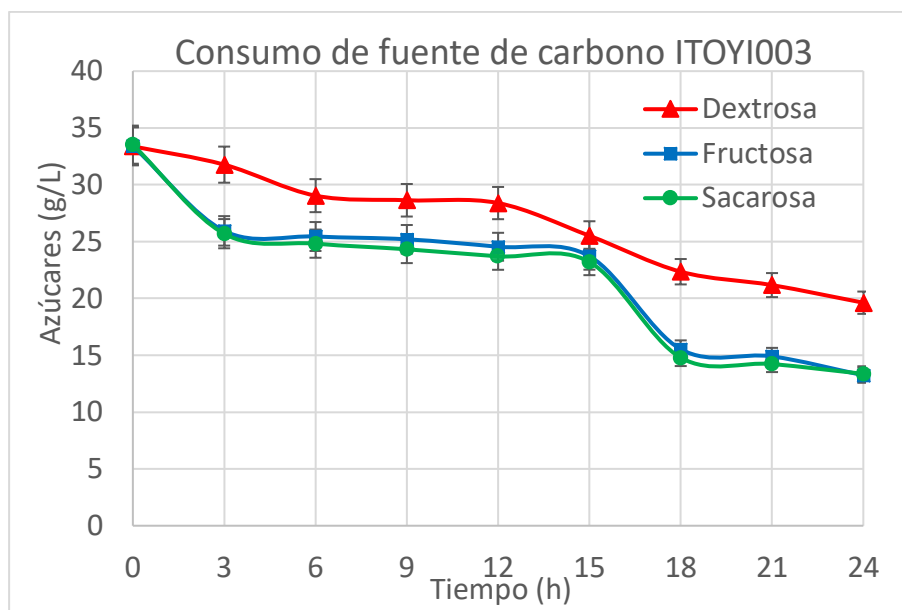


Figura 14 Gráfica del consumo de fuente de carbono de la cepa ITOYI003.

Tabla 12 Porcentaje de consumo de fuente de carbono de la cepa ITOYI003.

| Cepa | Medio de cultivo | g/L en el inicio | g/L al final | % de azúcar presente al final | % azúcar consumido |
|----------|------------------|------------------|--------------|-------------------------------|--------------------|
| ITOYI003 | YPD Dextrosa | 33.381 | 21.172 | 63.425 | 36.574 |
| | YPF Fructosa | 33.406 | 14.904 | 44.614 | 55.385 |
| | YPS Sacarosa | 33.530 | 14.230 | 42.441 | 57.558 |

En contraste Dumont y colaboradores en 2008 realizaron un estudio sobre la capacidad de las levaduras enológicas de consumir fructosa mediante la relación de glucosa y fructosa a diferentes concentraciones en donde midieron su índice fructofílico mostrando que la cepa comercial UVAFERM YSEO® 43 fue la levadura que mostró la mayor capacidad para consumir fructosa a comparación de otras cepas enológicas.

9.2.2 Cepa ITOYIII002

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para la cepa ITOYIII002 perteneciente al palenque III de la comunidad de Río las palmas, el comportamiento cinético se visualiza mediante gráficas de crecimiento celular con el modelo de Gompertz, biomasa y consumo de sustrato

9.2.2.1 Método de Cél/mL con el ajuste al modelo de Gompertz

En la figura 15 se observa el crecimiento de la cepa en los tres medios de cultivo, tanto los puntos experimentales como el ajuste en el modelo representado por las líneas punteadas. Se observa en la gráfica que el medio de cultivo por el que tiene afinidad es YPF el cual contiene fructosa, que está representado en color azul de igual manera también presenta un crecimiento favorable en el medio YPS.

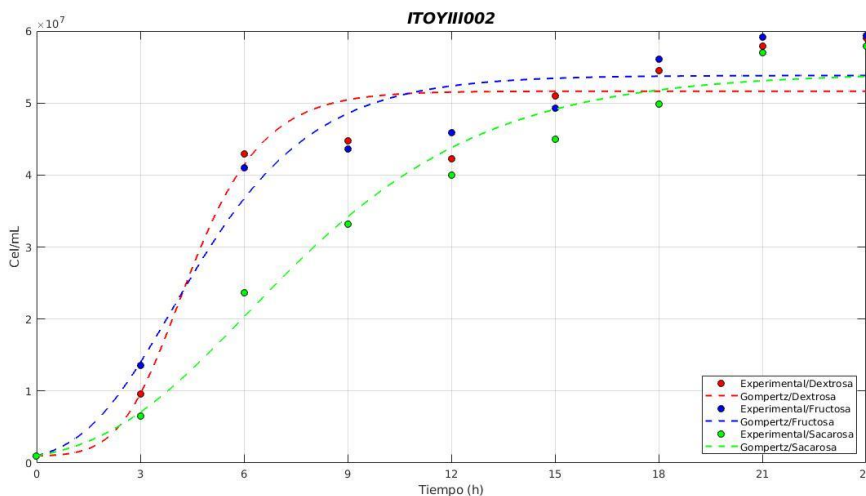


Figura 15 Gráfica del ajuste de los datos al modelo de Gompertz para la cepa ITOYIII002 en los tres medios de cultivo.

Con la modelación se obtuvieron los parámetros cinéticos de crecimiento máximo en células/mL y la velocidad máxima de crecimiento dado en h⁻¹ las cuales se muestran en la tabla 13 por cada medio de cultivo

Tabla 13 Parámetros cinéticos de la cepa ITOYIII002 para los 3 medios de cultivo.

| Medio de cultivo | Crecimiento máximo en cél/mL ($X_{\text{máx}}$) | Velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) |
|------------------|---|--|
| YPD | 5.16×10^7 | 0.4780 |
| YPF | 5.38×10^7 | 0.5466 |
| YPS | 5.42×10^7 | 0.4898 |

De acuerdo al crecimiento máximo y a la velocidad obtenida en cada medio para la cepa ITOYI003 se observa que utilizando el medio YPS se obtiene el mayor crecimiento y el medio YPF tiene la mayor velocidad de crecimiento presentando un crecimiento máximo de 5.38×10^7 cél/mL. En contraste Oliva et al., (2009) caracterizaron cinéticamente cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas del proceso de producción de mezcal tamaulipeco, evaluándose en dos diferentes medios sintéticos uno con relación glucosa: fructosa 9:1 y otra fructosa: glucosa de 9:1 obteniendo como resultado los aislamientos fructofílicos en donde una cepa mostró que tenía el mejor carácter fructofílico y a su vez la mejor producción de etanol

9.2.2.2 Método de biomasa por peso seco

De acuerdo a los datos obtenidos por medio de la metodología de biomasa por peso seco se puede observar en la figura 16 que tanto en el medio YPS como YPF obtienen la mayor cantidad de biomasa en g/L lo cual coincide con la figura 15 que nos muestra el crecimiento en cél/mL, así como en la tabla 13 donde se puede observar que en el medio YPS se tiene el mayor crecimiento en cél/mL

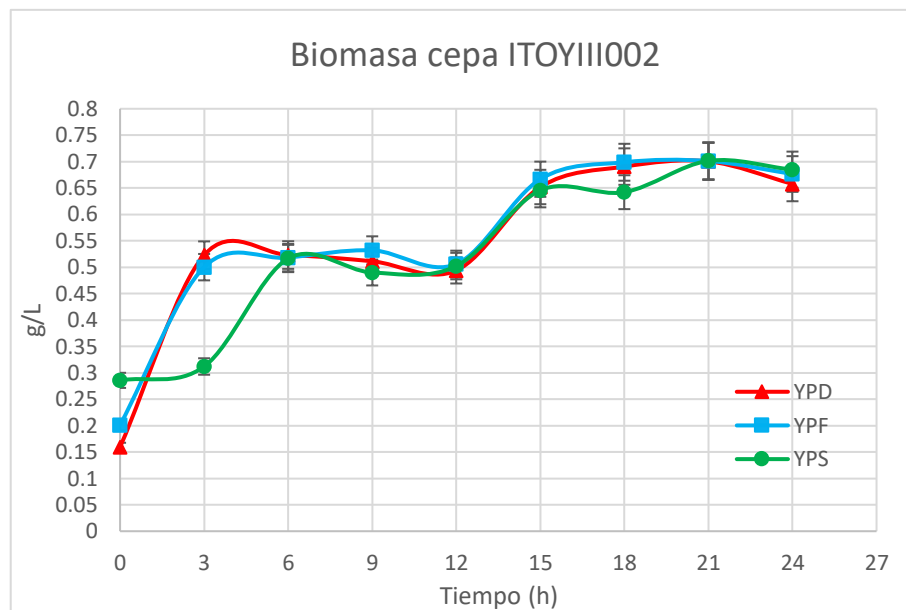


Figura 16 Gráfica de crecimiento por el método de biomasa dada en g/L de la cepa ITOYIII002

9.2.2.3 Consumo de fuente de carbono

Mediante la metodología realizada para obtener el consumo de azúcar en cada punto de la cinética de crecimiento se pudo obtener la figura 17 la cual muestra que el mayor consumo de fuente de carbono al final de la cinética se presenta en el medio YPD y YPS, el porcentaje de azúcar consumido fue de 75.223% y 74.763% respectivamente, el medio YPF muestra el menor consumo en porcentaje con un valor de 69.801%, estos datos de consumo se pueden visualizar en la tabla 14, que nos refleja que esta cepa hace uso en mayor cantidad la dextrosa para lograr su crecimiento.

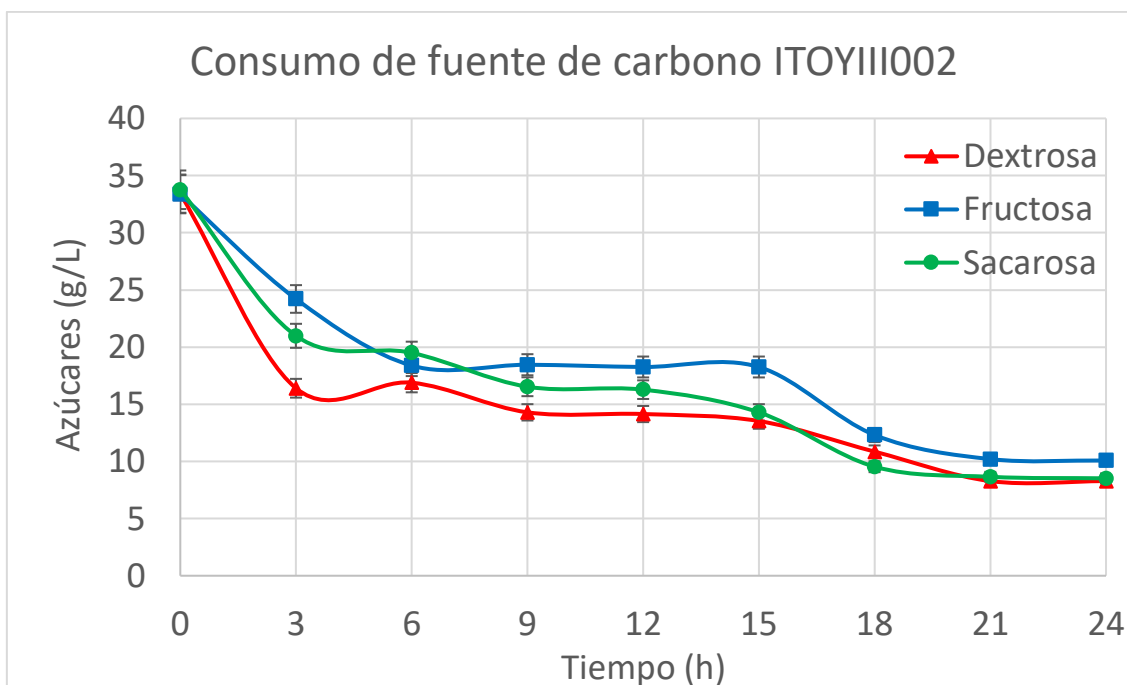


Figura 17 Gráfica del consumo de fuente de carbono de la cepa ITOYIII002.

Tabla 14 Porcentaje de consumo de fuente de carbono de la cepa ITOYIII002.

| Cepa | Medio de cultivo | g/L en el inicio | g/L al final | % de azúcar presente al final | % azúcar consumido |
|------------|------------------|------------------|--------------|-------------------------------|--------------------|
| ITOYIII002 | YPD Dextrosa | 33.422 | 8.280 | 24.776 | 75.223 |
| | YPF Fructosa | 33.373 | 10.078 | 30.198 | 69.801 |
| | YPS Sacarosa | 33.761 | 8.520 | 25.236 | 74.763 |

9.2.3 Cepa ITOYIV009

Se presentan los resultados obtenidos para la cepa ITOYIV009 perteneciente al palenque IV de la comunidad de San Pedro Teozacoalco, el comportamiento cinético se visualiza mediante gráficas de crecimiento celular con el modelo de Gompertz, biomasa y consumo de sustrato

9.2.3.1 Método de Cél/mL con el ajuste al modelo de Gompertz

En la figura 18 se observa el crecimiento de la cepa en los tres medios de cultivo, tanto la gráfica de los datos experimentales que está representado con puntos como el ajuste en el modelo representado por las líneas punteadas. Se observa en la gráfica que los medios de cultivo por el que tiene afinidad es YPD el cual contiene dextrosa, que está representado en color rojo.

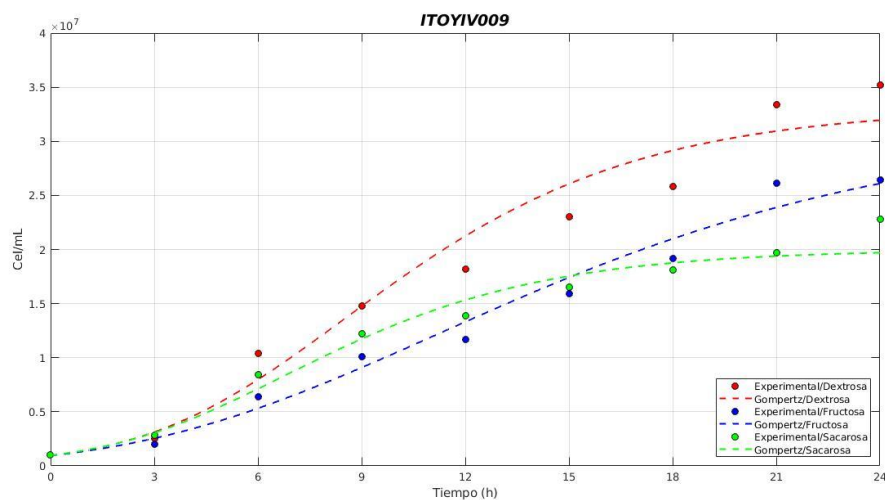


Figura 18 Gráfica del ajuste de los datos al modelo de Gompertz para la cepa ITOYIV009 en los tres medios de cultivo.

Se obtuvieron los parámetros cinéticos de crecimiento máximo en cél/mL y la velocidad máxima de crecimiento dado en h⁻¹ las cuales se muestran en la tabla 15 por cada medio de cultivo.

Tabla 15 Parámetros cinéticos de la cepa ITOYIV009 para los 3 medios de cultivo.

| Medio de cultivo | Crecimiento máximo en cél/mL ($X_{\text{máx}}$) | Velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) |
|------------------|---|--|
| YPD | 3.25×10^7 | 0.1745 |
| YPF | 3.14×10^7 | 0.2308 |
| YPS | 2.01×10^7 | 0.1739 |

De acuerdo al crecimiento máximo y a la velocidad obtenida en cada medio para la cepa ITOYIV009 se observa que utilizando el medio YPD que contiene dextrosa se obtiene el mayor crecimiento y el medio YPF tiene la mayor velocidad de crecimiento presentando un crecimiento máximo de 3.14×10^7 cél/mL. Por su parte Torres et al., (2017) realizaron un estudio cuyo objetivo era establecer un medio de cultivo para el crecimiento de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, empleada a nivel industrial para la producción de tequila para ello probaron tres medios de cultivo: medio YPD, medio rico conteniendo azúcar invertido como fuente de carbono, extracto de levadura, microelementos y vitaminas (medio 1) y un medio definido con azúcar invertido, como fuente de carbono, y fuentes inorgánicas de nitrógeno, vitaminas y microelementos (medio 2), en su estudio mostró que en la producción de biomasa el medio YPD y el medio 1 muestran mayor crecimiento produciendo prácticamente el mismo crecimiento.

9.2.3.2 Método de biomasa por peso seco

En la figura 19 se tiene el comportamiento del crecimiento en g/L de la cepa ITOYIV009 en donde se observa que el medio en donde se generó mayor cantidad de biomasa es YPD seguido del medio YPF, este comportamiento se relaciona con lo obtenido en

crecimiento máximo en cél/mL mostrado en la tabla 15 y mediante la gráfica de crecimiento celular en el modelo de Gompertz.

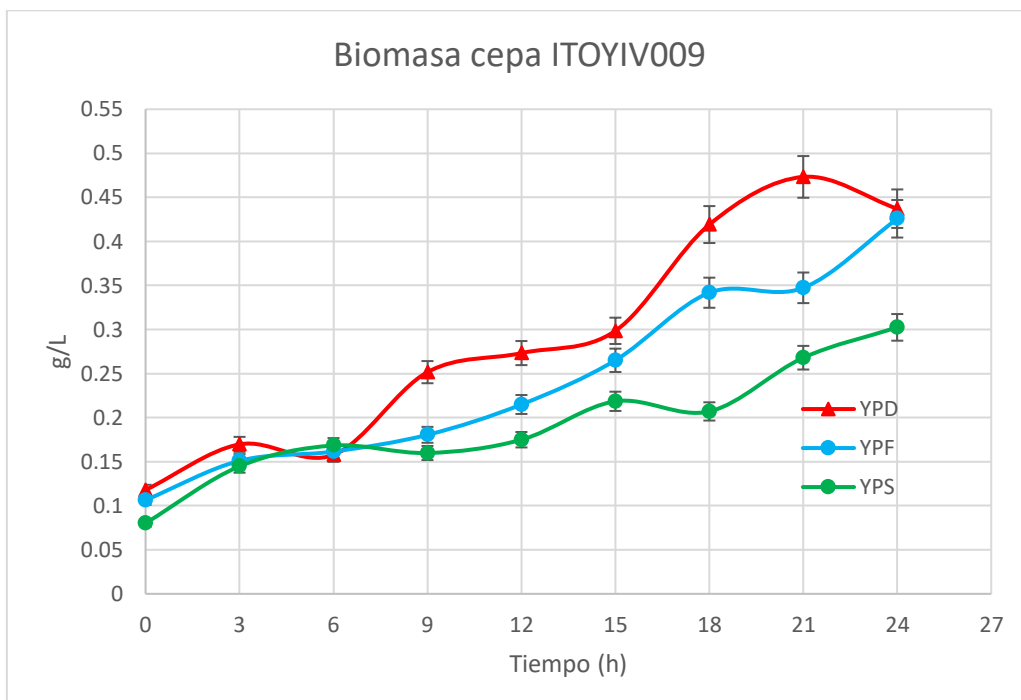


Figura 19 Gráfica de crecimiento por el método de biomasa dada en g/L de la cepa ITOYIV009.

9.2.3.3 Consumo de fuente de carbono

En la figura 20 se observa el consumo de los azúcares dextrosa, fructosa y sacarosa presentes en los medios de cultivo YPD, YPF y YPS, se puede ver que el medio YPF y YPS al final de la cinética presentó mayor consumo, en la tabla 16 se tiene que el porcentaje consumido fue de 63.252% en YPF y 61.412 % en YPS y el menor consumo de carbohidrato fue de 52.530% correspondiente al medio YPD. Relacionando lo obtenido en la tabla 15 que muestran los parámetros cinéticos se puede ver que en el medio que contiene dextrosa tiene un mayor crecimiento consumiendo menos de esta

fuentes de carbono, también se tiene que en el medio YPF la cepa presenta mayor velocidad de crecimiento por lo que realizó un consumo mayor de este azúcar.

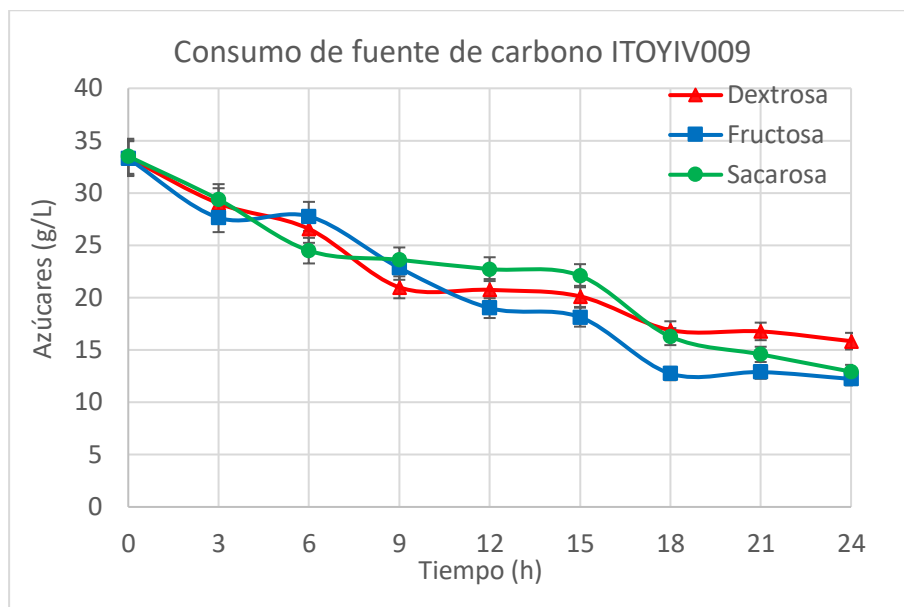


Figura 20 Gráfica del consumo de fuente de carbono de la cepa ITOYIV009.

Tabla 16 Porcentaje de consumo de fuente de carbono de la cepa ITOYIV009.

| Cepa | Medio de cultivo | g/L en el inicio | g/L al final | % de azúcar presente al final | % azúcar consumido |
|-----------|------------------|------------------|--------------|-------------------------------|--------------------|
| ITOYIV009 | YPD Dextrosa | 33.373 | 15.842 | 47.469 | 52.530 |
| | YPF Fructosa | 33.282 | 12.230 | 36.747 | 63.252 |
| | YPS Sacarosa | 33.505 | 12.929 | 38.587 | 61.412 |

9.3 Cinética de tolerancia a etanol y a altas concentraciones de fuente de carbono

De acuerdo a la metodología realizada para el diseño de experimentos se realizó el cálculo de las velocidades de crecimiento de acuerdo al modelo de Gompertz en cada combinación del diseño teniendo los datos de las repeticiones, los cuales se muestran en la tabla 17

Tabla 17 Velocidades máximas de crecimiento de la cepa ITOYIII002 con las combinaciones del diseño.

| Conc. Fructosa % EtOH | 40 g/L | 80 g/L | 120 g/L |
|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 2%v/v | 0.8991 h ⁻¹ | 0.6346 h ⁻¹ | 1.0040 h ⁻¹ |
| | 0.8914 h ⁻¹ | 0.6378 h ⁻¹ | 0.9750 h ⁻¹ |
| 4%v/v | 1.0592 h ⁻¹ | 0.9952 h ⁻¹ | 0.7164 h ⁻¹ |
| | 1.0123 h ⁻¹ | 0.9942 h ⁻¹ | 0.7117 h ⁻¹ |

9.3.1 Análisis estadístico

Al tener las velocidades máximas de crecimiento se procedió a la realización del análisis estadístico en el programa Minitab ® donde se partió por la prueba de homogeneidad de varianzas en seguida la realización de ANOVA y por ultimo las comparaciones múltiples, el análisis completo se muestra en el anexo I

9.3.1.1 Prueba de homogeneidad de varianzas

Para el análisis de los datos se realizó la prueba de homogeneidad de varianzas teniendo como hipótesis nula:

H₀: La variabilidad en la velocidad de crecimiento de la cepa ITOYIII002 es igual con todas las combinaciones de % de etanol y la concentración de fructosa.

Tabla 18 Prueba de homogeneidad de varianza con el valor de P

| Método | Estadística de prueba | Valor p |
|----------|-----------------------|---------|
| Bartlett | 9.79 | 0.081 |

De acuerdo al valor de P obtenido (tabla 18) nos muestra que la varianza es homogénea es decir que no existe diferencia significativa en la variabilidad de la velocidad de crecimiento dada en h^{-1} con las diferentes combinaciones de porcentaje de etanol y concentración de fructosa en g/L ya que P es mayor a $\alpha=0.05$ por lo que se pudo proceder a la realización del ANOVA.

9.3.1.2 Análisis de varianza

Al saber que las varianzas entre los datos eran homogéneas se procedió a la realización del análisis de varianza (ANOVA) donde se realizan las pruebas de efectos principales y de la interacción entre los factores.

La tabla 19 muestra el resultado del ANOVA de acuerdo a los datos de velocidad de crecimiento analizados.

Tabla 19 ANOVA para la cinética de tolerancia a etanol y concentración de fructosa

Análisis de varianza de velocidad máxima en h^{-1}

| Fuente | GL | SC | MC | F | P |
|---|----|--------|--------|--------|---------|
| Porcentaje de etanol | 1 | 0.0167 | 0.0167 | 63.90 | 0.00020 |
| Concentración de fructosa en g/L | 2 | 0.0490 | 0.0245 | 94.05 | 0.00003 |
| Porcentaje de etanol*concentración de fructosa en g/L | 2 | 0.2075 | 0.1037 | 397.78 | 0.00000 |
| Error | 6 | 0.0016 | 0.0003 | | |
| Total | 11 | 0.2747 | | | |

9.3.1.2.1 Prueba de efectos principales del diseño de experimentos

-Para el porcentaje de etanol la hipótesis nula es:

H_0 : La velocidad de crecimiento de la cepa ITOYIII002 es igual con los dos porcentajes de etanol.

Tabla 20 Prueba de efecto de porcentaje de etanol.

| Fuente de variación | Estadístico de prueba F | P observada |
|---------------------|-------------------------|-------------|
| % de etanol | 63.90 | 0.00020** |

**Altamente significativo

La tabla 20 nos muestra el valor de P observada la cual es menor al valor de $\alpha=0.05$ y a α de 0.01 que tienen un nivel de confianza del 95 y 99% respectivamente, estos valores nos indican que existe una diferencia altamente significativa en la velocidad de crecimiento dada en h^{-1} con al menos un porcentaje de etanol, esto quiere decir que el porcentaje de etanol influye de manera directa en la velocidad de crecimiento de la cepa ITOYIII002 por lo que es un factor que tiene gran importancia para lograr un crecimiento adecuado.

-Para la concentración de fructosa

H_0 : La velocidad de crecimiento de la cepa ITOYIII002 es igual con las dos concentraciones de fructosa dada en g/L.

Tabla 21 Prueba de efecto de la concentración de fructosa dada en g/L.

| Fuente de variación | Estadístico de prueba F | P observada |
|---------------------------------------|-------------------------|-------------|
| Concentración de fructosa dada en g/L | 94.05 | 0.00003** |

**Altamente significativo

En la tabla 21 se muestran el valor obtenido en el estadístico de prueba y en la P observada la cual es menor a un α de 0.05 y de 0.01 con un nivel de confianza del 95 y 99% respectivamente esto nos indica que existe una diferencia altamente significativa en la velocidad de crecimiento dada en h^{-1} con al menos una concentración de fructosa dada en g/L. La concentración de fructosa afecta de manera directa a la velocidad de crecimiento y por lo tanto influye para obtener un crecimiento adecuado de la cepa.

9.3.1.2.2 Prueba de interacciones entre factores

A continuación, se muestra la prueba de interacción entre los factores con sus niveles teniendo como hipótesis nula:

H_0 : La velocidad de crecimiento de la cepa ITOYIII002 es igual con todas las combinaciones de porcentaje de etanol y las concentraciones de fructosa dada en g/L.

En la tabla 22 se muestran los resultados del estadístico de prueba y la P observada con el cual se pudo comparar con los dos valores de α de 0.05 y 0.01 para analizar si existe una diferencia significativa o altamente significativa en la interacción de los factores.

Tabla 22 Prueba de interacción entre los factores de porcentaje de etanol y concentración de fructosa dado en g/L.

| Fuente de variación | Estadístico de prueba F | P observada |
|---|-------------------------|-------------|
| Interacción porcentaje de etanol y Concentración de fructosa dada en g/L | 397.78 | 0.00000** |

**Altamente significativo

De acuerdo al valor de P observado se puede saber que existe una diferencia altamente significativa en la velocidad de crecimiento dada en h^{-1} con al menos una combinación del porcentaje de etanol y la concentración de fructosa dado en g/L es decir que la interacción entre los factores es de importancia para obtener una mejor velocidad de crecimiento de la cepa ITOYIII002 puesto que con al menos una de estas combinaciones genera un cambio significativo.

9.3.1.2.3 Comparaciones múltiples

Para conocer la combinación entre el porcentaje de etanol y la concentración de fructosa en la cual la cepa ITOYIII002 presenta mayor velocidad de crecimiento se realizó las comparaciones múltiples haciendo uso de la diferencia mínima significativa (DMS) y por medio de las gráficas de interacciones para observar el comportamiento.

De acuerdo al procedimiento comparaciones múltiples por medio del análisis de medias mostrado en el Anexo I se tiene los siguientes resultados de las agrupaciones que se observan en la tabla 23.

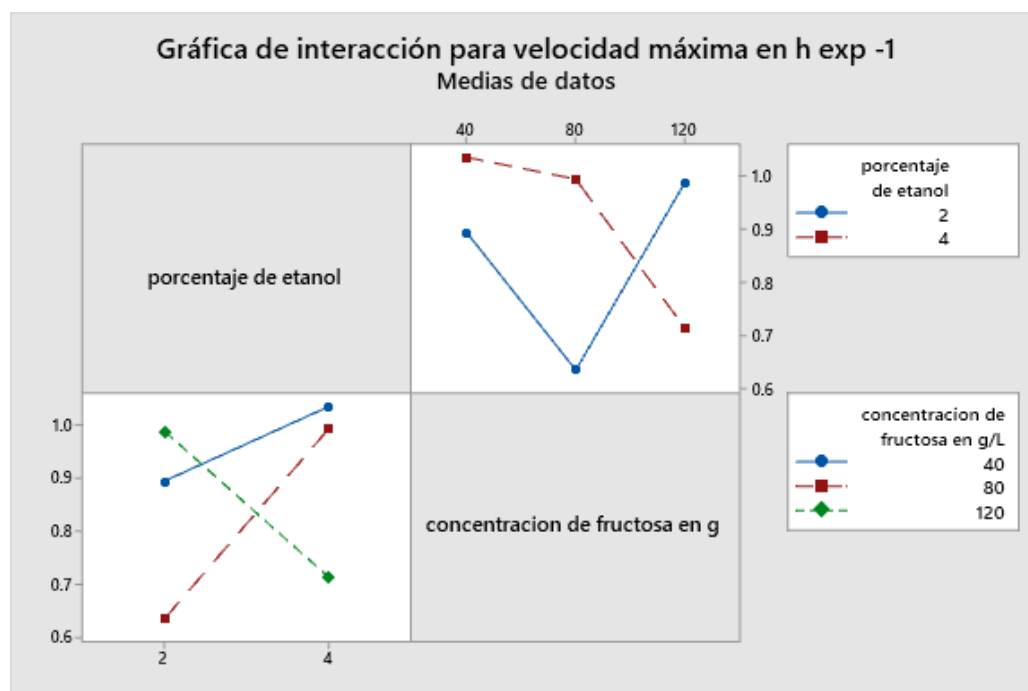
Tabla 23 Agrupaciones obtenidas para la interacción entre los factores.

| | | |
|---|-----------|---------|
| A | 4%-40 g/L | 1.03575 |
| B | 4%-80 g/L | 0.99469 |
| B | 2%-120g/L | 0.98949 |
| C | 2%- 40g/L | 0.89529 |
| D | 4%-120g/L | 0.71408 |
| E | 2% -80g/L | 0.63617 |

La tabla 23 nos muestra las agrupaciones obtenidas mediante el análisis de las medias con la DMS en base a estos datos se tiene que el grupo A que corresponde a la combinación de 4% de etanol con 40 g/L de fructosa se obtiene la mayor velocidad de crecimiento con un valor en promedio de $1.035 h^{-1}$. El grupo B no tiene una diferencia

significativa en la velocidad de crecimiento utilizando las combinaciones de 4% de etanol con 80g/L de fructosa y 2% con 120 g/L de fructosa por lo que con ambas combinaciones se obtiene una velocidad de crecimiento parecida. En el caso de las combinaciones que no comparten una letra quiere decir que si existe una diferencia significativa en la velocidad de crecimiento. Así mismo se observa que la combinación en la cual la cepa ITOYIII002 crece de manera más lenta en con 2% de etanol y 80 g/L de fructosa. Estos datos se pueden observar de manera gráfica en la figura 21 donde se observa la relación entre las combinaciones teniendo que en el caso del porcentaje de etanol al tener 2 % (línea roja) con 40 g/L se logra mayor velocidad de crecimiento, pero con 80 g/L la velocidad es menor. En contraste en la investigación realizada por Reyes-Rodríguez y colaboradores en 2021 donde sometieron a condiciones extremófilas de pH, fuente de carbono y porcentaje de etanol de tres cepas de levaduras teniendo como resultado que las cepas se adaptaron mejor a un pH de 9, una fuente de carbono de 40 g/L y un porcentaje de etanol de 2%v/v.

Figura 21 Gráfica de interacciones de los factores para la velocidad máxima de crecimiento.



9.3.2 Cinética de crecimiento por el método de biomasa

A continuación, se muestra el comportamiento cinético utilizando el promedio de los datos de la cepa con las condiciones de crecimiento establecidas en el diseño de experimentos.

9.3.2.1 Comportamiento cinético de la cepa ITOYIII002 CON 2 % v/v de etanol

En la figura 22 se muestra el comportamiento cinético durante las 120 horas de la cepa ITOYIII002 donde se puede observar que en las tres concentraciones de la fuente de carbono que es fructosa comienzan en la fase exponencial esto se debe a que las cepas se encontraban adaptadas con cada una de las condiciones establecidas en el preinóculo por lo que al momento de inocularlas se encontraban en la fase exponencial, así también se visualiza que el mayor crecimiento en términos de biomasa en g/L fue con una concentración de 120 g/L siendo a las 96 horas su punto máximo al igual que con la concentración de 40 g/L, en el caso de la concentración a 80 g/L el punto máximo fue a las 48 horas a partir de este punto la cepa presentó su fase estacionaria.

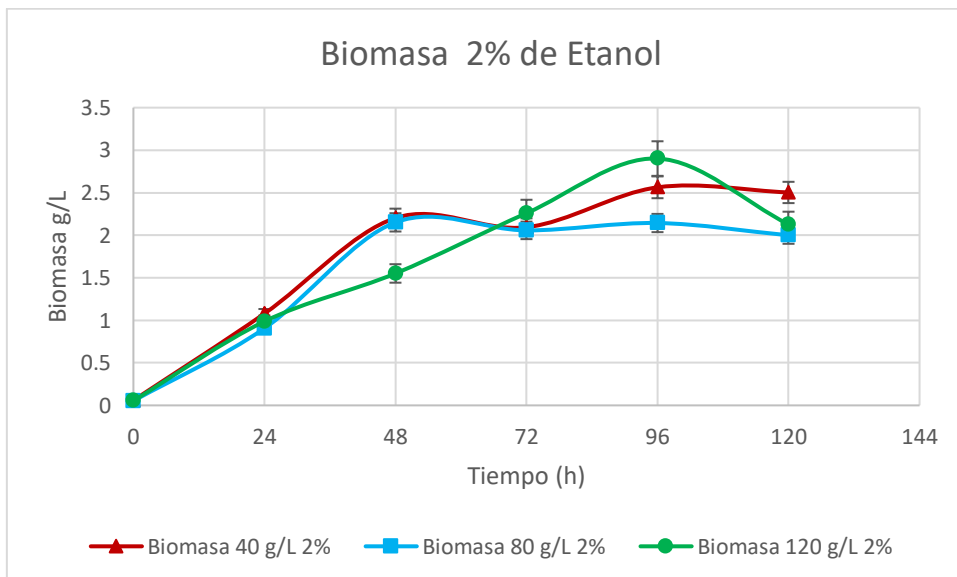


Figura 22 Comportamiento cinético de la cepa ITOYIII002 en 2% v/v de etanol con las tres concentraciones de fructosa.

9.3.2.2 Comportamiento cinético de la cepa ITOYIII002 CON 4 % v/v de etanol

De acuerdo a la cinética de tolerancia a etanol y a altas concentraciones de fuente de carbono (fructosa) se obtuvo el comportamiento de la cepa ITOYIII002 que es mostrado en la figura 23 donde se puede observar que con el nivel de 4% v/v de etanol con las tres concentraciones de fructosa el crecimiento desde las primeras horas fue exponencial ya que la cepa al momento de inocular a los matraces del diseño se encontraban en esta fase por lo que no le costó trabajo en adaptarse al medio, respecto al crecimiento máximo en biomasa se observa que con 40 g/L se genera la mayor cantidad a las 72 horas, la combinación con la que la cepa generó menos biomasa es con 120 g/L de fructosa, que se puede deber a que la cepa le cuesta más trabajo asimilar la fuente de carbono por la cantidad presente en el medio, en esta combinación de 4% con las tres concentraciones de fructosa se observa que a mayor concentración de fructosa menor cantidad de biomasa es generada.

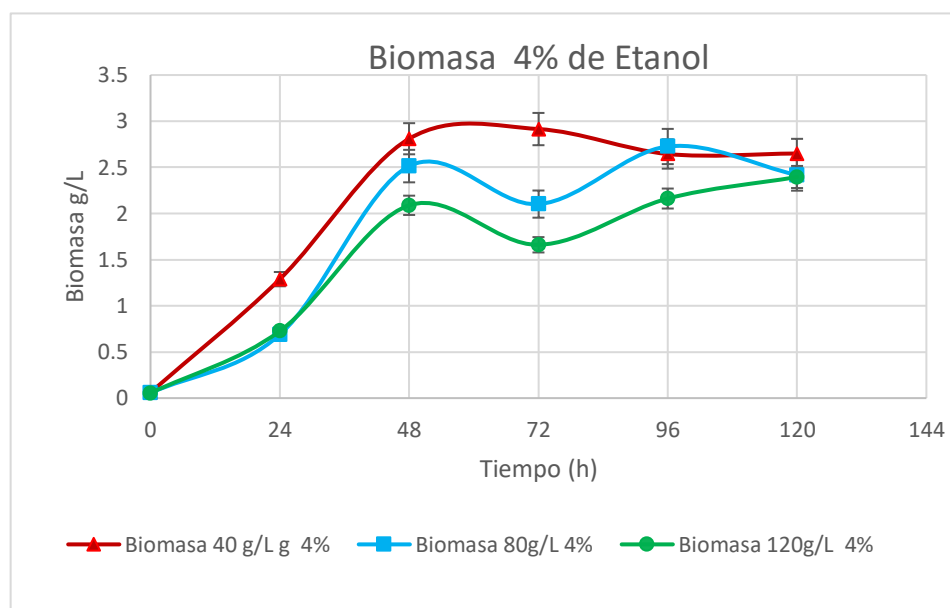


Figura 23 Comportamiento cinético de la cepa ITOYIII002 a 4%v/v de etanol con las tres concentraciones de fructosa.

10 Conclusiones

En base al estudio cinético realizado, se puede concluir que las cepas nativas del mosto del mezcal de Oaxaca en las diferentes localidades tienen un comportamiento único a pesar de que pertenecen a la misma familia. De acuerdo al estudio cinético de afinidad de fuente de carbono para encontrar las cepas fructofílicas se puede concluir que la cepa ITOYIII002 es la que presenta mayor afinidad hacia este sustrato puesto que su velocidad de crecimiento fue mayor, así también comparando los parámetros cinéticos se pudo observar que en las tres fuentes de carbono obtuvo mayor crecimiento a comparación de las cepas ITOYI003 e ITOYIV009. Así mismo se tiene que en el estudio de tolerancia a etanol y a altas concentraciones de fructosa utilizando el medio YPF se puede saber que tanto el porcentaje de etanol como la concentración de fuente de carbono influyen de manera directa en el crecimiento de la cepa que fue visto mediante la curva de crecimiento de biomasa y a la velocidad de crecimiento analizada mediante el análisis de varianza así también la combinación entre los niveles de los factores permiten ver la manera en que la cepa puede asimilar en conjunto el etanol y la fructosa, conforme a esto se tiene que la cepa ITOYIII002 obtiene mayor velocidad de crecimiento en la combinación de 40 g/L con 4% de etanol sin embargo también tolera altas concentraciones con un nivel bajo de 2% v/v de etanol por lo que se puede concluir que la cepa es tolerante a las concentraciones de fructosa cuando el porcentaje de etanol es bajo, y cuando el nivel de etanol aumenta la cepa tendrá menor velocidad para asimilar las concentraciones altas.

11 Bibliografía

1. 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, México. Consultado en <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/91/1/Elba%20Montserrat%20Alcazar%20Valle.pdf>
2. Cruz, V.C.L.2020. Comportamiento de un consorcio microbiano a partir de cepas aisladas de mosto procedente del estado de Oaxaca. Tesis de maestría, Instituto Tecnológico de Oaxaca, Oaxaca, México.
3. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
4. Dumont, A., Raynal, C., Raginel, F., Julien-Ortiz, A., Suárez, C., y Manso, J.M. 2008. Capacidad de las levaduras enológicas de consumir fructosa. La semana vitivinícola. ISSN 0037-184X. 3237. 2502-2507
5. Espinoza-Martínez, V.A., Jiménez Pacheco.A. J., Palma- Cruz.F. J. y López-Sánchez.C. 2020. Diversidad microbiana presente durante la fermentación del proceso de producción artesanal de mezcal en Coixtlahuaca, Oaxaca.
6. Fundora, N., García, R., Álvarez, I., Hernández, L.M., & Torres, E.2005. Identificación y caracterización fermentativa de cepas de levaduras aisladas en la destilería "A. Guiteras". ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, XXXIX (2),46-50. ISSN: 0138-6204. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120661009>
7. Herrera, T. y Ulloa, M.1998. El reino de los hongos: micología básica y aplicada. Fondo de cultura económica. México, UNAM.

8. Kurtzman, C.P. Fell, J.W. y Boekhout, T. 2011. The yeasts, a taxonomic study. Elsevier. Quinta edición. EUA.
9. Oliva Hernández, A. A. 2012. *Evaluación cinética y molecular de levaduras fructofílicas aisladas del mezcal tamaulipeco*. Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas. <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00002172/>
10. Oliva, H.A., Narváez Z.J., Reséndiz, D., Taillandier, P., y Larralde, C.P. 2009. caracterización productiva de levaduras fructofílicas aisladas del mezcal tamaulipeco. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras.
11. Peña, C y Arango, R. 2009. Evaluación de la producción de etanol utilizando cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de melaza de caña de azúcar. DYNA,76(159),153-161. ISSN: 0012-7353.
12. Reyes-Rodríguez, E., López-Escobar, G., González-Martínez, C.Y., Palma-Cruz, F.J. y López-Sánchez, C. 2021. Levaduras extremófilas aisladas del mosto de *Agave angustifolia* Haw y *Agave potatorum* Zucc en el proceso de fermentación de mezcal artesanal en Oaxaca. Revista del Centro de Graduados e Investigación. Instituto Tecnológico de Mérida, 36(89)11-15
13. Reyes-Rodríguez,E., Martínez Ariasb, M.,López-Sánchez,C.,Palma-Cruz, F.J.2021. Aislamiento, selección y caracterización de la cinética fermentativa de *Saccharomyces* (ITOSIV001) obtenida de mostos de fermentación del proceso de producción del mezcal artesanal de Oaxaca. Revista Frontera Biotecnológica. ISSN: 2448-8461
14. Torres García, C. J., y Torres Guzmán, J. C. 2017. Optimización de la producción de levaduras con interés biotecnológico. Jóvenes en la ciencia, 3(2), 586–590.

12 Anexo I

Cinética de tolerancia a etanol y a altas concentraciones de fuente de carbono.

Análisis estadístico

Prueba de homogeneidad de varianzas

H₀: La variabilidad en la velocidad de crecimiento de la cepa ITOYIII002 es igual con todas las combinaciones de % de etanol y la concentración de fructosa.

H_a: La variabilidad en la velocidad de crecimiento de la cepa ITOYIII002 es diferente en al menos una combinación de % de etanol y la concentración de fructosa.

Estadísticos de Prueba

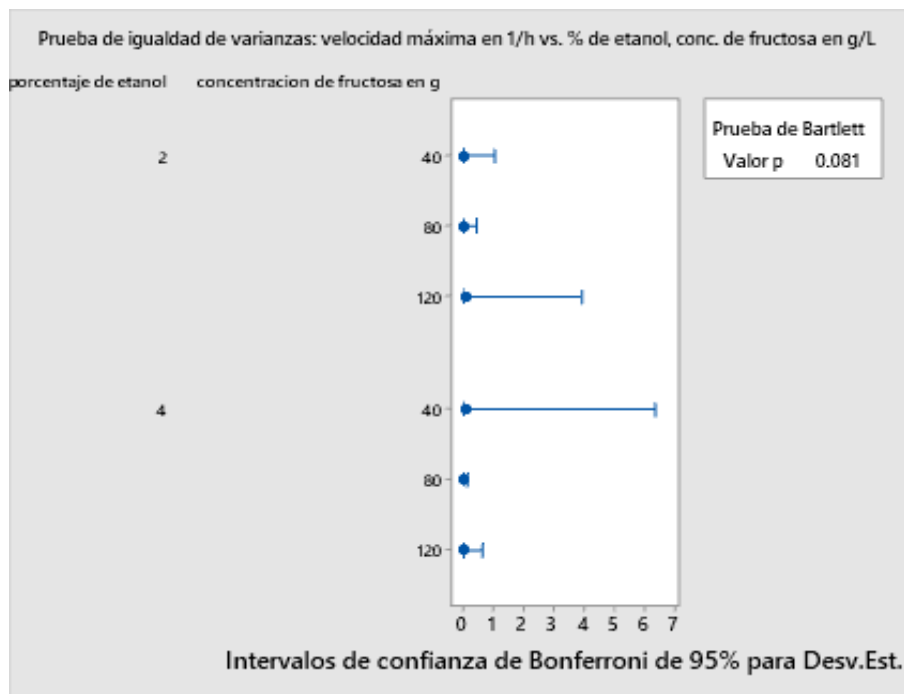
Intervalos de confianza de Bonferroni de 95% para desviaciones estándar

| porcentaje de etanol | concentración de fructosa en g/L | N | Desv.Est. | IC |
|-------------------------|--|---|-----------|----------------------|
| 2 | 40 | 2 | 0.0054381 | (0.0018979, 1.04134) |
| 2 | 80 | 2 | 0.0022606 | (0.0007890, 0.43289) |
| 2 | 120 | 2 | 0.0205151 | (0.0071599, 3.92846) |
| 4 | 40 | 2 | 0.0331288 | (0.0115622, 6.34388) |
| 4 | 80 | 2 | 0.0007130 | (0.0002488, 0.13653) |
| 4 | 120 | 2 | 0.0033140 | (0.0011566, 0.63459) |

Nivel de confianza individual = 99.1667%

Pruebas

| Método | Estadística de prueba | Valor p |
|----------|--------------------------|------------|
| Bartlett | 9.79 | 0.081 |



Regla de decisión

Rechazar H_0 sí $P < 0.05$

Decisión

No rechazar H_0

Interpretación

No existe diferencia significativa en la variabilidad de la velocidad de crecimiento dada en h^{-1} con las diferentes combinaciones de porcentaje de etanol y concentración de fructosa en g/L.

- **Varianzas homogéneas.**

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

Análisis de varianza de velocidad máxima en h⁻¹

| Fuente | GL | SC | MC | F | P |
|---|----|--------|--------|--------|---------|
| Porcentaje de etanol | 1 | 0.0167 | 0.0167 | 63.90 | 0.00020 |
| Concentración de fructosa en g/L | 2 | 0.0490 | 0.0245 | 94.05 | 0.00003 |
| Porcentaje de etanol*concentración de fructosa en g/L | 2 | 0.2075 | 0.1037 | 397.78 | 0.00000 |
| Error | 6 | 0.0016 | 0.0003 | | |
| Total | 11 | 0.2747 | | | |

Resumen del modelo

| S | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) |
|-----------|---------|--------------------|
| 0.0161481 | 99.43% | 98.96% |

PRUEBA DE EFECTOS PRINCIPALES

- Para porcentaje de etanol

H₀: La velocidad de crecimiento de la cepa ITOYIII002 es igual con los dos porcentajes de etanol.

H_a: La velocidad de crecimiento de la cepa ITOYIII002 es diferente con los dos porcentajes de etanol.

| Fuente de variación | Estadístico de prueba F | P observada |
|---------------------|-------------------------|-------------|
| % de etanol | 63.90 | 0.00020** |

**Altamente significativo

Regla de decisión

Rechazar H_0 si $P < 0.05$

Decisión

Rechazar H_0

Interpretación

Existe una diferencia altamente significativa en la velocidad de crecimiento dada en h^{-1} con al menos un porcentaje de etanol.

- Para concentración de fructosa en g/L

H_0 : La velocidad de crecimiento de la cepa ITOYIII002 es igual con las dos concentraciones de fructosa dada en g/L.

H_a : La velocidad de crecimiento de la cepa ITOYIII002 es diferente con las dos concentraciones de fructosa dada en g/L.

| Fuente de variación | Estadístico de prueba F | P observada |
|---------------------------------------|-------------------------|-------------|
| Concentración de fructosa dada en g/L | 94.05 | 0.00003** |

**Altamente significativo

Regla de decisión

Rechazar H_0 si $P < 0.05$

Decisión

Rechazar H_0

Interpretación

Existe una diferencia altamente significativa en la velocidad de crecimiento dada en h^{-1} con al menos una concentración de fructosa dada en g/L.

PRUEBA DE INTERACCIONES

H_0 : La velocidad de crecimiento de la cepa ITOYIII002 es igual con todas las combinaciones de porcentaje de etanol y las concentraciones de fructosa dada en g/L.

H_a : La velocidad de crecimiento de la cepa ITOYIII002 es diferente con al menos una combinación de porcentaje de etanol y las concentraciones de fructosa dada en g/L.

| Fuente de variación | Estadístico de prueba F | P observada |
|--|-------------------------|-------------|
| Interacción porcentaje de etanol y Concentración de fructosa dada en g/L | 397.78 | 0.00000** |

**Altamente significativo

Regla de decisión

Rechazar H_0 si $P < 0.05$

Decisión

Rechazar H_0

Interpretación

Existe una diferencia altamente significativa en la velocidad de crecimiento dada en h^{-1} con al menos una combinación del porcentaje de etanol y la concentración de fructosa dado en g/L.

Análisis de medias

Medias

| porcentaje de etanol | N | velocidad máxima en h^{-1} |
|----------------------|---|------------------------------|
| 2 | 6 | 0.840314 |
| 4 | 6 | 0.914838 |

| Concentración de fructosa en g/L | N | velocidad máxima en $h \exp^{-1}$ |
|----------------------------------|---|-----------------------------------|
| 40 | 4 | 0.965519 |
| 80 | 4 | 0.815425 |
| 120 | 4 | 0.851783 |

| Porcentaje de etanol*concentración de fructosa en g/L | N | velocidad máxima en h^{-1} |
|---|---|------------------------------|
| 2 40 | 2 | 0.89529 |
| 2 80 | 2 | 0.63617 |
| 2 120 | 2 | 0.98949 |
| 4 40 | 2 | 1.03575 |
| 4 80 | 2 | 0.99469 |
| 4 120 | 2 | 0.71408 |

COMPARACIONES MÚLTIPLES

Diferencia Mínima Significativa

Para la interacción

Datos

Medias ordenadas

$GL_{ERROR}=6$

$\alpha/2=0.025$

$t(0.025)(6) = 2.4469$

$CME = 0.00026$

$DMS = 0.0394$

4%-40 g/L 1.03575

4%-80 g/L 0.99469

2%-120g/L 0.98949

2%- 40g/L 0.89529

4%-120g/L 0.71408

2% -80g/L 0.63617

Regla de decisión

Rechazar H_0 si $Y_i - Y_j > DMS$

| INTERACCION | | $Y_i - Y_j$ | DECISIÓN |
|-------------|-----------|-------------|-------------|
| 4%-40 g/L | 4%-80 g/L | 0.04106 | RECHAZAR |
| | 2%-120g/L | 0.04626 | RECHAZAR |
| | 2%- 40g/L | 0.14046 | RECHAZAR |
| | 4%-120g/L | 0.32167 | RECHAZAR |
| | 2% -80g/L | 0.39958 | RECHAZAR |
| 4%-80 g/L | 2%-120g/L | 0.0052 | NO RECHAZAR |
| | 2%- 40g/L | 0.0994 | RECHAZAR |
| | 4%-120g/L | 0.28061 | RECHAZAR |
| | 2% -80g/L | 0.35852 | RECHAZAR |
| 2%-120g/L | 2%- 40g/L | 0.0942 | RECHAZAR |
| | 4%-120g/L | 0.27541 | RECHAZAR |
| | 2% -80g/L | 0.35332 | RECHAZAR |
| 2%- 40g/L | 4%-120g/L | 0.18121 | RECHAZAR |
| | 2% -80g/L | 0.25912 | RECHAZAR |
| 4%-120g/L | 2% -80g/L | 0.07791 | RECHAZAR |

Agrupaciones

| | |
|---|-----------|
| A | 4%-40 g/L |
| B | 4%-80 g/L |
| B | 2%-120g/L |
| C | 2%- 40g/L |
| D | 4%-120g/L |
| E | 2% -80g/L |

Interpretación

El grupo A correspondiente a la combinación 4% de etanol con 40 g/L de fructosa obtiene la mayor velocidad de crecimiento.

El grupo B no tiene una diferencia significativa en la velocidad de crecimiento utilizando las combinaciones de 4%de etanol con 80g/L de fructosa y 2% con 120 g/L de fructosa.

Los grupos que no comparten una letra tienen una diferencia significativa.

Graficas de interacciones

