

**TRABAJO PROFESIONAL**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**INGENIERO BIOQUÍMICO**

**QUE PRESENTA:**

**CARLOS ALBERTO TRUJILLO JIMÉNEZ**

**CON EL TEMA:**

**“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PRODUCTIVA DE  
ETANOL UTILIZANDO LEVADURAS AISLADAS DE  
AGAVE Y TABERNA”**

**MEDIANTE**

**OPCIÓN I**

**TESIS PROFESIONAL**

**TUXTLA GUTIÉRREZ CHIAPAS**

**NOVIEMBRE 2013**



## DEDICATORIAS

*Dedico este trabajo principalmente al creador de todas las cosas, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional, no solo por eso, sino también por darme la fortaleza suficiente cuando a punto de caer he estado; por ello, con toda la humildad que de mi corazón puede emanar, dedico primeramente mi trabajo a Dios.*

*De igual forma, dedico esta tesis a mi madre, por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional.*

*A todos mis amigos y amigas en general, porque me han brindado su apoyo incondicional y por compartir conmigo buenos y malos momentos.*

*A toda mi familia, por haber creído en mí por todos estos años.*

## AGRADECIMIENTOS

*El presente trabajo de tesis primeramente me gustaría agradecerle a Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, por haber hecho realidad este sueño tan anhelado.*

*A mi madre que con su amor y su apoyo me ha formado e inculcado los valores de disciplina y respeto y que con constante sacrificio me forjo por el camino para seguir adelante.*

*A mi directora de tesis, M. C. Lucia María Cristina Ventura Canseco por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, paciencia, y su motivación ha logrado en mí que pueda terminar mis estudios con éxito.*

*A mis revisoras, Dra. Rocío Meza Gordillo y Q.B.P. Aura Flores Pérez por el tiempo, dedicación y apoyo que tuvieron conmigo para realizar este trabajo.*

*Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar donde estén quiero darle las gracias por formar parte de mi, por lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.*

## ÍNDICE

Lista de cuadros	i
Lista de figuras	iii
Resumen	iv
1.- Introducción	1
2.- Marco teórico	3
2.1.- Levaduras	3
2.1.1.- Clasificación taxonómica	4
2.1.2.- Importancia industrial de las levaduras	4
2.1.3.- Levaduras productoras de etanol	5
2.1.4.- Características morfológicas	8
2.1.5.- Características bioquímicas y fisiológicas	9
2.1.6.- Reproducción	11
2.1.6.1.- Asexual	11
2.1.6.2.- Sexual	12
2.1.7.- Composición química	13
2.1.8.- Requerimientos nutricionales	14
2.2.- Factores de estrés que afectan al crecimiento de una levadura	16
2.3.- Capacidad para degradar diferentes azúcares	20
2.4.- Fermentación alcohólica	23
2.5.- Producción de etanol y su importancia	26

2.5.1.- Sustratos empleados para la fermentación alcohólica	27
2.5.1.1.- Melaza de caña	28
2.6.- Factores que afectan la producción de etanol	30
3.- Justificación	36
4.- Objetivos	38
5.- Metodología	39
5.1.- Microorganismos	39
5.1.1.- Reactivación de las levaduras	39
5.1.2.- Resiembra en tubos	40
5.2.- Caracterización de levaduras	40
5.2.1.- Caracterización morfológica	40
5.2.2.- Capacidad para degradar diferentes carbohidratos	40
5.2.3.- Osmotolerancia	41
5.2.4.- Determinación de biomasa por cuenta al microscopio	41
5.2.5.- Determinación de biomasa por densidad óptica	41
5.2.6.- Tolerancia a etanol	42
5.3.- Crecimiento microbiano y producción de etanol en medio sintético	42
5.3.1.- Preparación del inóculo y medio de cultivo	42
5.3.2.- Determinación de biomasa por cuenta al microscopio	42
5.3.3.- Determinación de azúcares reductores por la técnica de DNS	43
5.3.4.- Cuantificación de etanol por la técnica de oxidación con dicromato de potasio	43

5.4.- Crecimiento microbiano y producción de etanol en melaza de caña	44
5.4.1.- Determinación de azúcares fermentables en melaza de caña por HPLC	44
5.4.2.- Preparación del inóculo y medio de cultivo	45
5.4.3.- Determinación de biomasa por cuenta al microscopio	45
5.4.4.- Cuantificación de etanol por la técnica de oxidación con dicromato de potasio	46
6.- Resultados y discusiones	47
6.1.- Caracterización morfológica de las levaduras	47
6.2.- Capacidad de las levaduras para degradar diferentes carbohidratos	49
6.3.- Prueba de osmotolerancia	52
6.4.- Prueba de tolerancia a etanol	57
6.5.- Cinética de crecimiento y producción de etanol en medio sintético	61
6.6.- Cinética de crecimiento y producción de etanol en melaza de caña	68
7.- Conclusiones	73
8.- Bibliografía	74
9. Anexos	79

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vista macroscópica de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPG

Figura 2. Estructura de una levadura

Figura 3. Esquema del proceso de gemación de las levaduras

Figura 4. Esquema del ciclo de vida de una levadura ascosporada

Figura 5. Presión osmótica

Figura 6. Ruta metabólica de carbohidratos

Figura 7. Fermentación alcohólica

Figura 8. Oxidación de alcoholes primarios por dicromato de potasio

Figura 9. Crecimiento de levaduras en presencia de 200 g/L de glucosa a) Densidad óptica b) Cuenta al microscopio

Figura 10. Crecimiento de levaduras en presencia de 250 g/L de glucosa a) Densidad óptica b) Cuenta al microscopio

Figura 11. Crecimiento de levaduras en presencia de 300 g/L de glucosa a) Densidad óptica b) Cuenta al microscopio

Figura 12. Crecimiento de levaduras en presencia de 350 g/L de glucosa a) Densidad óptica b) Cuenta al microscopio

Figura 13. Crecimiento de levaduras en ausencia de etanol a) Densidad óptica b) Cuenta al microscopio

Figura 14. Crecimiento de levaduras en presencia de 5% de etanol a) Densidad óptica b) Cuenta al microscopio

Figura 15. Crecimiento de levaduras en presencia de 6.5% de etanol a) Densidad óptica b) Cuenta al microscopio

Figura 16. Crecimiento de levaduras en presencia de 8% de etanol a) Densidad óptica b) Cuenta al microscopio

Figura 17. Crecimiento de levaduras en presencia de 10% de etanol. a) Densidad óptica. b) Cuenta al microscopio.

Figura 18. Concentración de azúcar consumido en medio sintético a las 48h de fermentación

Figura 19. Producción de etanol en medio sintético a las 48h de fermentación

Figura 20. Producción de biomasa en medio sintético a las 48 h de fermentación

Figura 21. Concentración de azúcar consumido en melaza de caña y en medio sintético a las 48h de fermentación

Figura 22. Producción de etanol en melaza de caña y en medio sintético a las 48h de fermentación

Figura 23. Producción de biomasa en melaza de caña y en medio sintético a las 48h de fermentación



## LISTA CUADROS

Cuadro 1. Aplicación industrial de levaduras

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae*

Cuadro 3. Composición química de las levaduras

Cuadro 4. Principales microorganismos productores de etanol con aplicación o potencialidad industrial

Cuadro 5. Composición de la melaza de caña de azúcar

Cuadro 6. Aprovechamiento de la melaza de caña

Cuadro 7. Morfología macroscópica de las levaduras aisladas de taberna

Cuadro 8. Morfología macroscópica de las levaduras aisladas de aguamiel

Cuadro 9. Resultados de la degradación de carbohidratos

Cuadro 10. Producción de etanol y biomasa en medio sintético a las 48h de fermentación

Cuadro 11. Producción de etanol y biomasa en melaza de caña a las 48h de fermentación

## RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la producción de etanol a nivel laboratorio, utilizando ocho levaduras aisladas de aguamiel de *Agave americana L.* y de taberna (bebida fermentada autóctona de Chiapas) como microorganismos fermentadores; a partir de la fermentación de un medio de cultivo sintético y uno natural (melaza de caña). Estos microorganismos fueron caracterizados previamente por diferentes pruebas, como crecimiento a elevadas concentraciones de azúcar (osmotolerancia), crecimiento a diferentes concentraciones de etanol y capacidad para degradar distintos carbohidratos.

Para la fermentación en medio sintético, se realizaron ensayos por duplicado durante 48h en matraces Erlenmeyer de 1L con 500mL de medio de cultivo y 10%v/v de inóculo. Se determinó el consumo de sustrato inicial y final por medio de la técnica del ácido dinitrofenil sufónico (DNS), el crecimiento celular por cuenta al microscopio y concentración de etanol producido por la técnica de dicromato de potasio.

En medio de cultivo natural (melaza de caña) se realizaron ensayos por triplicado durante 48h, utilizando matraces Erlenmeyer de 1L con 500mL de melaza de caña diluida 1:4, suplementada con 1 g/L de  $\text{NH}_4\text{SO}_2$ , 1 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0.5 g/L de  $\text{MgSO}_4$ . Se determinó la concentración de azúcares fermentables (glucosa, fructosa y sacarosa) presentes por °Brix, haciendo una correlación de azúcares fermentables por medio de HPLC, crecimiento celular por cuenta al microscopio y concentración de etanol por dicromato de potasio.

Los resultados obtenidos en las pruebas de caracterización, demostraron que las levaduras aisladas de la taberna presentan una mayor capacidad de crecimiento a elevadas concentraciones de azúcar, destacando la cepa denominada LEV 51.

En cuanto a su capacidad de crecimiento en presencia de etanol, destacaron las levaduras aisladas de la taberna, en mayor medida la cepa denominada LEV 64.

En relación a la capacidad de degradar azúcares, glucosa, fructosa y sacarosa resultaron ser los azúcares más asimilables por las levaduras.

Respecto a la producción de etanol en medio sintético las mayores producciones de etanol se obtuvieron con  $48.76 \pm 2.13$  g/L empleando la cepa LEV 35 (aislada de taberna) y  $32.44 \pm 1.34$  g/L empleando la cepa CAS AaL-04 (aislada de aguamiel), mientras que en medio natural a base de melaza de caña, la mayor producción de etanol se obtuvo empleando la cepa denominada CAS-AaL-04 (aislada de aguamiel) con  $58.8 \pm 2.01$  g/L y  $56.8 \pm 2.47$  g/L empleando la cepa TL-ITTG-06 (aislada de taberna). Los resultados demostraron que la producción de etanol aumentó significativamente en siete de las levaduras estudiadas en el medio de cultivo natural (melaza de caña) con respecto al medio sintético.

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde el 2008 en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, se inició el estudio de la fermentación, aislamiento e identificación de diferentes microorganismos que participan en la fermentación alcohólica de la taberna (bebida fermentada autóctona de Chiapas) (Rodríguez, 2008), así como también en el 2012 se inició el estudio de los microorganismos que participan en la fermentación para la producción del agave comiteco. Hasta hoy en día se han identificado cuatro diferentes cepas de *S. cerevisiae*, denominadas LEV 35, LEV 51, LEV 64 y TL-ITTG-06 aisladas de taberna y del aguamiel de *A. americana* L. se han aislado 4 levaduras denominadas A1, CAS AaL-02, CAS AaL 04 y A3, ésta última identificada como *Kluyveromyces marxianus* (Lara *et al.*, 2012). Actualmente el trabajo de identificación molecular sigue en desarrollo.

La taberna es una bebida fermentada naturalmente de consistencia espesa y blanca que se extrae de la palma de coyol (*Acrocomia aculeata*) y produce efectos embriagantes, estos efectos son producidos por la fermentación que se da en ella por la presencia de distintos tipos de microorganismos tales como levaduras, bacterias ácido lácticas y acéticas (Alcántara *et al.*, 2010). En Chiapas, los principales centros taberneros se localizan específicamente en la región de la Frailesca, Centro y el Soconusco. Por otra parte una de las plantas que crece en la meseta comiteca es el *Agave americana* L., planta comúnmente conocida en muchos lugares de nuestro país como maguey, pajpa o cabuya (Moreno y Rodríguez, 2012).

Hasta hoy en día aún no ha sido estudiada la capacidad fermentativa que poseen estas levaduras autóctonas para la producción de etanol y biomasa. Cabe mencionar que el aspecto más importante en la fermentación alcohólica es el rendimiento, el cual depende de la capacidad fermentativa de las levaduras y su resistencia a las diferentes condiciones de estrés en el medio (Stewart *et al.*, 1998), razón por la cual se realizaron pruebas de osmotolerancia y tolerancia al etanol para cada microorganismo; así como también la capacidad para degradar diferentes carbohidratos.

Las levaduras son los microorganismos más utilizados para la producción de etanol por la vía fermentativa, debido a su alta productividad en la conversión de azúcares a etanol y a que se separan mejor después de la fermentación. Dentro de las especies más utilizadas está *Saccharomyces cerevisiae* (Castaño y Londoño, 2009).

El alcohol se obtiene a partir de la fermentación de una gran variedad de materias primas agrícolas, dentro de los cuales se encuentran aquellas con alto contenido de almidón, material celulósico y azúcares. En algunos países se utilizan melazas de remolacha azucarera.

En este trabajo se pretende evaluar la capacidad fermentativa alcohólica de estas levaduras utilizando como sustrato un medio sintético y un medio natural (melaza de caña), así como determinar los rendimientos de cada microorganismo.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 LEVADURAS**

Las levaduras son hongos unicelulares que presentan un “puente biológico” entre bacterias y organismos superiores, manteniendo las ventajas de los microorganismos en cuanto a su fácil manipulación y crecimiento rápido. Cuando se desarrollan en medios de cultivo adecuados, las colonias de levaduras varían en aspecto, textura y margen, como las bacterias. Así, algunas son lisas, otras rugosas; algunas son aplanadas, otras elevadas; tienen bordes bien definidos o irregulares. Las colonias jóvenes tienen consistencia comparable a la de una pasta, la cual con el tiempo, se vuelve más espesa y seca. Pueden producir pigmentos. El tipo de desarrollo en caldo de cultivo también proporciona información significativa. Algunas colonias se desarrollan en el fondo del líquido en forma de sedimento, otras crecen uniformemente en todo el caldo y otras crecen sólo en la superficie como una película o nata (Pelczar y Reid, 1993).

Las levaduras son capaces de crecer en un amplio margen de temperatura desde 0 a 47 °C; algunas no se desarrollan a más de 15 °C, aunque otras pueden hacerlo a mucho menores temperaturas. La óptima para la mayor parte de ellas está entre 20 y 30 °C (Pelczar y Reid, 1993). La incubación a 30 °C suele ser satisfactoria.

Las levaduras se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, localizadas en el suelo, la superficie de las frutas, el néctar de las flores y en ambientes acuáticos. La mayoría son saprófitas y proliferan en materia orgánica muerta; otras son parásitas, facultativas u obligadas, por lo que se desarrollan en otros seres. Algunas levaduras que son parásitas pueden causar enfermedades en el hombre, animales y plantas. Entre las saprófitas, las fermentativas llevan a cabo la fermentación alcohólica de azúcares, característica que ha sido aprovechada por el hombre, desde tiempos remotos.

### **2.1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA**

Las levaduras pertenecen al Reino Fungí y dentro de él a la división Eumicota que agrupa a los hongos verdaderos. En esta división, las levaduras se incluyen en 2 de las 5 subdivisiones de los Eumicetos. La Ascomycotina representada por las levaduras capaces de producir ascosporas, llamadas por ello esporógenas, y la Deuteromycotina representadas por las levaduras incapaces de formar esporas llamadas no esporógenas. Los géneros de las levaduras esporógenas englobados todos ellos en la familia *Saccharomycetaceae*, se distribuyen en 3 subfamilias. Los géneros de las levaduras no esporógenas constituyen la familia *Cryptococcaceae*. Además las levaduras pueden ser clasificadas por debajo de los taxones género y especie, en subespecies y variedades, que a menudo adquieren rango de especie tras nuevas revisiones taxonómicas, o varias especies son unificadas en una sola como subespecies de la misma, con lo que la clasificación se complica aún más y se incrementa el número de sinonimias (Villarreal, 2006).

Las *Saccharomyces* spp., se encuentran dentro de la familia *Saccharomycetaceae* y se distinguen de los restantes por sus características morfológicas y fisiológicas (comportamiento o desarrollo) las levaduras verdaderas se reproducen vegetativamente por gemación (Villarreal, 2006).

### **2.1.2. IMPORTANCIA INDUSTRIAL DE LAS LEVADURAS**

Las levaduras se han utilizado desde la prehistoria en la elaboración del pan y del vino, pero los fundamentos científicos de su cultivo y uso en grandes cantidades fueron descubiertos por el microbiólogo francés Louis Pasteur en el siglo XIX. Hoy se utilizan en distintos tipos de fermentación. Los diferentes usos de las levaduras son: como fuente de vitaminas del complejo B y de tiamina, en algunas fases de la producción de antibióticos y hormonas esteroideas, y como alimento para animales y seres humanos (cuadro 1).

Las cepas de levaduras se cultivan en un medio con azúcares, compuestos nitrogenados, sales minerales y agua. El producto final puede aparecer en forma de células secas de levadura o prensado en pastillas con algún material excipiente. Cuando se termina de utilizar un lote de levaduras destinadas a la fabricación del pan, a usos médicos, o para fabricación de alimentos, el medio de cultivo en el que han crecido se desecha. Sin embargo en la elaboración de vinos, cervezas, licores y alcoholes industriales, el medio de cultivo es el producto final, y en este caso son las propias levaduras las que se desechan, o bien se utilizan como alimento para animales (Marcet, 2010).

**Cuadro 1.** Aplicación industrial de levaduras

Levadura	Uso industrial
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Panificación, elaboración de bebidas fermentadas (vino, cerveza, licores, sake, etc.). Producción de etanol. Elaboración de complementos nutricionales, saborizantes, vitaminas, extractos, etc.
<i>Candida utilis</i>	Proteína unicelular, producción de alcohol.
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	Proteína unicelular, glucoamilasa, bioquímicos, alcohol
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Proteína unicelular, lipasa, bioquímicos
<i>Candida milleri</i>	Pan ácido (sourdough)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Proteína unicelular, alcohol
<i>Phaffia rhodozyma</i> <i>Brettanomyces sp.</i>	Proteína unicelular para acuicultura Fermentación cervezas "lámbicas"

(Damas, 2010)

### 2.1.3 LEVADURAS PRODUCTORAS DE ETANOL

#### ***Saccharomyces cerevisiae***

*Saccharomyces cerevisiae* es un hongo ambiental levaduriforme, unicelular, sus células son ovoides y se reproduce por gemación, miden entre 5 y 10 micras, taxonómicamente pertenece al *Phylum Ascomycota*, a la clase *Hemiascomycetes*, del orden *Saccharomycetales* y de la familia de las *Saccharomycetaceae* (cuadro



2). Su metabolismo le permite crecer tanto en condiciones de aerobiosis como de anaerobiosis (Salmerón, 2011). Es la especie de levadura utilizada por excelencia para la obtención de etanol a nivel industrial (Carballo, 2000).

**Cuadro 2.** Clasificación taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae*

Reino	Hongo
División	Amastogomycota
Clase	Ascomicetes
Subclase	Hemiascomycetidae
Orden	Endomicetales
Familia	Sacchaomycetaceae
Subfamilia	Saccharomycetidae
Género	Saccharomyces
Especie	Cerevisiae

(Carballo, 2000)

*Saccharomyces cerevisiae* es una levadura cuya colonia es de color crema-blanco, apariencia húmeda y brillante de bordes irregulares (figura 1) (Fajardo y Sarmiento, 2007). Posee alta actividad metabólica, por lo que en la fase aerobia se caracteriza por la producción de biomasa y en la fase anaerobia se caracteriza generalmente por la producción de etanol, fermentando alrededor del 90% del medio. Es importante la fase aeróbica, ya que la levadura presenta una fase de adaptación para producir las enzimas necesarias (tipo invertasa) que le permitan metabolizar el sustrato y así alcanzar la biomasa adecuada para la fermentación en donde la mayor parte del carbono se emplea como energía y sólo el 2% se asimila como material celular (Salmerón, 2011).



**Figura 1.** Vista macroscópica de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPG

*Saccharomyces cerevisiae* es quizás la levadura más importante para la humanidad, ya sea por su utilización en la producción de pan y bebidas alcohólicas por fermentación o por ser uno de los microorganismos eucarióticos modelos más intensamente estudiados a nivel de su biología celular y molecular.

El crecimiento de *S. cerevisiae* se ve favorecido por un pH próximo a 4.0-5.0 y no se desarrollan bien en medio alcalino a menos que se hayan adaptado al mismo. A pesar de la tolerancia bastante amplia de esta levadura para las variaciones de pH a partir de los sustratos habitualmente usados en los medios de cultivo, forman productos en especial ácidos que influyen en el crecimiento celular, producción enzimática y utilización de glucosa. El crecimiento es favorable a una temperatura de 28-30 °C (Fajardo y Sarmiento, 2007).

### ***Kluyveromyces marxianus***

*Kluyveromyces marxianus* fue descrita por primera vez en 1888 por E.C. Hansen, que en ese tiempo se denominó *Saccharomyces marxianus*. El género *Kluyveromyces* pertenece a la división *Ascomycotina*. Las levaduras de este género se reproducen por gemación multilateral, liberándose las esporas al llegar a su madurez (sus esporas son esféricas) (Fonseca, *et al.*, 2008).

En la actualidad, *Kluyveromyces* incluye las especies *K.fragilis*, *K. lactis* y *K. bulgaricus*. *K. marxianus* es una de las levaduras que más abunda en los productos lácteos. Las especies pertenecientes al género *Kluyveromyces* producen  $\beta$ -galactosidasa y son potentes fermentadoras de la lactosa (Petrenko, 2005).

Las condiciones generalmente utilizadas para la propagación de *Kluyveromyces marxianus* en suero son temperaturas entre 30 y 38°C; pH de entre 4.5 y 5.7, aunque ocasionalmente se utiliza pH más bajo. El nitrógeno es un nutriente limitante para la propagación de esta levadura, ya que solamente el 25% de la concentración de este elemento en el suero es utilizado por *Kluyveromyces marxianus*, por lo tanto es necesaria la suplementación con sales inorgánicas de nitrógeno (Petrenko, 2005).

#### 2.1.4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

En general, las células de las levaduras son más grandes que las de la mayor parte de las bacterias, pero las más pequeñas no son tan grandes como las bacterias mayores. Las levaduras varían considerablemente de tamaño, pudiendo tener entre 1 y 5  $\mu\text{m}$  de ancho por 5 a 30  $\mu\text{m}$  o más de largo. Generalmente son ovoides, si bien algunas son esféricas y otras alargadas (Pelczar y Reid, 1993).

Una levadura típica tiene forma ovoide pero también las hay alargadas, esféricas, de forma de pera o de limón o incluso triangulares. Cada especie tiene su forma característica, pero en un cultivo puro se puede observar que existe cierta variación en el tamaño y la forma de las células, variación que puede depender de la edad de cultivo y del medio donde se encuentren.

La estructura de una levadura es la de una típica célula eucariótica. Al microscopio pueden observarse la pared celular, el citoplasma con vacuolas, glóbulos de grasa y gránulos metacromáticos (Figura 2). Las levaduras no poseen flagelos ni otro órgano de locomoción. Algunas pueden presentar un material viscoso, compuesto de polisacáridos, que rodea la célula y que es semejante a la cápsula bacteriana (Pelczar y Reid, 1993).

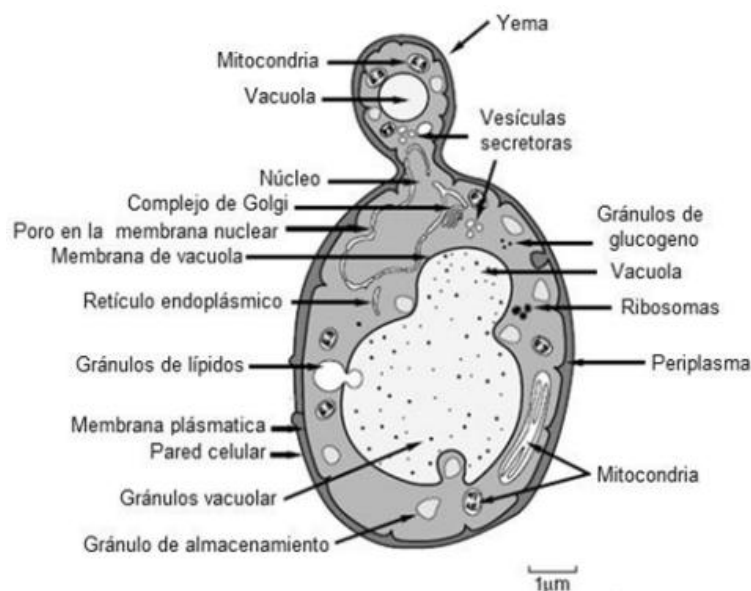


Figura 2. Estructura de una levadura

### **2.1.5 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y FISIOLÓGICAS**

Las características morfológicas y sexuales permiten generalmente identificar el género, las características bioquímicas permiten definir la especie de la levadura.

El citosol o citoplasma está delimitado por una cubierta celular que consta de membrana celular, espacio periplástico y pared, la pared celular puede tener un espesor de 150-300  $\mu\text{m}$ , según la cepa y condiciones de desarrollo y es metabólicamente activa, contiene enzimas capaces de permitir la transferencia macromolecular al interior de la célula, la membrana y el espacio periplástico, ambos tienen 10nm de grosor. Hasta el 85% del peso seco de la pared celular se atribuyen a dos polisacáridos estructurales que están presentes en cantidades aproximadamente iguales y son:

$\beta$ -glucanos, polímeros de glucosa que se encuentran en las capas internas de la pared y son responsables de la forma celular y rigidez de la pared.

Manoproteínas (o mananos), polímeros de manosa unidos covalentemente a cadenas peptídicas que forman la parte externa de la pared, responsables de la porosidad y de la recepción ambiental.

La superficie de la pared celular de la levadura posee una carga neta negativa y tienen hidrofobicidad; la carga negativa se atribuye a las cadenas de fosfato localizadas en la pared externa de manoproteínas y puede demostrarse por tinción azul. La fuerza de la carga, varía con las condiciones de su medio ambiente (como la falta de nutrientes) y durante la fermentación, se produce una reducción de la carga al comenzar la floculación.

La hidrofobicidad es debida a los lípidos de la pared externa y a los grupos fosforilados del complejo de manoproteínas.

El orgánulo más destacado de la célula de la levadura es la vacuola. Está delimitada por una única membrana simple. El plasma vacuolar es rico en gránulos de volutina (polimetafosfato) durante los periodos de inactividad metabólica. Estos gránulos densos desaparecen al reanudar el desarrollo activo.

La vacuola también actúa como almacén de enzimas líticas implantadas en el reciclado de macromoléculas celulares.

El segundo gran orgánulo es el núcleo, que está típicamente envuelto por una unidad de membrana doble con poros. El núcleo tiene de 1.5 a 2.0  $\mu\text{m}$  de diámetro, mientras que los poros son del orden de 0.1  $\mu\text{m}$  de diámetro. El nucléolo es rico en RNA y proteínas y la microscopia electrónica de alta resolución indica que existen dos regiones distintas, una de partículas y otra fibrilar. El nucléolo es el lugar de síntesis y organización de los ribosomas citoplásmicos (80S), (Villarreal, 2006).

El citoplasma también contiene los cuerpos de Golgi (dictosomas) que están también delimitados por una unidad de doble membrana. Están implicados en el crecimiento de la pared celular y en determinadas fases del ciclo celular (Villarreal, 2006).

Las levaduras necesitan los mismos elementos químicos que otras formas de vida: fuente de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, magnesio, hierro, zinc, manganeso, cobre y molibdeno. El carbono suele obtenerse de azúcares, ácidos orgánicos, aldehídos y glicerina, el cual es oxidado con la producción de energía para síntesis y otros fenómenos vitales. El nitrógeno se obtiene de productos de la hidrólisis de proteínas: proteasas, peptonas, aminoácidos y amoníaco o urea o amidas. En los medios de cultivo como fuente de nitrógeno encontramos los sulfatos, fosfatos o cloruro de amonio.

En términos generales, las levaduras necesitan un poco más de agua que los mohos, pero menos que las bacterias. El catabolismo de azúcares como la glucosa, es anaerobio (fermentación) o aerobio (respiración). El proceso más típico es el catabolismo anaeróbico, también conocido como fermentación alcohólica. Los productos finales son alcohol etílico y dióxido de carbono.

En condiciones aerobias, el catabolismo supone la utilización del oxígeno atmosférico para varios caminos posibles. En la respiración, la oxidación completa de la glucosa produce dióxido de carbono y agua mientras que la oxidación

incompleta da lugar a la acumulación de ácidos y otros productos intermediarios (Pelczar y Reid, 1993).

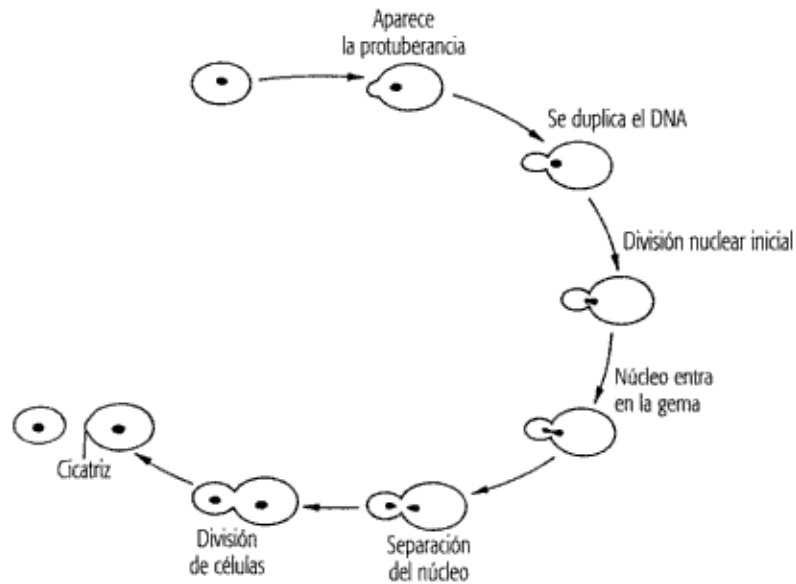
## **2.1.6 REPRODUCCIÓN**

### **2.1.6.1 ASEXUAL**

La mayoría de las levaduras se reproducen asexualmente por gemación y unas pocas por fisión binaria.

En el proceso de gemación se forma una pequeña protuberancia en la periferia de la célula, la cual se debe a un debilitamiento local de la pared celular. Esta pequeña protuberancia se agranda, al irse llenando de material citoplasmático proveniente de la célula madre, hasta alcanzar casi el tamaño de esta. El material nuclear se replica por mitosis y una parte pasa a la célula hija. Luego se forma la pared que divide las dos células y la célula hija se desprende de la madre (Figura 3).

La producción de las gemas puede ocurrir en uno o en ambos extremos de la célula, lo que se conoce como gemación polar, o puede producirse en lugares diferentes de la superficie celular, en cuyo caso se trata de la gemación multilateral o multipolar. En el lugar donde se formó una gema queda una cicatriz en la pared de la célula madre. En las levaduras polares, la producción de gemas se da siempre en el mismo lugar lo que contrasta con las levaduras multipolares en las cuales la gemación, generalmente, no ocurre de nuevo en el mismo lugar. Por esta razón, se puede considerar que en las levaduras polares, la gemación es infinita mientras que en las multipolares tiene un límite (Moreno y Rodríguez, 2012).



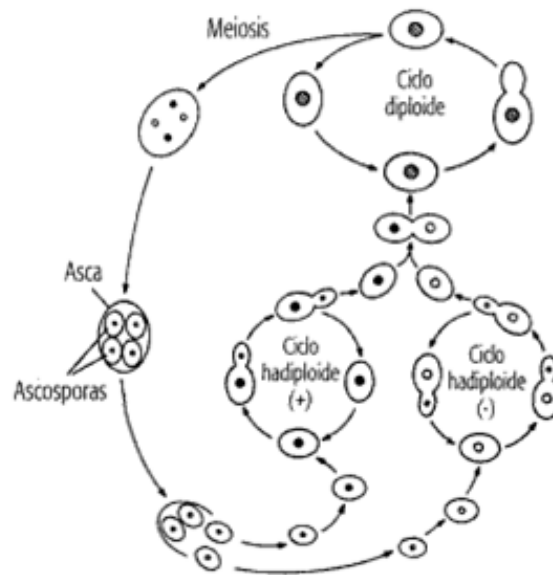
**Figura 3.** Esquema del proceso de gemación de las levaduras

### 2.1.6.2 SEXUAL

La reproducción sexual de las levaduras se da por medio de la formación de esporas sexuales que pueden ser ascosporas o basidiosporas, dependiendo del tipo de célula especializada donde se formen (un asca o una basidia). Ambos tipos de esporas requieren que ocurra la unión de núcleos compatibles y una división meiótica.

La reproducción sexual ocurre mediante la fusión de dos células vegetativas compatibles. Las células que se van a aparear se ponen en contacto, se disuelven sus paredes en el punto correspondiente y se produce la plasmogamia o fusión de plasmas. Posteriormente ocurre la cariogamia o unión de núcleos, lo cual origina una célula diploide (cigótica) que puede seguir reproduciéndose asexualmente por gemación (ciclo diploide), o puede entrar en un proceso meiótico, lo que da como resultado la formación de cuatro núcleos. Los núcleos se rodean de citoplasma y de pared propia; esto origina las ascosporas, que quedan contenidas en la vieja pared de la célula a la que se le llama, entonces, asca (figura 4).

Una vez liberadas las ascosporas, germinan y se reproducen asexualmente produciendo el ciclo haploide. De acuerdo con las condiciones que se den en el medio, podría suceder que la mayor parte de la población pase por alguno de los dos ciclos, pero en la mayoría de los casos los dos ciclos se dan simultáneamente (Moreno y Rodríguez, 2012)



**Figura 4.** Esquema de ciclo de vida de una levadura ascosporada

### 2.1.7 COMPOSICIÓN QUÍMICA

Las levaduras contienen un 75% de agua y un 25% de materia seca aproximadamente (Salcedo, 2008). La composición seca de la levadura se representa en la cuadro 3.



**Cuadro 3.** Composición química de las levaduras

COMPONENTES	PORCENTAJE (%)
Carbohidratos	18-44
Proteínas	36-60
Ácido nucleico	4-8
Lípido	4-7
Inorgánicos totales	6-10
Fósforo	1-3
Potasio	1-3
Sulfato	0.4
Vitaminas	Cantidades traza

(Salcedo, 2008)

Las sustancias minerales de las levaduras representan por lo general un 5-9 % del peso seco. Los componentes principales son ácido fosfórico, alrededor del 50% y potasio del 30% (Haenh, 1991).

Las sustancias nitrogenadas de la levadura representan unas dos terceras partes de su peso seco (30-75%), contienen entre 5 y 12% de nitrógeno. Estas sustancias se reparten en un 64% de proteína, 10% de peptonas y aminoácidos, 8% de amonio, 10% de purina y el resto consiste en pirimidinas y vitaminas. El contenido normal de aminoácidos depende de la alimentación, de la calidad del oxígeno, de la temperatura del cultivo, etc. (Tuite y Oliver, 1991).

### 2.1.8 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

Las necesidades nutricionales de las levaduras, buscan medios de cultivo que aporten los elementos necesarios para la síntesis de los tejidos celulares y para cubrir las necesidades energéticas de las levaduras (Castaño y Londoño, 2009):

**Carbono:** El carbono es el compuesto mayoritario de la célula de la levadura, alrededor del 50% en peso seco. Los compuestos carbonados son utilizados por las levaduras a la vez como fuente de energía y como fuente de carbono. Entre las fuentes de carbono, los glúcidos son los más frecuentemente utilizados como hexosas, disacáridos, trisacáridos.

**Nitrógeno:** El nitrógeno es cuantitativamente el segundo constituyente aportado por el medio de cultivo. Es utilizado por las células en los aminoácidos, los nucleótidos y algunas vitaminas.

Todas las levaduras, asimilan el nitrógeno en forma de ion amonio, los cuales pueden ser aportados en el medio por el cloruro amónico, nitrato amónico, fosfato amónico, y sobre todo el sulfato amónico siendo este el mejor, y al mismo tiempo aportando el azufre necesario para la síntesis de ciertos aminoácidos.

**Fósforo:** El fósforo se halla incluido en los ácidos nucleicos y los nucleósidos di y tri-fosfato. El fósforo es asimilado por la célula en forma de iones *orto* fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ). Las fuentes de fósforo en el medio de cultivo deben estar constituidas por el dihidrogeno fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) o por el hidrogenofosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ).

**Azufre:** El 60% del azufre está incorporado en las proteínas. El 5% en forma de sulfato inorgánico libre. El resto está en forma de enlaces disulfuro y en aminoácidos sulfurados libres, así como también está presente en algunas vitaminas. La fuente de azufre más utilizada en los medios de cultivo es el sulfato amónico.

**Potasio:** El potasio es un elemento mineral cualitativamente más importante en las levaduras, ya que a pH ácido el potasio estimula la fermentación y la respiración, además actúa como efector de numerosas enzimas entre otros. Las fuentes de potasio en los medios de cultivo son el cloruro potásico y los fosfatos mono y dipotásico.

**Magnesio:** El magnesio es necesario para el buen funcionamiento de muchas enzimas del metabolismo, así mismo está implicado en las estructuras de los ribosomas, de las membranas nucleares y ácidos nucleicos. Una carencia de magnesio en la fermentación alcohólica conlleva a la producción de ácido acético. El magnesio en los medios de cultivo se encuentra como cloruro o sulfato de magnesio.

## 2.2 FACTORES DE ESTRÉS QUE AFECTAN AL CRECIMIENTO DE UNA LEVADURA

### OSMOTOLERANCIA

Las levaduras resistentes a elevadas concentraciones de azúcar se denominan, en general, levaduras osmototolerantes. Para su definición, se han utilizado diversos términos como “osmofílicas” ‘osmotofílicas”, “osmotolerantes”, osmotodúricas, “osmotróficas”, “xerofílicas” o “xerotolerantes” (Casas, 1999).

Sin embargo, el término “levadura osmofílica” se considera impreciso según algunos autores, ya que estas cepas no requieren necesariamente para su supervivencia una baja  $A_w$ , y la presión osmótica no es un factor fisiológico de las levaduras (Casas, 1999). Así, y aunque el término “xerotolerantes” propuesto por Anand y Brown en 1968 se considera el más adecuado, la denominación más frecuente es la de levaduras osmotolerantes, reservándose el término xerotolerantes para especies de hongos filamentosos capaces de crecer a baja  $A_w$ .

Las levaduras tolerantes a altas concentraciones de azúcar presentan una serie de propiedades fisiológicas que les permiten la adaptación y supervivencia en tales condiciones de  $A_w$  reducida. La fundamental es su capacidad de acumular en su interior alcoholes polihídricos (polioles) como arabitol, manitol, arabinitol o glicerol (Casas, 1999). Estos polioles están implicados en la osmorregulación, y funcionan como solutos compatibles, es decir, sustancias que, acumuladas en niveles altos, protegen a las enzimas intracelulares frente a la inhibición e inactivación provocados por el estrés o el choque osmótico (Brown y Simpson, 1972). Al compensar la diferencia de presión osmótica a ambos lados de la membrana, la capacidad metabólica de estas levaduras no es afectada (Myers *et al.*, 1997).

*S. cerevisiae* también produce elevadas concentraciones de glicerol en respuesta a entornos de baja  $A_w$  pero es incapaz de retenerlo intracelularmente, y se acumula en el medio extracelular. El proceso es energéticamente desfavorable,

restringiendo la capacidad de esta especie para tolerar entornos de muy baja  $A_w$  por lo que en general no se le considera osmotolerante (Fleet, 1992).

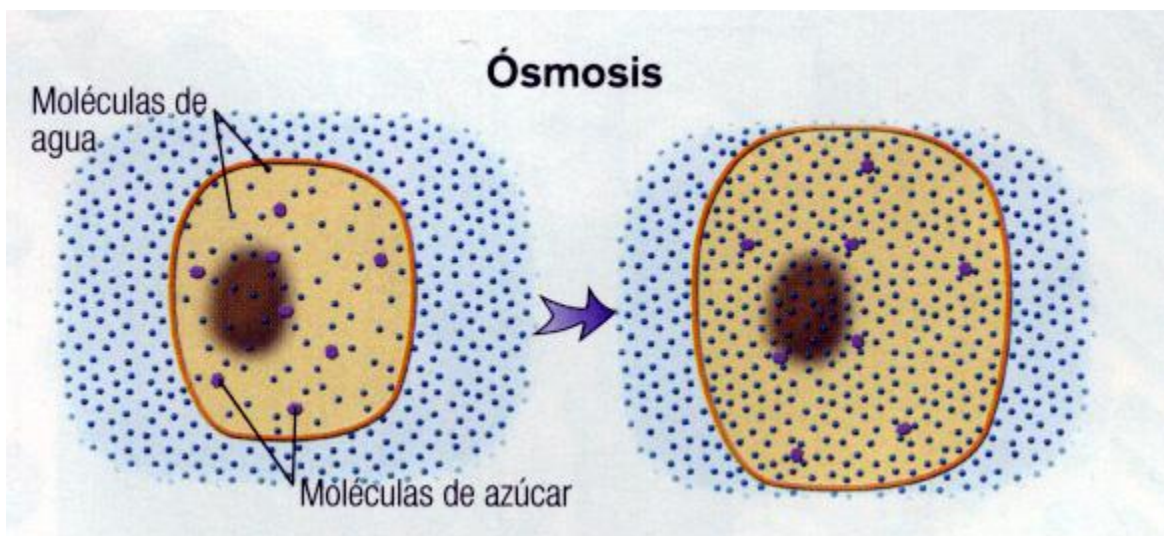
Las levaduras osmotolerantes, sin embargo, son capaces de sintetizar y retener glicerol, incluso algunas poseen bombas para la captación activa de glicerol del medio. Esta concentración intracelular de glicerol parece estar regulada por la  $A_w$  externa mediante una ATPasa de membrana. La acumulación de este polialcohol puede ser afectada por el tipo de soluto que provoca el descenso de  $A_w$  (Casas, 1999).

Otros factores implicados en la resistencia a elevadas concentraciones de soluto son la composición alterada de la pared y membrana celulares. Puesto que los polioles atraviesan con facilidad las membranas biológicas, en presencia de baja  $A_w$ , deben existir variaciones estructurales y/o funcionales en las mismas que les confiera menor permeabilidad al glicerol. Un posible mecanismo es un cambio en la composición de los fosfolípidos de la membrana, concretamente del grado de insaturación de los ácidos grasos, ya que a medida que aumenta este grado de insaturación aumenta también la fluidez de la membrana, y por tanto su permeabilidad.

Restaino *et al.*, (1983) sostienen que la  $A_w$  óptima para una levadura osmotolerante está fuertemente influida por el precondicionamiento, es decir, la exposición previa y continuada a elevadas concentraciones de azúcar. En este sentido, Tokuoka e Ishitani (1991) y Deak y Beuchat (1996) también afirman que la adaptación al entorno afecta a la osmotolerancia de las células de levadura, pues tras la preincubación en presencia de elevadas concentraciones de un azúcar, las levaduras son capaces de crecer posteriormente en medios con menor  $A_w$ , es decir, con mayor concentración de este mismo azúcar. Por tanto, cabe de nuevo hacer mención a la especificidad de soluto, no solo en el precondicionamiento, sino también en la supervivencia de las levaduras en medios con muy baja  $A_w$ . Así, Tokuoka e Ishitani (1991) encuentran que las células de levaduras de diferentes especies sobrevivirán incluso por debajo de la  $A_w$  mínima para el crecimiento cuando el medio contenía sacarosa, aunque morían si tenía glucosa o fructosa;

así mismo, la acción de la sacarosa disminuía la  $A_w$  mínima para el crecimiento tanto en cepas que asimilaban la sacarosa como en las que no (Casas, 1999).

El estrés osmótico puede ser definido como cualquier situación en la que hay un desequilibrio de osmolaridades intracelulares y extracelulares, suficiente para causar un cambio perjudicial en la fisiología. En ambientes naturales, levaduras están sometidas continuamente a cambios en la osmolaridad externa que puede ser extremadamente perjudicial para el funcionamiento celular (Gibson *et al.*, 2007). La inhibición por el azúcar se explica por un fenómeno de ósmosis: si una célula de levadura está situada en una disolución de azúcar de presión osmótica más fuerte que la del contenido de sus vacuolas (figura 5) la célula será más o menos plasmolizada (Tomasso, 2004).



**Figura 5.** Presión osmótica

Cuando la concentración de azúcar inicial es elevada, la fase *lag* se prolonga, la viabilidad celular durante la fase *lag* disminuye y los recuentos de células viables durante la fermentación dan valores bajos. En síntesis, la fermentación se retarda y quedan elevados niveles de azúcar residual (Casas, 1999).

## TOLERANCIA A ETANOL

Es conocida que la actividad fermentativa de todos los organismos productores de etanol declina progresivamente a medida que éste se acumula en el medio. La inhibición por producto final es uno de los factores que hacen disminuir la velocidad, a la cual los azúcares son convertidos en etanol y limita la concentración alcohólica final, lo que inevitablemente incide en los costos de producción de alcohol etílico comercial.

La acumulación de etanol en el entorno microbiano es una forma de estrés químico, análogo a otros factores ambientales como son los valores extremos del pH o la temperatura. Los organismos adaptados a vivir en condiciones ambientales adversas sufren cambios bioquímicos y fisiológicos, tales como modificaciones en muchas enzimas y en su estructura membranal, los que les permiten adaptarse a vivir en presencia de esas condiciones. Estos cambios no se observan en las especies que viven en medios moderados (Moreno y Rodríguez, 2012).

No todas las levaduras presentan la misma sensibilidad al etanol. Las más resistentes son las de *Saccharomyces sp.* que se presentan en los procesos de fermentación alcohólica para elaboración de bebidas o la producción industrial de etanol. Según las cepas y el estado fisiológico del cultivo, el etanol es tóxico a concentraciones de 8%(p/v) al 18% (p/v). La tolerancia al etanol depende de la composición en ácidos grasos de las membranas citoplasmáticas.

Para muchos organismos fermentativos la potencia de los alcoholes como inhibidores está directamente relacionada con su solubilidad lipídica, lo que indica que la acción de los mismos está dirigida hacia un sitio hidrofóbico como es la membrana citoplasmática. Esto confirma a los daños en la membrana como la principal causa de la inhibición alcohólica en *S. cerevisiae* (Medina *et al.*, 1999).

La composición lipídica de la membrana sufre importantes modificaciones en respuesta a la adición de etanol en el medio de crecimiento, modificaciones que repercuten sobre las funciones de la membrana, en particular alterando los

mecanismos de penetración de sustancias nutritivas, su permeabilidad selectiva y el mantenimiento de la vitalidad celular.

El etanol intracelular es más tóxico para las células que el etanol extracelular. La viabilidad de los cultivos puede incrementarse por la eficiencia de la excreción del etanol, debido a esto, hay una influencia de la presión osmótica: cuando la presión osmótica aumenta en el medio, la secreción del etanol se disminuye considerablemente (Buitrago y Tenjo, 2007).

### **2.3 CAPACIDAD PARA DEGRADAR AZÚCARES**

Los hidratos de carbono, carbohidratos, glúcidos o azúcares tienen también como función primordial aportar energía. Químicamente, están compuestos por carbono, hidrógeno y oxígeno ( $C_n: H_{2n}: O_n$ ).

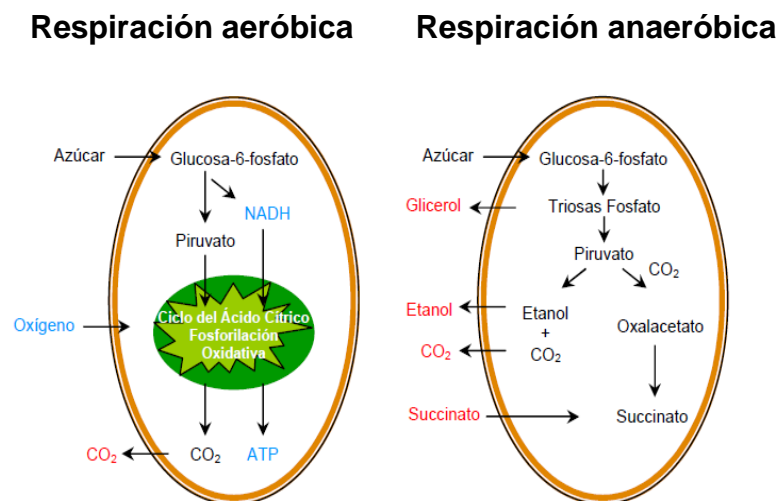
Durante la fermentación alcohólica la levadura utiliza a los carbohidratos como única fuente de carbono y energía. El cambio de carbohidratos a congénicos involucra varios pasos, el primero es el transporte de estos al interior de la célula de la levadura. En el caso de los monosacáridos lo puede hacer por dos sistemas de transporte diferente, uno de baja afinidad que involucra difusión facilitada y otro de alta afinidad que se realiza por translocación de grupos, cuando se trata de algún oligosacárido, incluida la sacarosa, o incluso dextrinas para algunas levaduras, primero son hidrolizados a monosacáridos por enzimas extracelulares o periplásmicas antes de entrar a la célula.

Es importante señalar que el transporte de carbohidratos por la levadura no es aleatorio, depende de cuáles y en qué condiciones se encuentren en el medio, y está sujeto a mecanismos de represión catabólica. El metabolismo de los carbohidratos dentro de la levadura puede realizarse por dos vías: una anaerobia a través de la glucólisis terminando con la síntesis de etanol, y otra aerobia, iniciando con la glucólisis pero terminando con el proceso de respiración en las mitocondrias (figura 6); la ruta que siga dependerá de la concentración de oxígeno

del medio (efecto Pasteur), aunque por otro lado, es también dependiente de la concentración de azúcares en el medio (efecto Crabtree) (Santillán *et al.*, 1998).

Cabe señalar que aunque generalmente se señala a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como un microorganismo facultativo, es decir que en condición aerobias se ve favorecida por la respiración, en realidad este microorganismo tiene una tendencia muy alta hacia el metabolismo anaerobio, aun cuando existan en el medio de cultivo bajas concentraciones de azúcares y altas concentraciones de oxígeno. Esta levadura requiere condiciones microaerófilas para sintetizar ergosterol y ácidos grasos insaturados que le permitan crecer en el medio, y en realidad la vía que se ve favorecida en la levadura es la fermentación para la producción de etanol, lo que le permite satisfacer estos requerimientos.

Existen evidencias de que los carbohidratos influyen en la formación de ciertos congenéricos como alcoholes superiores y ésteres. De cualquier forma, el hecho de que el metabolismo de carbohidratos sea por la vía anaerobia o por respiración es determinante en la formación de diferentes aminoácidos que serán a su vez precursores de diferentes congenéricos (Santillán *et al.*, 1998).



**Figura 6.** Ruta metabólica de carbohidratos

Como materia prima para la fermentación alcohólica se utilizan generalmente mieles, jugos de frutas, etc., los cuales contienen glucosa y fructosa; igualmente



es fácil de fermentar la sacarosa, no todos los azúcares pueden servir como sustrato para las levaduras. Tampoco puede fermentarse el almidón por cuanto las células de algunas levaduras, carecen de la enzima diastasa (amilasa) (Muller, 1964).

Una gran cantidad de microorganismos se reportan en la literatura para la producción de etanol a escala de laboratorio, pero muy pocos de estos tienen aplicación actualmente a nivel industrial. Cepas silvestres de diferentes microorganismos, por sus características bioquímicas, asimilan diferentes compuestos transformándolos en etanol, pero sus bajos rendimientos, su difícil propagación, la generación de subproductos, el estrecho abanico de sustratos asimilables, su baja tolerancia a distintas sustancias y condiciones, entre otras características, hacen que solo unas pocas tengan actual y exitosa aplicación a escala piloto o industrial (Mariscal, 2011).

Los microorganismos más utilizados son las levaduras, siendo diversas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* las de mayor aplicación así como algunas bacterias, destacándose la *Zymomonas mobilis*. El cuadro 4 resume algunos de los microorganismos utilizados y/o investigados para la producción de etanol a partir de diversos sustratos (Mariscal, 2011).

**Cuadro 4.** Principales microorganismos productores de etanol con aplicación o potencialidad industrial

<b>Microorganismo</b>	<b>Sustratos fermentables</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucosa Fructosa Sacarosa Maltosa Galactosa Manosa
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Glucosa Fructosa Maltosa Sacarosa
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Glucosa Lactosa Fructosa Sacarosa
<i>Pichia stipitis</i>	Glucosa Xilosa
<i>Pachisolen tannophilus</i>	Glucosa Xilosa Glicerol
<i>Zymomonas mobilis</i>	Glucosa Fructosa Sacarosa
<i>Clostridium thermocellum</i>	Glucosa Celulosa
<i>Candida albicans</i>	Glucosa Galactosa Lactosa
<i>Candida albicans</i>	Glucosa Sucrosa Galactosa Maltosa
<i>Candida kefir</i>	Glucosa Sucrosa Galactosa Lactosa

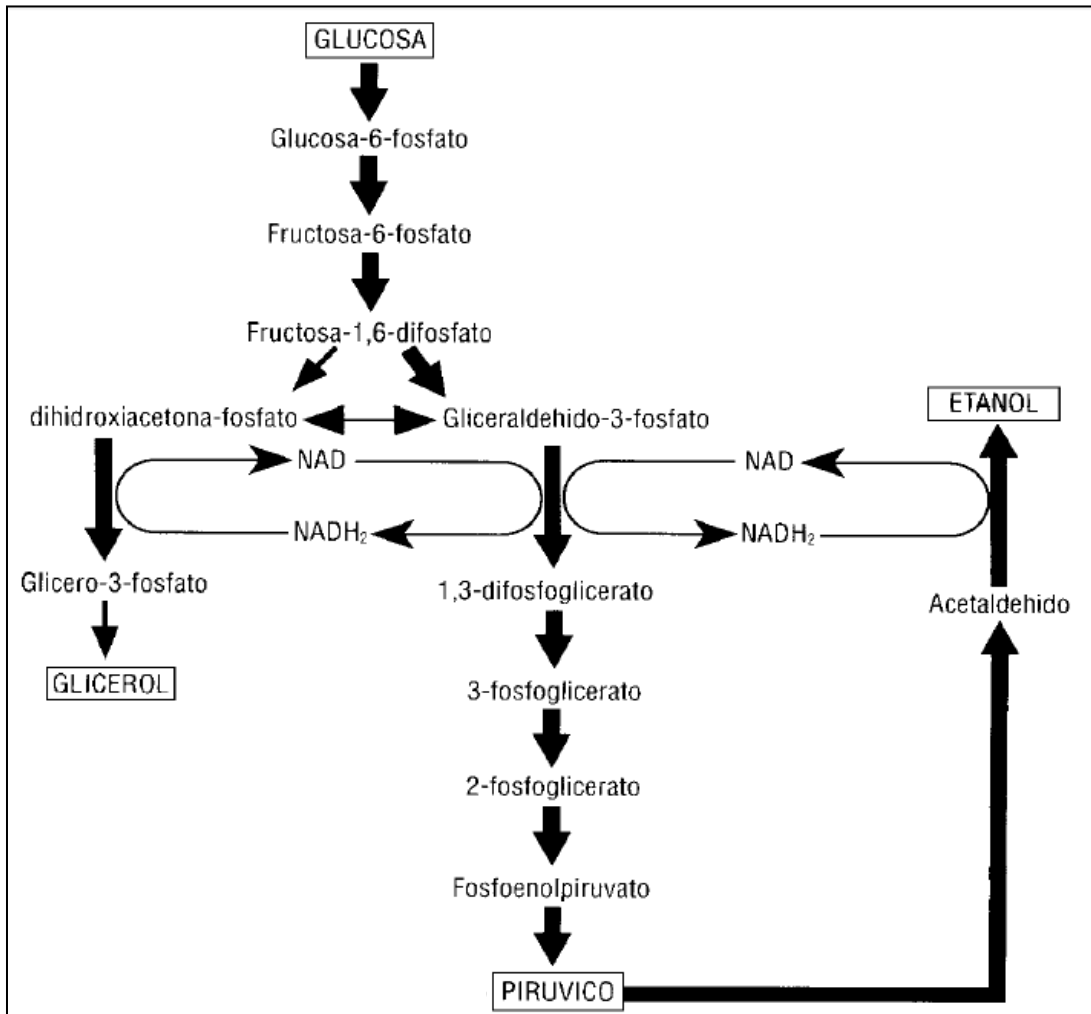
(Mariscal, 2011)

## 2.4 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La fermentación alcohólica es un proceso anaerobio en el que las levaduras y algunas bacterias, descarboxilan el piruvato obtenido de la ruta Embden-

Meyerhof-Parnas (glicólisis) dando acetaldehído, y éste se reduce a etanol por la acción del  $\text{NADH}_2$  (Jagnow y Dawid, 1991).

En la fermentación alcohólica los azúcares se oxidan hasta ser convertidos en piruvato en un proceso semejante a la glucólisis. Después el piruvato se decarboxila y se convierte en acetaldehído que posteriormente se reduce a etanol (figura 7).

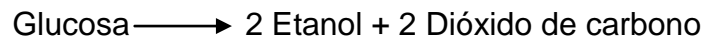
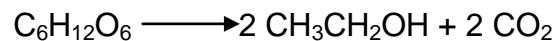


**Figura 7.** Fermentación alcohólica

La fermentación es un término general, que indica la degradación aeróbica o anaeróbica de un sustrato orgánico a diversos productos, por la acción de levaduras y algunas bacterias que producen enzimas para realizar dicha función y obtener energía en forma de ATP. La degradación anaeróbica es quizá la más

antigua, puesto que los organismos vivos aparecieron en una tierra primitiva, la cual era carente de oxígeno (Lehninger, 1981).

Existen muchas clases de fermentaciones, dependiendo del tipo de organismo que las produce, del sustrato, o incluso de las condiciones impuestas, tales como pH o el abastecimiento de oxígeno. Una de las más importantes y mejor conocidas es la fermentación alcohólica, la cual es una biorreacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono mediante la siguiente reacción química:



Las principales responsables de esta degradación son las levaduras. *Saccharomyces cerevisiae*, es la especie de levadura usada con mayor frecuencia, pero existen diversos estudios que comprueban la producción de alcohol por otros tipos de levaduras y algunas bacterias como *Zymomonas mobilis*, pero su explotación a nivel industrial es mínima. A nivel estequiométrico, esta reacción parece ser sencilla, pero la secuencia de transformaciones para degradar la glucosa hasta dos moléculas de alcohol y dos de dióxido de carbono es un proceso muy complejo, puesto que al mismo tiempo la levadura debe utilizar la glucosa y otros nutrientes adicionales para poder reproducirse. El rendimiento estequiométrico teórico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de dióxido de carbono por 1 gramo de glucosa. En realidad es difícil obtener este rendimiento por que como se mencionó anteriormente la levadura utiliza glucosa para la producción de otros metabolitos indispensables para su crecimiento y desarrollo. El rendimiento experimental varía entre el 90 y el 95 % del teórico, y en la industria varía del 87 al 93 % del teórico (Castaño y Londoño, 2009).

El éxito de una buena fermentación depende de la eficacia del tratamiento preliminar, concentración del azúcar, pH y temperatura óptimos; la adición de sustancias nutritivas al mosto, contaminación por otros microorganismos, empleo de un organismo resistente a altas concentraciones de alcohol, mantenimiento de

condiciones anaerobias y la inmediata destilación del producto fermentado (Castaño y Londoño, 2009).

## **2.5 PRODUCCIÓN DE ETANOL Y SU IMPORTANCIA**

El etanol o alcohol etílico es un producto químico orgánico más antiguo usado por el hombre, se presenta como un líquido incoloro e inflamable con un punto de ebullición de 78°C, su fórmula química es  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$ , siendo el componente activo esencial de las bebidas alcohólicas, además es una de las materias primas importantes para las síntesis. El etanol es un alcohol que se produce a través de la fermentación de los azúcares o del almidón extraído de la biomasa de ciertos cultivos. La producción de etanol en México se obtiene básicamente de la caña de azúcar. En el país se producen cerca de cinco millones de toneladas de azúcar y aproximadamente 56 millones de litros de etanol. Se estima que la capacidad instalada actualmente en las destilerías, es de 346,000 litros /día (Castaño y Londoño, 2009).

El alcohol etílico se obtiene por vías muy distintas dependiendo el uso que se le quiera dar: por hidratación de eteno, para emplearlo a nivel industrial como solvente e intermediario sintético; por vía fermentativa, para preparar bebidas y usarlo como oxigenante de combustibles, debido a su potencial como aditivo de la gasolina. Es el biocombustible más ampliamente utilizado hoy en día en los Estados Unidos, Brasil, Japón, Colombia, India y la Unión Europea; millones de litros se agregan al año a la gasolina para mejorar el rendimiento de los vehículos y reducir la contaminación atmosférica. El etanol se utiliza para aumentar el octanaje de la gasolina y mejorar la calidad de sus emisiones, como la mezcla E10 (10% de etanol y 90% de gasolina) pero puede ser usado en concentraciones mayores, tal como la mezcla E85 o en su forma pura.

Todos los fabricantes de automóviles que comercializan en el mundo aprueban el uso de ciertas mezclas de etanol y gasolina. Las mezclas de etanol como

carburante se utilizan con éxito en todos los tipos de vehículos y máquinas que requieren gasolina (Cabrera *et al.*, 2000).

El desarrollo industrial está conduciendo cada vez más al incremento del uso del alcohol, por la utilización de éste, directa o indirectamente para la elaboración de una serie de productos, en medicina, perfumería, textiles, disolventes, bebidas alcohólicas, combustibles, etc.

El uso del etanol carburante reduce las emisiones del dióxido de carbono emitido por la flota vehicular. Con esto, se espera un impacto positivo sobre el medioambiente, y en consecuencia en la salud de las personas que habitan las ciudades (Castaño y Londoño, 2009). Los efectos positivos sobre el medio ambiente se debe a que el etanol carburante:

- Es un compuesto biodegradable.
- Su composición produce un efecto oxigenante.
- Reduce la emisión de gases tóxicos de los vehículos tradicionales.
- Reduce el efecto invernadero.

### **2.5.1 SUSTRATOS EMPLEADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL**

La variedad de las materias primas usadas en la producción de este biocombustible vía fermentación son convenientemente clasificados bajo tres tipos de materias primas agrícolas:

1.- Sustancias con alto contenido de almidón (maíz, trigo, cebada, sorgo, patata), los cuales deben primero ser hidrolizados a azúcares fermentables por la acción de enzimas de malta o mohos.

2.- Sustancias con alto contenido de celulosa (madera, papel reciclado, residuos agrícolas), los cuales deben ser convertidos a azúcares, generalmente por la acción de ácidos minerales.

3.- Sustancias con alto contenido de azúcar (caña de azúcar, remolachas de azúcar, melazas, frutas tropicales), los cuales pueden ser convertidos directamente a etanol.

#### **2.5.1.1 MELAZA DE CAÑA**

La melaza es un subproducto del proceso de obtención de azúcar, generado durante las etapas de cristalización por evaporación y centrifugación de la masa cocida procedente de los evaporadores. Es un líquido viscoso, espeso y con una concentración más alta de impurezas y sales minerales en comparación con los jugos crudos. La composición de esta materia prima es muy variable, dependiente de las características del cultivo de caña o de la remolacha azucarera, del tipo y eficiencia del procesamiento en el ingenio y de las características de su almacenamiento. Lo anterior implica una gran variación en el contenido de azúcares y demás nutrientes, así como el color, viscosidad, sabor y aroma.

Las melazas de caña de azúcar se han venido utilizando en nuestro país como materia prima principalmente en la producción de alimentos para animales, y en la industria microbiológica para la producción de una gran variedad de sustancias y materiales como la levadura de panificación, ácido cítrico y etanol (incluyendo el etanol para el consumo humano). En este último su bajo costo y gran disponibilidad la hacen una materia prima ampliamente utilizada (Bonilla *et al.*, 1995)

La melaza es una mezcla compleja que contiene sacarosa, azúcar invertido, sales y otros compuestos solubles en álcali que normalmente están presentes en el jugo de la caña, así como los formados durante el proceso de manufactura del azúcar. Además de la sacarosa, glucosa, fructosa y rafinosa los cuales son fermentables, las melazas también contienen sustancias reductoras no fermentables (cuadro 5). Estos compuestos no fermentables reductores del cobre, son principalmente caramelos libres de nitrógeno producidos por el calentamiento requerido por el proceso y las melanoidinas que si contienen nitrógeno derivadas a partir de

productos de condensación de azúcar y aminocompuestos (Fajardo y Sarmiento, 2007).

**Cuadro 5.** Composición de la melaza de caña de azúcar

<b>Componentes</b>	<b>Constituyentes</b>	<b>Contenido (p/p)</b>
Componentes mayores	Materia seca	78%
	Proteínas	3%
	Sacarosa	60- 63% p/p
	Azucares reductores	3-5 % p/p
	Sustancias disueltas (diferentes azucares)	4-8 % p/p
	Agua	16%
	Grasa	0.40%
	Cenizas	9%
Contenido de minerales	Calcio	0.74%
	Magnesio	0.35%
	Fósforo	0.08%
	Potasio	3.67%
Contenido de aminoácidos	Glicina	0.10%
	Leucina	0.01%
	Lisina	0.01%
	Treonina	0.06%
Contenido de vitaminas	Colina	600 ppm
	Niacina	48.86 ppm
	Acido Pantoténico	42.90 ppm
	Piridoxina	44 ppm
	Rivoflavina	4.40 ppm
	Tiamina	0.88 ppm

(Tellez, 2004)

## **APROVECHAMIENTO DE LA MELAZA**

La melaza ha sido suministrada al ganado de carne y de leche por muchos años, principalmente como aditivo para incrementar la gustosidad o facilitar la reducción a comprimidos de las raciones convencionales mezclados en seco.

También ha sido utilizada como vehículo en varios tipos de alimentos líquidos; como suplemento para el ganado en pastoreo solo o adicionado con otros componentes como urea y ácido fosfórico. Igualmente ha sido común como ingrediente alimenticio para pollos y cerdos, en donde constituye un subproducto



de primer orden para su alimentación, ya que puede ser utilizada a niveles hasta de 40%, logrando alimentación adecuada en los animales (Ariza y González, 1997).

Por otro lado, se usa como fertilizante para suelos, mezclada con bagazo y otros componentes, en casos especiales de abundancia. También es frecuentemente utilizada como combustible. En general, se resumen en la cuadro 6.

**Cuadro 6.** Aprovechamiento de la melaza de caña

UTILIZACIÓN	CARACTERÍSTICAS
Alimentación animal	Alimentación menos rica: desecados sobre pulpas, mezcla con diversos alimentos, pulverizado de forrajes, suplemento de ensilajes.
Recuperación de líquidos desazucarados	Vinazas para la obtención de ácido glutámico. Lejías finales como alimento animal y para la obtención de aminoácidos
Fermentación	Lavaduras para panificación Levaduras para alimentación humana y animal: aditivo para piensos, extractos e hidrolizados de levadura, fuente de enzimas, vitaminas y ácidos nucleicos. Además es el sustrato utilizado en la producción de proteína unicelular. Grasas de levadura. Alcohol etílico. Productos colaterales de fermentación alcohólica.

(Ariza y González, 1997)

## 2.6 FACTORES QUE AFECTAN A LA PRODUCCIÓN DE ETANOL

Una vez que un microorganismo y un sustrato han sido seleccionados es necesario encontrar las condiciones de operación más adecuadas y que optimicen el sistema. Desde el punto de vista de la operación es muy importante decidir las siguientes variables: temperatura, pH entre otras. Unas de estas variables se miden a intervalos de tiempo. Las variables que se deben medir continuamente son: temperatura, pH, aireación, adición de nutrientes, y las variables medidas de manera intermitente son: biomasa, producto y consumo de sustrato (Fajardo y Sarmiento, 2007).

## TEMPERATURA

La temperatura es el factor de influencia decisiva para las actividades de las levaduras. La temperatura más adecuada para su reproducción y la fermentación oscilan entre 22°C a 27°C y se reproducen con mayor rapidez cuando la temperatura es de 25°C. A temperaturas superiores a 30°C, las levaduras pierden capacidad para desdoblar los azúcares y al aproximarse a 40°C dejan de crecer y reproducirse. En una fermentación alcohólica nunca se deben superar temperaturas de 32°C durante el periodo fermentativo ya que se corren varios riesgos:

- Inactivación de las levaduras responsables de la transformación de los azúcares en alcohol y CO<sub>2</sub>.
- Pérdida de alcohol por evaporación con merma de grado alcohólico.
- Iniciación de fermentaciones indeseables.

La influencia de la temperatura sobre el poder fermentativo, medida del porcentaje de etanol que una cepa de levadura es capaz de producir, es diferente. Cuando se fermenta a temperatura baja o moderada las fermentaciones son lentas, pero el grado alcohólico alcanzado es generalmente mayor que a temperaturas elevadas o superiores a los 30°C ó 35°C (Ramírez y Pedroza, 2001).

Además las fermentaciones alcohólicas efectuadas a 25°C obtienen mejores resultados que las efectuadas a 30°C ya que el crecimiento de los microorganismos, muestra que a 25°C la levadura se desarrolla a un 25.5% más que a 30°C; el consumo de sólidos solubles, sacarosa y grado alcohólico a 25°C es de 42.8%, 71.0% y 7.3°GL respectivamente mientras que a 30°C es de 36.4%, 63.8% y 6.0°GL (Ramírez y Pedroza, 2001).

Se debe tener en cuenta que para cada levadura existe una temperatura óptima de crecimiento, en la cual se muestra activa. Además, se tiene una zona independiente de la temperatura óptima en la cual la levadura aún presenta actividad; a medida que se aleja de la temperatura óptima su actividad disminuye notablemente. Por debajo de la temperatura señalada como mínima y por encima de la máxima, las levaduras continúan viviendo en estado latente, sin embargo, al

exponer cualquier levadura a una temperatura de 55°C por un tiempo de 5 minutos se produce su muerte (Esteva, 2009).

## **pH**

El pH es la medida de la concentración de iones hidrógeno y tiene un marcado efecto en la velocidad de crecimiento y el rendimiento. También el pH es óptimo para algunas especies como la de las levaduras que comprende un rango de 4.0 a 6.0. Un cambio en el valor de pH del medio puede afectar su composición y la naturaleza de la especie microbiana al disociarse ácidos y bases. Este último, puede afectar la floculación de la biomasa o su adhesión al vidrio. El pH tiene una gran influencia en los productos finales del metabolismo anaeróbico, por lo tanto es importante tener un control sobre esta variable durante el desarrollo del proceso de fermentación puesto que los microorganismos poseen un pH óptimo en el cual tienen mayor velocidad de crecimiento y rendimiento (Castaño y Londoño, 2009).

El crecimiento de la levadura y la velocidad de fermentación no se ve afectado por la variación de pH entre 3.5 y 6.0 en el medio, pero a valores de pH entre 3.05 hasta 3.50 en el medio, se logra alcanzar un máximo de rendimiento de acuerdo a la formación de producto y crecimiento de la levadura (Ramírez y Pedroza, 2001).

En una fermentación alcohólica, el pH varía normalmente entre un mínimo de 2.8 y un máximo de 3.8, rango que depende básicamente de la composición del medio a ser fermentado. Se establece que el pH en valores menores que 3.0 en un proceso fermentativo, se presenta el fenómeno de inhibición por pH, el cual se debe al efecto que esta variable tiene sobre los centros activos de las enzimas (Ramírez y Pedroza, 2001).

En el proceso de fermentación, el pH tiende a disminuir debido a la producción de ácidos, formados al tomar los nitrógenos de los aminoácidos perdiendo su carácter anfótero. En los procesos industriales, se hace uso de soluciones tampón para mantener niveles óptimos de acidez (Esteva, 2009).

## **AIREACIÓN**

La ausencia o presencia de oxígeno permite una selección tanto del microorganismo como de los productos del mismo. Cuando el cultivo se realiza en presencia de oxígeno la fermentación se denomina aeróbica y cuando este carece de oxígeno se denomina anaeróbica. Si la fermentación es anaeróbica, la mayor parte del carbono se emplea como energía y solo el 2 % se asimila como material celular.

Aunque la producción de etanol no requiere de oxígeno, en los primeros momentos de la fermentación, es necesaria aún la agitación y aireación para procurar una dispersión homogénea de la porción iniciador (mosto más inóculo) en los tanques de fermentación y la oxigenación para la reproducción de las células de levadura en condiciones óptimas. Una aireación sumamente excesiva es totalmente absurda ya que no obtendríamos alcohol si no agua y anhídrido carbónico debido a que las levaduras, cuando viven en condiciones aeróbicas, no utilizan los azúcares por vía fermentativa sino oxidativa, para obtener con ello mucha energía y, por lo tanto, mayor cantidad de células (Jurado y Sarzosa, 2009). La fermentación con agitación es ligeramente más rápida que la fermentación sin agitación. A pesar de ello, los niveles finales de etanol y azúcar obtenidos son similares en ambas condiciones de operación, observándose un ligero aumento en el grado alcohólico y el azúcar residual en la fermentación sin agitación (Jurado y Sarzosa, 2009).

## **CONCENTRACIÓN DE ALCOHOL**

Las levaduras, presentan cierta resistencia a las concentraciones de alcohol que se producen durante la fermentación, debido a que el etanol, inhibe el transporte de D-xilosa, amonio, glicina y algunos aminoácidos, así como afecta la función y estabilidad de algunas enzimas citoplasmáticas como la hexoquinasa, debido a que a concentraciones críticas de etanol, se presenta la formación de un complejo hexoquinasa-etanol el cual puede detener la reacción glucosa a glucosa-6 fosfato. En conclusión la tolerancia al alcohol depende de la habilidad de la célula para

exportar el etanol del interior al medio externo, un proceso que depende de la composición de la membrana y de la fluidez de la misma.

La célula modifica la composición en ácidos grasos de la membrana para minimizar los efectos de la fluidez que produce el etanol, de la misma manera la adaptación de las levaduras al etanol también obedece a una modificación de la composición lipídica de las membranas debido básicamente a un enriquecimiento de las mismas en esteroides y ácidos grasos de cadena larga, de esta manera para que las levaduras puedan adaptarse a altas concentraciones de alcohol debe existir un aumento del contenido de ácidos grasos insaturados con respecto a los saturados y un aumento en la longitud de las cadenas carbonadas de los ácidos grasos (Tomasso, 2004).

Una alta concentración de etanol en el medio tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la célula de levadura y la producción de etanol durante el proceso de fermentación. En ingeniería bioquímica estos efectos se definen y se modelizan como los modelos cinéticos de velocidad específica de crecimiento de producción de etanol, propuestos por Aiba et al (Esteve, 2009).

## **CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES**

Las levaduras necesitan los azúcares para su catabolismo, es decir, para obtener energía necesaria para sus procesos vitales. El principal nutriente de las levaduras es el carbono, el cual es suministrado por los azúcares contenidos en la materia prima, siendo la concentración de azúcares un valor que se debe considerar ya que afecta la velocidad de la fermentación, el comportamiento y el desarrollo de las células de levadura.

Cuando se trabaja con concentraciones de azúcar muy altas, se observa una deficiencia respiratoria en la levadura y por lo tanto un descenso de la velocidad de fermentación. De la misma forma la baja concentración puede frenar el proceso. La deficiencia respiratoria se debe al efecto inhibitorio por sustrato, el cual tiene efecto sobre la velocidad específica de crecimiento de las células de levadura (Esteve, 2009).

## **OXÍGENO**

Las levaduras son organismos anaeróbicos facultativos, que significa que pueden vivir sin oxígeno. Sin embargo, una aireación al comienzo de la fermentación asegura una buena cantidad de levaduras que se multiplicaran, de igual manera las levaduras normalmente utilizan la respiración aeróbica para oxidar la glucosa y así procesar su alimento, obteniendo ATP.

La fermentación es un proceso completamente anaerobio (sin la participación del aire) y la inclusión del oxígeno detiene o minimiza los procesos biológicos de las levaduras. Presentándose el efecto Pasteur, el cuál es un efecto de inhibición de la fermentación alcohólica debido a la participación del oxígeno (O<sub>2</sub>). Este efecto fue descubierto en el año de 1857 por el biólogo francés Louis Pasteur, que observó por primera vez que las levaduras dejaban de crecer al ser aireadas (Esteva, 2009).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las reservas de petróleo del planeta son recursos no renovables y es muy probable que antes de que se agoten, la tierra haya alcanzado un colapso climático desastroso. Por lo que es de vital importancia buscar formas alternativas de combustibles, que no dañen al medio ambiente y además que sean, en lo posible renovables. Es por eso que los biocombustible aparecen como una alternativa a la que están apostando algunos sectores. Estos se dividen en tres tipos, bioetanol, biodiesel y biogás (Esteva, 2009). El bioetanol se obtiene a partir de la fermentación del azúcar, el biodiesel a partir de aceites vegetales y el biogás, se obtiene de la fermentación anaeróbica de los desechos orgánicos.

En la actualidad, el bioetanol y el biodiesel son producidos alrededor del mundo, siendo mayor la producción de bioetanol que biodiesel. Entre las materias primas agrícolas que comúnmente se han utilizado a nivel mundial para la obtención de bioetanol se encuentran: la caña de azúcar, melazas de remolacha azucarera y el maíz (Esteva, 2009).

El bioetanol ofrece diversas ventajas sobre los derivados del petróleo, como son: menores precios de las importaciones, disminución en el costo del combustible, apoyo a productores agrícolas, mejoramiento de las situaciones económicas y sociales en zonas rurales, mayor seguridad energética y reducción de la contaminación, puesto que se ha comprobado que en términos generación de gases invernaderos, el etanol reduce la producción de estos gases en un 10 ó 15% de los que generan con la gasolina; y por último el uso de etanol para ser mezclado con la gasolina no ha tenido ningún efecto negativo en los motores de los automóviles (Castaño y Londoño, 2009).

Las levaduras son los microorganismo más utilizados para la producción de etanol por la vía fermentativa, debido a su alta productividad en la conversión de azúcares a bioetanol, sin embargo, cada microorganismo se comporta de manera diferente según las condiciones del medio de cultivo y el entorno en que se encuentre (temperatura, pH, agitación), lo cual en ocasiones es desfavorable para

la producción de etanol y como consecuencia se obtienen bajos rendimientos. Por ellos se hace necesario realizar un estudio comparativo para la producción de etanol entre un medio de cultivo sintético y uno natural, utilizando levaduras aisladas de distintos consorcios microbianos. La síntesis de etanol por vía microbiana es, a nivel mundial, una alternativa interesante para la actual demanda de combustibles así como para la obtención de bebidas alcohólicas. Los estudios sobre selección y evaluación de levaduras nativas productoras de etanol son de fundamental importancia para conocer especies eficientes en términos de adaptación a nuevos sustratos y resistentes al alcohol, para llevar a cabo fermentaciones alcohólicas completas.

En el presente trabajo se utilizó como medio de cultivo natural melaza de caña como fuente de sustrato. Esto debido no solamente por su alto contenido de azúcares fermentables (sacarosa, glucosa y fructosa), las cuales son susceptibles a un proceso de fermentación; si no también por su elevada producción a nivel nacional.



## **4. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar y comparar la capacidad productiva de etanol de ocho diferentes levaduras autóctonas de aguamiel y taberna, utilizando como sustrato un medio de cultivo natural y uno sintético.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ❖ Caracterizar morfológicamente a cada una de las levaduras.
- ❖ Evaluar la capacidad de cada levadura para degradar diferentes azúcares.
- ❖ Evaluar la capacidad de crecimiento de las levaduras empleando concentraciones elevadas de sustrato (osmotolerancia).
- ❖ Evaluar la capacidad de crecimiento de las levaduras empleando diferentes concentraciones de etanol (tolerancia a etanol).
- ❖ Evaluar la producción de etanol a nivel matraz, empleando un medio de cultivo sintético.
- ❖ Evaluar la producción de etanol a nivel matraz, empleando un medio de cultivo natural (melaza de caña).
- ❖ Determinar y comparar los rendimientos de cada levadura en los dos medios de cultivo.

## 5 METODOLOGÍA

Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en el Laboratorio de microbiología del Polo Tecnológico Nacional para el Desarrollo de Investigación y Pruebas analíticas en biocombustibles y en el Laboratorio de Investigación del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

### 5.1 MICROORGANISMOS

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron proporcionados por el laboratorio de Investigación, estas cepas fueron previamente aisladas de la “taberna” y pertenecen al género *Saccharomyces*, especie *cerevisiae*, denominadas LEV 35, LEV 51, LEV 64 y TL-ITTG-06. Las cepas estaban conservadas en glicerol al 30% (v/v) a -5°C.

Por otra parte las cepas aisladas de aguamiel (Moreno y Rodríguez, 2012), fueron proporcionadas por el laboratorio de microbiología, entre ellas se tiene identificada a una *Kluyveromyces marxianus*, denominada A3 y otras más denominadas A1, CAS-AaL-02 y CAS-AaL-04 que aún no están identificadas. Las cepas estaban conservadas mediante resiembra periódica en agar YM.

#### 5.1.1 REACTIVACIÓN DE LAS LEVADURAS

Se tomó una azada de un microtubo donde estaba conservada la levadura en glicerol, y se pasó a un matraz con 30 mL de caldo YM (10 g/L glucosa; 5 g/L peptona de caseína; 3 g/L extracto de malta; 3 g/L extracto de levadura, previamente esterilizado a 121°C, 15 lb/pulg<sup>2</sup> por 15 minutos), se dejó en agitación a 100 rpm por 24 h a 30 °C, pasado este tiempo se hizo un traspaso a otro matraz con el mismo medio, mismo volumen y las mismas condiciones de agitación, tiempo y temperatura. Posteriormente se tomó una azada de este caldo y se hizo una estría masiva en una caja Petri con agar YM, se dejó en incubación por 48 h a 30 °C. Finalmente de esta caja se tomó una azada y se resembró en tubos con agar YM.

### **5.1.2 RESIEMBRA EN TUBOS**

Se tomó una azada de cada levadura reactivada y se pasó a un tubo inclinado que contenía agar YM (10 g/L glucosa; 5 g/L peptona de caseína; 3 g/L extracto de malta; 3 g/L extracto de levadura; 20 g/L de agar bacteriológico), se hizo la estría masiva y se dejó en incubación por 48 h a 30 °C.

## **5.2. CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS**

### **5.2.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA**

Se prepararon por duplicado tubos Eppendorf con 1mL de caldo YM (10 g/L glucosa; 5 g/L peptona de caseína; 3 g/L extracto de malta; 3 g/L extracto de levadura) y se tomó una azada de cada levadura y se pasó a los tubos Eppendorf, se dejó en agitación a 120 rpm por 24 h. Después de este tiempo se centrifugó a 10000 rpm por 5 min y se desechó el sobrenadante, posteriormente se adicionó 0.5 mL de solución salina (NaCl al 0.9% p/v), se agitó en vórtex por 10 seg y se mezcló cada duplicado. Se hicieron dos lavados celulares más de la misma manera y posteriormente se midió la densidad óptica a 600 nm haciendo la dilución requerida. Posteriormente se ajustó la densidad a 0.3 y se tomó 2 µL de esta, se inoculó en agar YPD (20 g/L glucosa; 20 g/L de peptona de caseína y 10 g/L extracto de levadura). Finalmente se dejó en incubación y 30 °C por 24h.

### **5.2.2 CAPACIDAD PARA DEGRADAR DIFERENTES CARBOHIDRATOS**

Se prepararon tubos por duplicado con 8 mL de medio de cultivo, 0.25% (p/v) de extracto de levadura y 0.75% (p/v) de peptona de caseína, a cada tubo le fue colocado una campana Durham, para observar la producción de gas. Por otra parte se prepararon soluciones de azúcares (Fructosa, Glucosa, Lactosa, Sacarosa y Manitol) al 10% (p/v). Los tubos y las soluciones de azúcares fueron esterilizados a 15 lb/pulg<sup>2</sup> y 121 °C, durante 15 minutos. Posteriormente a cada tubo se le añadió 2 mL de la solución respectiva de azúcar y fueron inoculados con una azada de cada levadura. Se incubaron por 120 horas a 30°C, observando el proceso de formación de gas cada 24 horas.

### 5.2.3 OSMOTOLERANCIA

Las cepas de levadura fueron sometidas a diferentes concentraciones de glucosa (202.35 g/L; 252.35 g/L; 302.35 g/L y 352.35 g/L), en caldo YM (5 g/L peptona de caseína; 3 g/L extracto de malta; 3 g/L extracto de levadura). Cada prueba se hizo por duplicado en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 80 mL de medio y 10% (v/v) de inóculo. Los matraces se mantuvieron en agitación a 120 rpm, por 18-30 hrs y se monitoreo el crecimiento celular cada 3 h.

### 5.2.4 DETERMINACIÓN DE BIOMASA POR CUENTA AL MICROSCOPIO

La biomasa se determinó mediante la técnica de cuenta al microscopio. El recuento de microorganismos se realizó en un microscopio a 40x por medio de una cámara de Neubauer, haciendo una tinción previa con azul de metileno al 5% (v/v) para así cuantificar solo células viables. El conteo se hace en la cuadrícula central de la cámara y se multiplica por la profundidad, obteniéndose el número de microorganismos por unidad de volumen (número de células/mL, generalmente) con la siguiente ecuación:

$$\frac{Cel}{mL} = \frac{(Y)(\# \text{ de cuadros})(Fd)(1000mm^3)}{(\text{Vol. cámara})1cm^3(mL)}$$

Donde:

Y = promedio de levaduras contadas en los 5 cuadros

# de cuadros = 25

Fd= factor de dilución

1000 mm<sup>3</sup> = factor de conversión a mL.

Vol. Cámara = 0.2 mm x 0.2 mm x 0.1 mL x 25 cuadros = 0.1 mm<sup>3</sup>

### 5.2.5 DETERMINACIÓN DE BIOMASA POR DENSIDAD ÓPTICA

Se midió la turbidez generada por el crecimiento celular, por medio de un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 620 nm.

### **5.2.6 TOLERANCIA A ETANOL**

Las cepas de levadura fueron sometidas a diferentes concentraciones de etanol anhidro (99.5 % de pureza). Las concentraciones utilizadas fueron 0%, 5%, 6.5%, 8% y 10% (v/v), en caldo YM (10 g/L de glucosa, 5 g/L peptona de caseína; 3 g/L extracto de malta; 3 g/L extracto de levadura). Cada prueba se hizo por duplicado en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 80 mL de medio y 10% (v/v) de inóculo. Los matraces se mantuvieron en agitación a 120 rpm, por 18-30 hrs y se monitoreo el crecimiento celular por cuenta al microscopio y densidad óptica cada 3 h.

## **5.3 CRECIMIENTO MICROBIANO Y PRODUCCIÓN DE ETANOL EN MEDIO SINTÉTICO**

### **5.3.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO Y MEDIO DE CULTIVO**

Se realizó un preinóculo en un matraz erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de caldo YM el cual se inoculó con una suspensión celular del 10% (v/v) obtenida de los tubos resembrados y se incubó a una temperatura de 30°C, 120 rpm, durante 8 h.

Se preparó por duplicado 500 mL de medio de cultivo sintético específico para la producción de etanol (100 g/L de glucosa, 3 g/L de extracto de levadura, 4 g/L de sulfato de amonio, 1.5 g/L de fosfato de potasio dibásico, 0.55 g/L de sulfato de magnesio) y se le adiciono el 10% (v/v) de inóculo preparado anteriormente. Se incubó a 30 °C y 100 rpm.

### **5.3.2 DETERMINACIÓN DE BIOMASA POR CUENTA AL MICROSCOPIO**

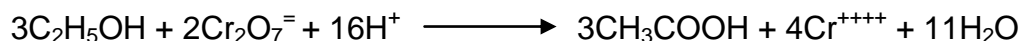
El crecimiento celular se determinó por cuenta al microscopio en cámara de Neubauer, haciendo una tinción previa con azul de metileno al 5% (v/v) para así cuantificar solo los microorganismos viables, se hizo el conteo al inicio y al final de la fermentación. Se empleó el procedimiento descrito en 5.2.4.

### 5.3.3 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR LA TÉCNICA DE DNS

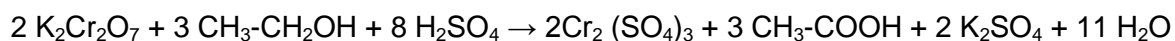
Se tomó 1 mL de muestra fermentada y se centrifugó a 10000 rpm por 5 min, posteriormente se hizo la dilución requerida y se tomó 0.5 mL de esta dilución adicionándole 1.5 mL de DNS, esta mezcla fue sometida a ebullición por 5 minutos y luego se enfrió agregándole 8 mL de agua destilada. Para determinar la absorbancia, esta solución fue leída en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm (Miller, 1959). El dato de la absorbancia fue reemplazado en la ecuación generada por la curva patrón (anexo A) utilizando glucosa. Esto se hizo al inicio y fin de la fermentación en medio sintético.

### 5.3.4 CUANTIFICACIÓN DE ETANOL POR OXIDACIÓN CON DICROMATO DE POTASIO

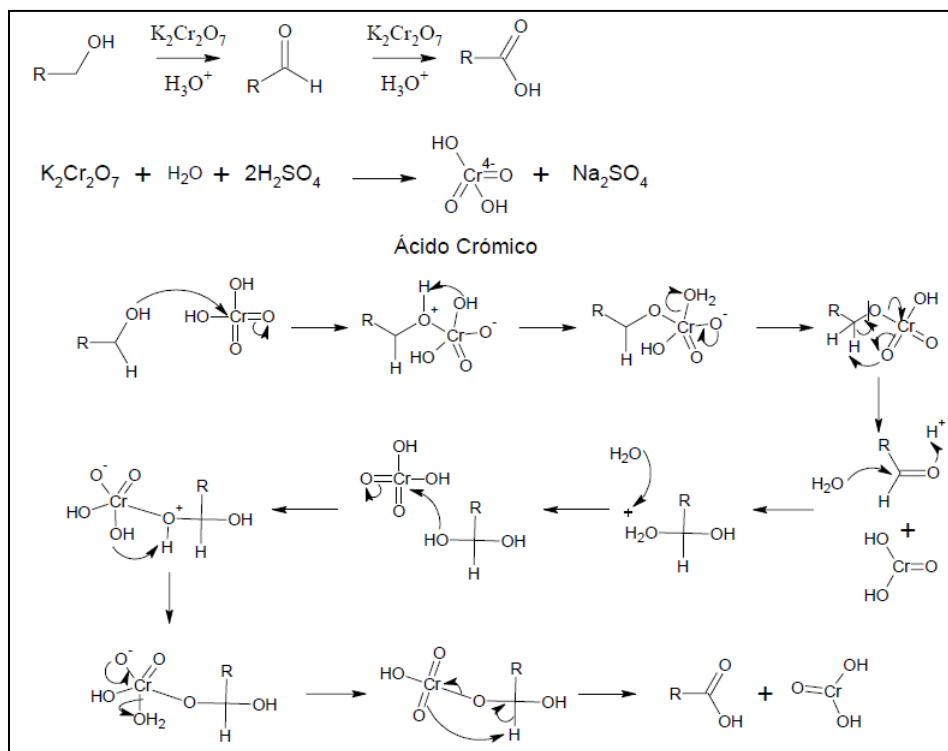
El etanol obtenido por destilación se oxida cuantitativamente a ácido acético por un exceso de dicromato de potasio estandarizado (Vela, *et al.*, 2004).



Cuando el alcohol difunde sobre una mezcla oxidante de dicromato de potasio en ácido sulfúrico, el ión crómico de color amarillo-naranja se reduce a ión cromoso de color verde-azul y el etanol es oxidado cuantitativamente a acetaldehído, ácido acético y agua.



La oxidación de alcoholes primarios produce, primeramente, el correspondiente aldehído, que fácilmente se oxida al ácido (figura 8). Esta reacción no es muy conveniente para preparar el aldehído, a menos que éste, con menor punto de ebullición que el alcohol o el ácido, se destile durante su formación.



**Figura 8.** Oxidación de alcoholes primarios por dicromato de potasio

El medio de cultivo fermentado, fue centrifugado a 10000 rpm por 5 minutos, se tomó 1 mL del sobrenadante y se depositó en un microtubo Eppendorf de 2 mL al cual se le agregó 1 mL de fosfato de tributilo, enseguida se dejó en agitación vigorosa en un vórtex durante una hora. Después de este tiempo, se dejó reposar la muestra de 5 a 10 minutos y se tomaron 750  $\mu\text{L}$  del sobrenadante adicionándole 750  $\mu\text{L}$  de la solución oxidante de dicromato de potasio (10 g de dicromato de potasio en 100 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5M) y se depositó en un microtubo Eppendorf de 2 mL, al cual se le dejó en agitación vigorosa por 30 minutos. Pasado este tiempo se dejó reposar de 5 a 10 minutos hasta observar la separación de fases y se tomaron 500  $\mu\text{L}$  de la fase inferior del microtubo y se transfirió a un tubo de vidrio de 16 x150, posteriormente se le adicionaron 3 mL de agua y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm (Seo, 2008). El dato de la absorbancia fue reemplazado en la ecuación generada por la curva patrón (anexo B) utilizando diferentes concentraciones de etanol anhidro (99.5% de pureza), en medio sintético. Se tomaron muestras cada 3 h a partir de las 12 h de fermentación.

## **5.4 CRECIMIENTO MICROBIANO Y PRODUCCIÓN DE ETANOL EN MELAZA DE CAÑA**

### **5.4.1 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES EN LA MELAZA POR HPLC**

El contenido de azúcares fermentables se analizó por medición de °Brix, haciendo una correlación por cromatografía líquida de alto desempeño HPLC. Para ello se prepararon soluciones de melaza en agua a 15, 10 y 7.5 °Brix, estas mismas soluciones fueron analizadas mediante HPLC para cuantificar la concentración de azúcares fermentables (sacarosa, glucosa y fructosa). La cuantificación de azúcares fermentables se realizó en un cromatógrafo con detector de índice de refracción (Pelkin Elmer serie 200a). La fase móvil fue agua con un flujo de 0.3 ml/min y se empleó una columna hi\_plax\_h 300x.7mm. La temperatura de la columna fue de 30 °C.

Previo a la inyección, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 20 minutos y finalmente se filtraron usando filtros millipore de 0.2 µm de diámetro.

### **5.4.2 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO Y DEL INÓCULO**

Previo a la elaboración del medio de cultivo se evaluaron diferentes pretratamientos a la melaza diluida 1:4, los cuales consistieron en someter al medio de cultivo a diferentes presiones y tiempos ( $15 \text{ lb/pulg}^2$  -15min,  $15 \text{ lb/pulg}^2$  -10min y  $10 \text{ lb/pulg}^2$  -10min), evaluando posteriormente los °Brix, pH, azúcares reductores y presencia de contaminantes a las 48h.

El pretratamiento se eligió en función del contenido de azúcares fermentables y ausencia de contaminantes, el medio se suplementó con 1 g/L de  $\text{NH}_4\text{SO}_2$ , 1 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0.5 g/L de  $\text{MgSO}_4$ .

El inóculo fue preparado en un matraz erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50ml de caldo YM el cual se inoculó con una suspensión celular del 10% (v/v) obtenida de los tubos resembrados y se incubó a una temperatura de 30°C, 120 rpm, durante 8 h.



Se prepararon por triplicado 500 mL del medio de cultivo anteriormente descrito, en matraces Erlenmeyer de 1L y se le adicionaron los 50 mL de inóculo (10% v/v) preparado como se describió anteriormente. Todos los matraces se incubaron a 30 °C con una agitación de 100 rpm.

#### **5.4.3 DETERMINACIÓN DE BIOMASA POR CUENTA AL MICROSCOPIO**

El crecimiento celular se evaluó por cuenta al microscopio en cámara de Neubauer, tomando muestra al inicio y final de la fermentación (48h), haciendo una tinción previa con azul de metileno al 5% (v/v) para así cuantificar solo células viables.

#### **5.4.4 CUANTIFICACIÓN DE ETANOL POR OXIDACIÓN CON DICROMATO DE POTASIO**



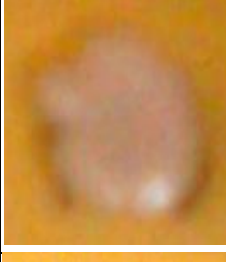

El medio de cultivo fermentado, fue centrifugado a 10000 rpm por 5 minutos, se tomó 1 mL del sobrenadante y se depositó en un microtubo Eppendorf de 2 mL al cual se le agregó 1 mL de fosfato de tributilo, enseguida se dejó en agitación vigorosa en un vórtex durante una hora. Después de este tiempo, se dejó reposar la muestra de 5 a 10 minutos y se tomaron 750  $\mu$ L del sobrenadante adicionándole 750  $\mu$ L de la solución oxidante de dicromato de potasio (10 g de dicromato de potasio en 100 mL de  $H_2SO_4$  5M) y se depositó en un microtubo Eppendorf de 2 mL, al cual se le dejó en agitación vigorosa por 30 minutos. Pasado este tiempo se dejó reposar de 5 a 10 minutos hasta observar la separación de fases y se tomaron 500  $\mu$ L de la fase inferior del microtubo y se transfirió en un tubo de vidrio de 16 x150, posteriormente se le adicionaron 3 mL de agua y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. El dato de la absorbancia fue reemplazado en la ecuación generada por la curva patrón (anexo C) utilizando diferentes concentraciones de etanol anhidro (99.5% de pureza) en medio de cultivo natural. Se tomó muestra cada 3 h a partir de las 12 h de fermentación.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES





### 6.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Del estudio macroscópico de las colonias crecidas en medio YPD, las cepas LEV 35, LEV 51, LEV 64, TL-ITTG-06, CAS-AaL-04 y A1, resultaron ser de color crema, mientras que las cepas A3 y CAS-AaL-02 fueron de color blanco. El predominio del color blanco y crema de las levaduras, puede estar influenciado por las condiciones climáticas de la zona de donde fueron aisladas las levaduras, tales como cielos nublados y lluvias constantes (Uribe, 2007). Las características macroscópicas de las levaduras aisladas de taberna y aguamiel se muestran en el cuadro 7 y 8 respectivamente.

**Cuadro 7.** Morfología macroscópica de las levaduras aisladas de taberna

Cepa		Morfología macroscópica
LEV 35		Color crema, rugosa, borde irregular, puntiforme, opaca, plana, colonias pequeñas.
LEV 51		Color crema, borde irregular, circular, cremosa, brillante, plana, colonias pequeñas, puntiforme
LEV 64		Color crema, cremosa, borde irregular, opaca, convexa, colonias grandes
TL-ITTG-06		Color crema, circulares, cremosa, borde entero, brillante, colonia pequeña, convexa.

**Cuadro 8.** Morfología macroscópica de las levaduras aisladas de aguamiel

<b>A1</b>		Color crema, circular cremosa, brillantes, borde entero, colonia mediana.
<b>A3</b>		Color blanca, circular, cremosa, borde entero, brillante, colonia pequeña, convexa.
<b>CAS-AaL-02</b>		Color blanca, circular, lisas, opaca, borde irregular, plana, brillante, colonia mediana
<b>CAS-AaL-04</b>		Color crema, opaca, circular, cremosa, borde irregular, plana, colonia grande.

Las cepas aisladas de aguamiel presentaron características similares a los reportados por Moreno y Rodríguez (2012), quienes describieron que las levaduras aisladas de aguamiel presentaban color crema, forma circular y de bordes irregulares.

Las cepas denominadas LEV 51, LEV 64, TL-ITTG-06, A1, CAS-AaL-04, presentan características de tipo *Saccharomyces cerevisiae*, al ser colonias de color crema, circulares, cremosas, de borde irregular (Uribe 2007).

## 6.2 CAPACIDAD PARA DEGRADAR DIFERENTES CARBOHIDRATOS

La prueba fue realizada mediante pruebas bioquímicas en caldo de carbohidratos (glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa y manitol) en medio YPD con las ocho levaduras, lo cual permitió evidenciar la presencia o ausencia de gas (CO<sub>2</sub>) en la campana de Durham, lo que indicó si el metabolismo de la levadura es fermentativo o no. Este crecimiento se siguió por la producción de gas, biomasa y turbidez en un término de 96 h (cuadro 9).

**Cuadro 9.** Resultados de la degradación de carbohidratos

Azúcar	Cepa	96 h			Azúcar	Cepa	96 h		
		Gas	Biomasa	Turbidez			Gas	Biomasa	Turbidez
Glucosa	LEV 35	++++	++++	++++	Sacarosa	LEV 35	++++	++++	++++
	LEV 51	++++	++++	++++		LEV 51	++++	++++	++++
	LEV 64	++++	++++	++++		LEV 64	++++	++++	++++
	TL-ITTG-06	++++	++++	++++		TL-ITTG-06	++++	++++	++++
	A1	+++	+++	+++		A1	++++	+++	+++
	A3	++++	+++	+++		A3	-	+	++
	CAS-AaL-02	+++	+++	++		CAS-AaL-02	+++	++	+
	CAS-AaL-04	++++	+++	++++		CAS-AaL-04	+	-	++
Fructosa	LEV 35	++++	++++	++++	Lactosa	LEV 35	-	+	+
	LEV 51	++++	++++	++++		LEV 51	-	+	+
	LEV 64	++++	++++	++++		LEV 64	++	++	++
	TL-ITTG-06	++++	++++	++++		TL-ITTG-06	-	+	+
	A1	+++	++	++		A1	+	+	+
	A3	++++	++++	+++		A3	+++	++	+
	CAS-AaL-02	+++	+++	++		CAS-AaL-02	-	++	+
	CAS-AaL-04	++++	++++	+++		CAS-AaL-04	-	-	+
Manitol	LEV 35	-	-	-					
	LEV 51	-	-	-					
	LEV 64	-	-	-					
	TL-ITTG-06	-	-	-					
	A1	-	+	++					
	A3	+	+	+					
	CAS-AaL-02	+	-	+					
	CAS-AaL-04	-	-	-					

Nota: (- nula; + poca; ++ moderada; +++ abundante; ++++ sobreabundante)

Las ocho levaduras evaluadas (LEV 35, LEV 51, LEV 64, TL-ITTG-06, A1, A3, CAS-AaL-02 y CAS-AaL-04) presentaron características similares al producir gas y biomasa de manera abundante y sobreabundante en glucosa y fructosa. La utilización de determinados azúcares es la base para la diferenciación bioquímica de los microorganismos quienes utilizan con mayor facilidad los carbohidratos de menor peso molecular, siendo los monosacáridos (glucosa, fructosa) los más utilizados.

Durante la fermentación, la levadura utiliza a los carbohidratos como única fuente de carbono y energía. En el caso de los monosacáridos lo puede hacer por dos sistemas de transporte diferentes, una de baja afinidad que involucra difusión facilitada y otro de alta afinidad que se realiza por translocación de grupos (Santillan y Garcia , 1998).

En los resultados obtenidos con respecto a la degradación de sacarosa, la mayoría de las levaduras presentaron abundante crecimiento y producción de gas, es decir estas levaduras poseen el complejo enzimático (invertasa) que le permite hidrolizar la sacarosa a monosacáridos (glucosa y fructosa) y posteriormente fermentarlos.

Las cepas A3 y CAS-AaL-04 no presentaron crecimiento en sacarosa, esto podría deberse a que las células de estas levaduras no poseen la enzima invertasa (sacarasa). Cuando se trata de algunos disacáridos, incluida la sacarosa, primero son hidrolizados a monosacáridos por enzimas extracelulares o periplasmicas antes de entrar a la célula. Las enzimas del tipo invertasa actúan como catalizadores para la hidrólisis de este disacárido (Santillan y Garcia, 1998).

En la lactosa presentaron crecimiento, dos de los ocho microorganismos, LEV 64 de manera moderada y A3 de manera abundante. En el 2011, Mariscal describe que *Kluyveromyces marxianus* es un microorganismo fermentativo de lactosa. Lara *et al.*, 2012, identificaron a este microorganismo (A3) como *Kluyveromyces marxianus*.

Sin embargo, para el caso de LEV 64 (*Saccharomyces cerevisiae*), no contiene la enzima lactasa y para que sea capaz de fermentar lactosa, es necesario aplicar un tratamiento enzimático, hidrolizando la lactosa en glucosa y galactosa (Mittal, 1992). Probablemente este microorganismo presentó crecimiento debido a que sufrió alguna contaminación o podría tratarse de otra especie. Se reportan algunas especies de levaduras capaces de fermentar lactosa como *K. marxianus* y *C. kefyr* (Zumbado *et al.*, 2006) o *Candida guilliermondii* (Mariscal, 2011).

Algo en común que se puede observar en estas levaduras aisladas, es que ninguna de estas levaduras fue capaz de crecer en manitol. Hasta la fecha no se ha reportado alguna especie de levadura degradadora de manitol.

La melaza de caña es un fluido rico en carbohidratos como la fructosa, sacarosa y glucosa (Fajardo y Sarmiento, 2007), por ello fue importante evaluar la capacidad de fermentación de carbohidratos de cada una de las cepas aisladas de aguamiel y taberna.

Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Regodón (2000), quien sometió a levaduras identificadas como *Saccharomyces* y no *Saccharomyces* a fermentación de diferentes carbohidratos, reportando que las cepas fermentaron glucosa y sacarosa, y ninguna lactosa.

### 6.3 PRUEBA DE OSMOTOLERANCIA

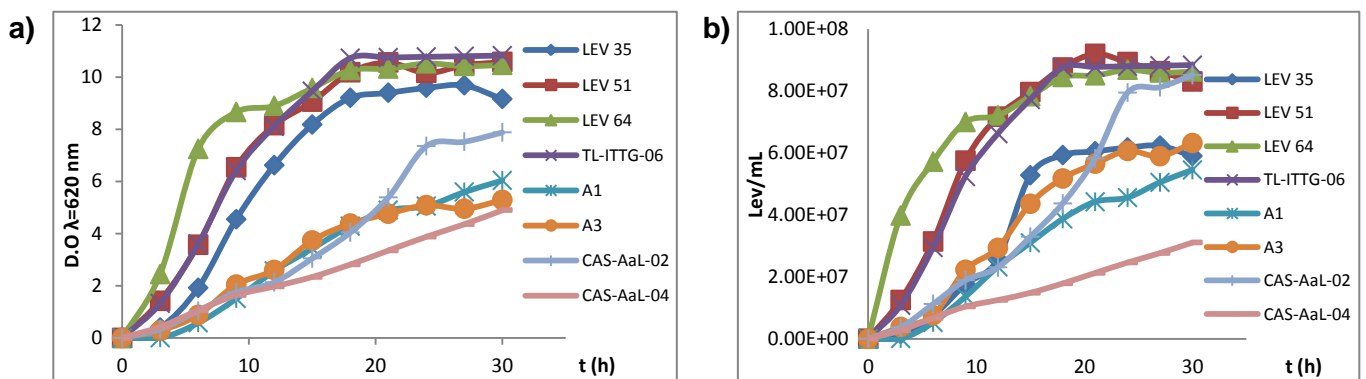
Con la finalidad de conocer la concentración máxima de glucosa tolerable por las ocho cepas se realizó un ensayo de osmotolerancia en diferentes concentraciones (20%, 25%, 30% y 35% p/v) con agitación constante a 120 rpm. El crecimiento celular se siguió por dos metodologías diferentes, por densidad óptica y por cuenta al microscopio por cámara de New Bauer haciendo una tinción previa con azul de metileno al 5%, esto para diferencial la viabilidad celular de cada una de las cepas.

Al evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de glucosa sobre el crecimiento de las levaduras, se encontró que dichas concentraciones afectaron el crecimiento, siendo menor su crecimiento entre mayor fue la concentración de glucosa, sobre todo en las levaduras provenientes de aguamiel. En las figuras 9, 10, 11 y 12 (a y b) se muestran los crecimientos obtenidos por las dos metodologías empleadas. En estas figuras se puede observar que por densidad óptica las levaduras aisladas de la taberna (LEV 35, LEV 51, LEV 64 y TL-ITTG-06) presentaron mayor crecimiento en todas las concentraciones de glucosa evaluadas con respecto a las cepas provenientes de aguamiel (A1, A3, CAS-AaL-02 y CAS-AaL-04). Esto puede atribuirse a que las levaduras aisladas de taberna son de un tamaño mayor que las cepas de aguamiel, lo cual pudo generar una mayor turbidez en el medio, así como también a su mayor capacidad para crecer a elevadas concentraciones de azúcar. En cuanto al crecimiento evaluado por cuenta al microscopio el crecimiento se observa de manera más homogénea entre los dos grupos de levaduras (agave y taberna), comparado con el método anterior, esto puede atribuirse a que la determinación de crecimiento por densidad óptica es un método indirecto que expresa resultados de células vivas y muertas, mientras que por cuenta al microscopio, solo expresa células viables, debido a la tinción previa con azul de metileno que se hizo.

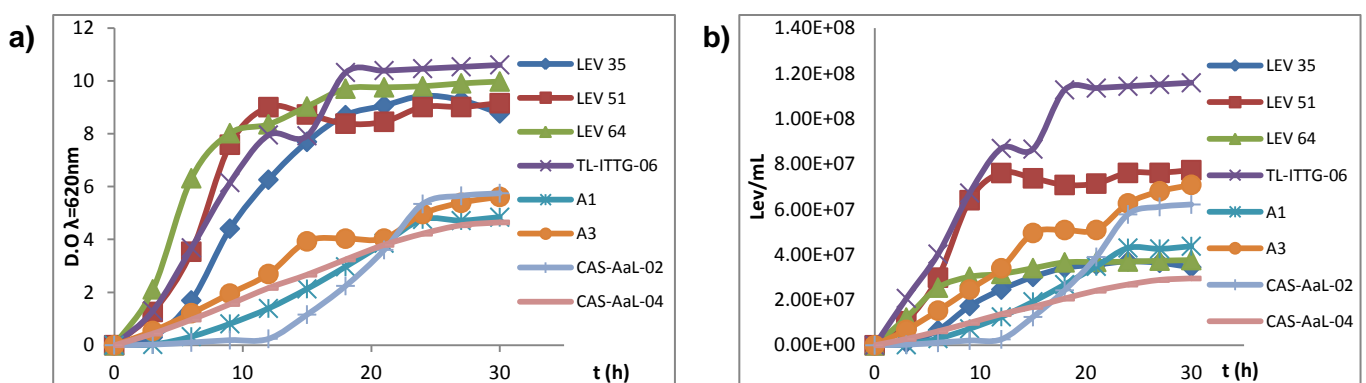
El crecimiento en toda las levaduras fue mayor a una concentración de glucosa al 20% (p/v), comparado con el crecimiento obtenido en las demás concentraciones. Es decir las levaduras toleran una concentración de glucosa del 20% y por encima de esa concentración, los microorganismos comienzan a declinar su crecimiento.

Tomasso (2004) explica que al exponer a las levaduras en elevadas concentraciones de glucosa ocurre un fenómeno de ósmosis; es decir, si una célula de levadura está situada en una disolución de azúcar de presión osmótica más fuerte que la del contenido de sus vacuolas, la célula se hincha y explota (plasmólisis).

En todas las concentraciones de glucosa evaluadas, destacó el grupo de cepas aisladas de taberna, sobre todo la cepa denominada LEV 51 quien alcanzó un mayor crecimiento en la mayoría de las concentraciones de glucosa evaluadas a las 30h de crecimiento.

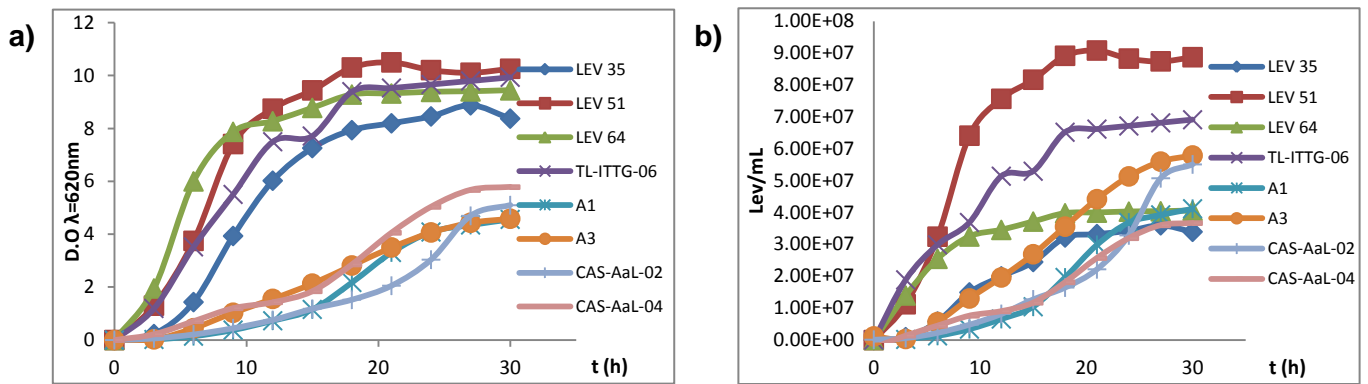


**Figura 9.** Crecimiento de las levaduras en 200g/L de glucosa. a) Densidad óptica. b) Cuenta al microscopio

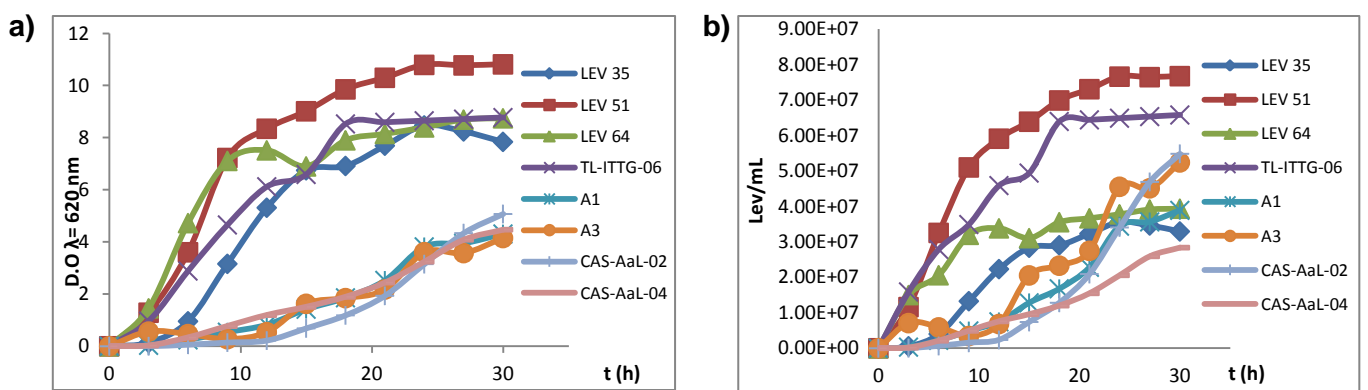


**Figura 10.** Crecimiento de las levaduras en 250g/L de glucosa. a) Densidad óptica. b) cuenta al microscopio





**Figura 11.** Crecimiento de las levaduras en 300g/L de glucosa. a) Densidad óptica. b) cuenta al microscopio



**Figura 12.** Crecimiento de las levaduras en 350g/L de glucosa. a) Densidad óptica. b) cuenta al microscopio

Al evaluar el efecto de altas concentraciones de glucosa (200, 250, 300 y 350 g/L), se observó que el crecimiento de las levaduras no se vio afectado totalmente, al presentar un buen crecimiento en concentraciones de 250, 300 y 350 g/L. Las densidades ópticas máximas alcanzadas por LEV 35, LEV 51, LEV 64, TL-ITTG-06, A1, A3, CAS-AaL-02 y CAS-AaL-04, fueron de 8.24, 10.8, 8.75, 8.77, 4.30, 4.15, 4.15, 5.07 y 4.47 respectivamente empleando 350 g/L de glucosa, lo que nos indica que son cepas tolerantes a altas concentraciones de glucosa teniendo un crecimiento aceptable comparado con los obtenidos por Salcedo (2008), quien obtuvo valores de densidad óptica de 1.011 a una longitud de onda de 600nm con levaduras aisladas de melaza de caña a una concentración de 320 g/L de glucosa.

El descenso en el crecimiento de las levaduras bajo las condiciones de concentraciones elevadas de glucosa pudo ser consecuencia de la respuesta primaria hacia el estrés osmótico al que estuvieron expuestas continuamente las levaduras. La respuesta primaria de las células de levadura frente al continuo estrés osmótico consiste en varios eventos moleculares que son activados por los cambios celulares repentinos (Uribe, 2007).

La respuesta inmediata, que se da en segundos, es una salida del agua intracelular, seguida de un proceso adaptativo más largo para tratar de llevar a cabo un ajuste osmótico. Debido al movimiento de agua, las concentraciones intracelulares de iones y biomoléculas se incrementan dando como resultado una disminución en la actividad celular (Folch *et al.*, 2004).

Específicamente, cuando *S. cerevisiae* se enfrenta a una condición de alta osmolaridad externa sufre un cambio inmediato en el volumen celular debido a la pérdida de agua del citosol. Tal deshidratación es un proceso rápido y se compensa parcialmente por un influjo de agua de la vacuola al tiempo que ésta acumula iones tóxicos en beneficio del citoplasma y los organelos. Para sobrevivir y continuar con el crecimiento, las células deshidratadas pueden recuperar el turgor siempre y cuando la severidad del estrés sea fisiológicamente aceptable.

Así mismo, se inducen mecanismos involucrados en la resistencia al estrés, como son el aumento en la concentración intracelular de glicerol y la exclusión de iones tóxicos (Folch *et al.*, 2004).

Entre los cambios fisiológicos más evidentes que ocurren durante una situación de estrés hiper-osmótico en la levadura *S. cerevisiae* es la síntesis y acumulación de glicerol, el cual funciona como el principal responsable del mecanismo de osmorregulación, involucrado en el mantenimiento del turgor celular (Folch *et al.*, 2004).

Resultados similares fueron obtenidos por Erasmus *et al.*, (2003), quienes encontraron que el estrés osmótico redujo significativamente el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en jugo de uva, que tenía una concentración de azúcar del 40% (p/v). De semejante modo, Uribe (2007), reportó que el crecimiento de

diversas levaduras aisladas de diferentes bodegas, declinaron su crecimiento en concentraciones de glucosa del 50% y 60% (p/v).

Regodón (2000), evaluó el crecimiento de levaduras aisladas de comarcas vitivinícolas, entre ellas *Saccharomyces cerevisiae*, a concentraciones de glucosa de 30% y 37% (p/v), obteniendo resultados con mejor crecimiento a 30%.

La importancia de esta prueba fue debido a que los mostos de fermentación utilizados como sustrato y fuente de energía para la producción de etanol, contienen altas concentraciones de carbohidratos como glucosa, fructosa y sacarosa. La melaza de caña es un fluido rico en carbohidratos como la fructosa, sacarosa y glucosa (Fajardo y Sarmiento, 2007).

## 6.4 PRUEBA DE TOLERANCIA A ETANOL

Las pruebas de tolerancia a etanol se realizaron en medio líquido YM a diferentes concentraciones de etanol (0%, 5%, 6.5%, 8% y 10% v/v). Se encubaron durante 30 horas a temperatura ambiente (entre 28 y 30°C) con agitación constante a 120 rpm.

En esta prueba el crecimiento de las levaduras en un medio sin etanol (figura 13), se observa un comportamiento uniforme. En las figuras 13, 14, 15 y 16 (a y b) se puede observar que al incrementar la concentración de etanol en el medio, el crecimiento declina y el etanol empieza a ser tóxico para las cepas, disminuyendo significativamente el crecimiento de algunas de ellas.

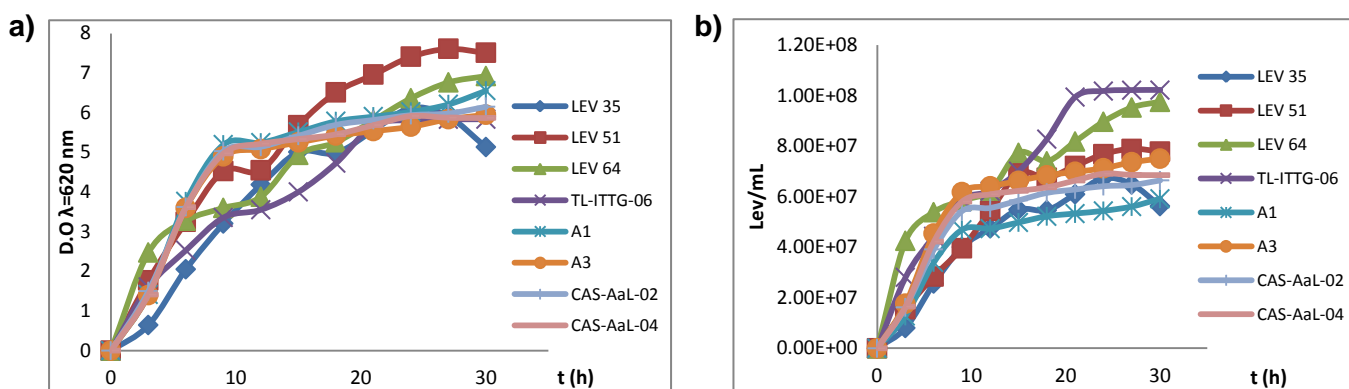


Figura 13. Crecimiento de las levaduras en ausencia de etanol. a) Densidad óptica. b) cuenta al microscopio.

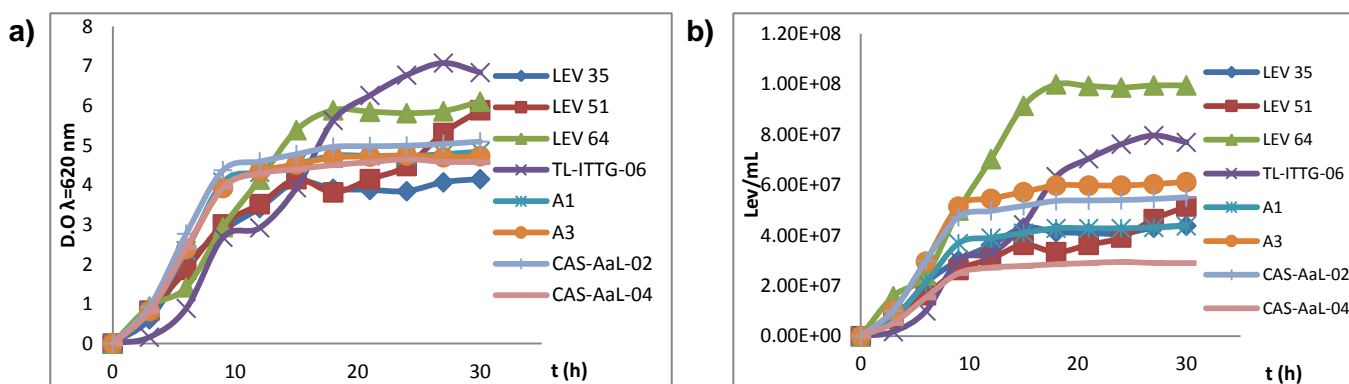
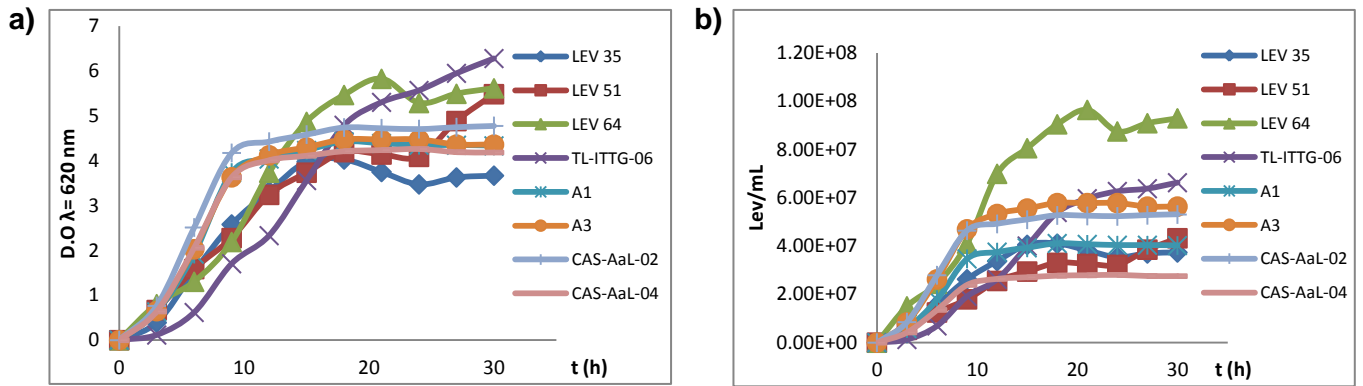
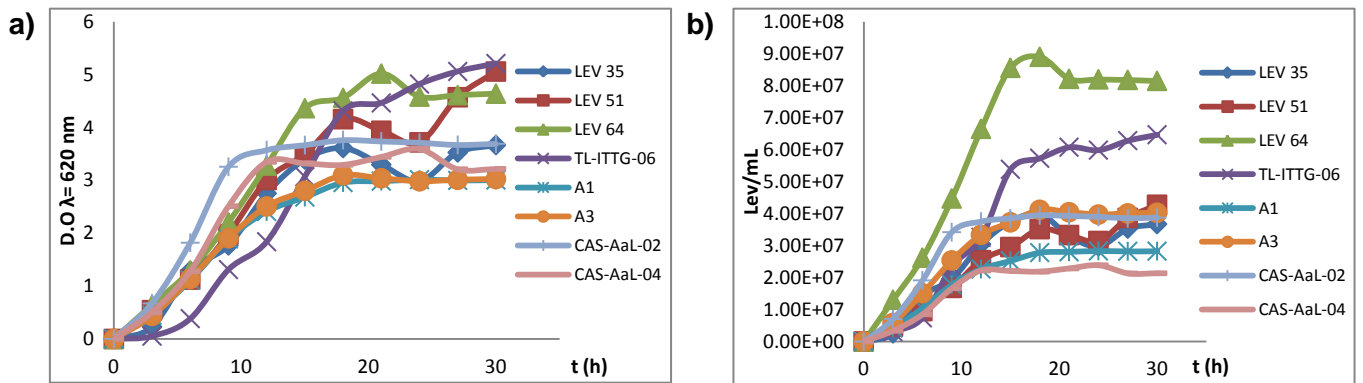


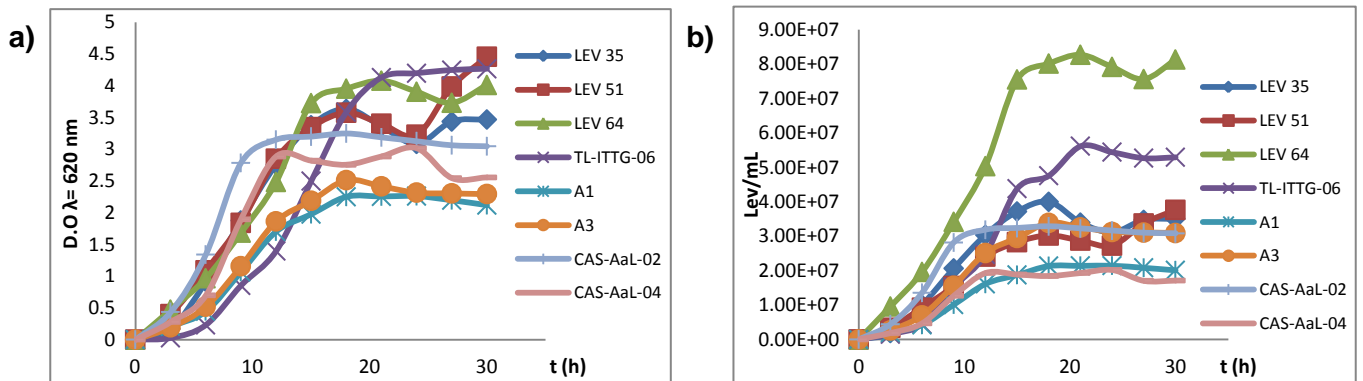
Figura 14. Crecimiento de levaduras en presencia de 5% de etanol. a) Densidad óptica. b) cuenta al microscopio.



**Figura 15.** Crecimiento de las levaduras en presencia de 6.5% de etanol. a) Densidad óptica. b) cuenta al microscopio.



**Figura 16.** Crecimiento de las levaduras en presencia de 8% de etanol. a) Densidad óptica. b) cuenta al microscopio.



**Figura 17.** Crecimiento de las levaduras en presencia de 10% de etanol. a) Densidad óptica. b) cuenta al microscopio.

De semejante modo a la prueba anterior, el crecimiento celular se siguió por dos metodologías diferentes (densidad óptica y cuenta al microscopio). Hacer una previa tinción con azul de metileno permite diferenciar las células vivas de las muertas. Se basa en la presencia de enzimas en las células vivas que reducen el colorante a leucoderivado incoloro, de modo que las células vivas permanecen incoloras y las muertas se tiñen de color azul (Farreyra, 2006).

La cepa denominada LEV 64 (aislada de taberna), presentó un mayor crecimiento en la todas las concentraciones de etanol utilizadas, alcanzando un crecimiento celular de  $9.95 \times 10^7$ ,  $9.2 \times 10^7$ ,  $8.15 \times 10^7$ ,  $7.57 \times 10^7$  ( $^{Lev}/_{mL}$ ) a 5%, 6.5%, 8% y 10%  $^v/v$  de etanol respectivamente. Por otro lado, la cepa con menor crecimiento fue la CAS-AaL-02 (aislada de aguamiel) con  $2.90 \times 10^7$ ,  $2.76 \times 10^7$ ,  $2.38 \times 10^7$  y  $1.71 \times 10^7$  ( $^{Lev}/_{mL}$ ) a 5%, 6.5%, 8% y 10%  $^v/v$  de etanol respectivamente.

Comparando las figuras 14, 15, 16 y 17 (b) se puede observar que la cepa LEV 64 es la menos afectada por las diferentes concentraciones de etanol, esto se debe a que las levaduras, presentan cierta resistencia a las concentraciones de alcohol que se producen durante la fermentación, debido a que el etanol, inhibe el transporte de D-xilosa, amonio, glicina y algunos aminoácidos, así como afecta la función y estabilidad de algunas enzimas citoplasmáticas como la hexoquinasa, debido a que a concentraciones críticas de etanol, se presenta la formación de un complejo hexoquinasa-etanol el cual puede detener la reacción glucosa a glucosa-6 fosfato.

El etanol afecta profundamente el metabolismo de las levaduras especialmente alterando la membrana citoplasmática y por ende la asimilación de nutrientes y transporte de glúcidos. La supervivencia de las levaduras a estas concentraciones de etanol se podría deber al efecto protector de sustancias tales como los esteroides (Farreyra, 2006).

La célula modifica la composición en ácidos grasos de la membrana para minimizar los efectos de la fluidez que produce el etanol, de la misma manera la adaptación de las levaduras al etanol también obedece a una modificación de la

composición lipídica de las membranas debido básicamente a un enriquecimiento de las mismas en esteroides y ácidos grasos de cadena larga, de esta manera para que las levaduras puedan adaptarse a altas concentraciones de alcohol debe existir un aumento del contenido de ácidos grasos insaturados con respecto a los saturados y un aumento en la longitud de las cadenas carbonadas de los ácidos grasos (Tomasso, 2004).

Pina *et al.*, (2003) estudiaron la tolerancia a etanol en *Saccharomyces cerevisiae* y levaduras no *Saccharomyces*, en medios de cultivo suplementados con y sin ergosterol, demostrando que las células tuvieron una mayor supervivencia en el medio suplementado.

Es conocido que la actividad fermentativa de todos los organismos productores de etanol declina progresivamente a medida que éste se acumula en el medio.

La acción tóxica del etanol producido durante la fermentación o adicionado exógenamente es muy compleja. El etanol muestra efectos diferentes sobre el crecimiento celular, la viabilidad y la capacidad fermentativa (Medina *et al.*, 1999).

Esta prueba es importante debido a que la acumulación extracelular de etanol en el medio es la causa del descenso en la fermentación, Dombeck (1988) e Ingram (1989), mencionan que este descenso comienza a concentraciones extracelulares de etanol relativamente bajas, entre 1% y 2% (p/v). Según estos autores, cuando el etanol extracelular alcanza una concentración del 5%, tiene lugar una pérdida del 50% de la actividad metabólica.

Dombeck (1988) e Ingram (1989), también hacen mención que el descenso en la actividad fermentativa coincide con la transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria de crecimiento, y esta transición supone numerosos cambios fisiológicos, pues la maquinaria celular cambia de una actividad biosintética intensa a una actividad, fundamentalmente, de mantenimiento.

## 6.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE ETANOL EN MEDIO SINTÉTICO

Se evaluó la producción de etanol de las ocho levaduras en un medio sintético que contenía como fuente de carbono glucosa, las condiciones de fermentación se llevaron a cabo a temperatura ambiente (entre 28 y 30 °C) a una agitación de 100 rpm.

El cuadro 10, muestra las concentraciones de biomasa producida y sustrato consumido, así como también la producción de etanol a las 48h de fermentación y los rendimientos obtenidos.

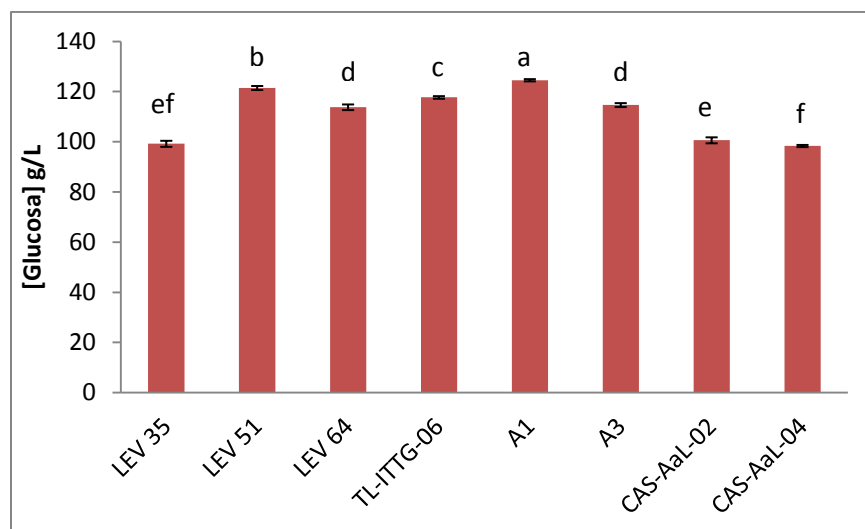
**Cuadro 10.** Producción de etanol y biomasa y consumo de sustrato en medio sintético a las 48h de fermentación

Cepa	(Lev/mL)	[S] g/L	[ETOH] (g/L)	Y (P/s)	% conversión de sustrato
	X <sub>producida</sub>	S <sub>consumido</sub>			
LEV 35	$5.63 \times 10^7 \pm 4.12 \times 10^6$ <sup>c</sup>	$99.23 \pm 1.20$ <sup>ef</sup>	$48.76 \pm 2.13$ <sup>a</sup>	$0.49 \pm 0.01$	$99.25 \pm 0.20$
LEV 51	$7.91 \times 10^7 \pm 3.34 \times 10^6$ <sup>b</sup>	$121.48 \pm 0.80$ <sup>b</sup>	$32.07 \pm 1.69$ <sup>bc</sup>	$0.26 \pm 0.01$	$99.50 \pm 0.16$
LEV 64	$8.73 \times 10^7 \pm 2.13 \times 10^6$ <sup>a</sup>	$113.80 \pm 1.12$ <sup>d</sup>	$32.95 \pm 2.69$ <sup>b</sup>	$0.29 \pm 0.02$	$99.40 \pm 0.11$
TL-ITTG-06	$8.09 \times 10^7 \pm 3.59 \times 10^6$ <sup>b</sup>	$117.71 \pm 0.52$ <sup>c</sup>	$29.17 \pm 0.90$ <sup>d</sup>	$0.24 \pm 0.00$	$99.50 \pm 0.40$
A1	$1.00 \times 10^7 \pm 3.21 \times 10^6$ <sup>d</sup>	$124.56 \pm 0.45$ <sup>a</sup>	$28.96 \pm 3.12$ <sup>d</sup>	$0.23 \pm 0.02$	$98.68 \pm 0.42$
A3	$1.11 \times 10^7 \pm 2.97 \times 10^6$ <sup>d</sup>	$114.67 \pm 0.78$ <sup>d</sup>	$26.54 \pm 1.45$ <sup>d</sup>	$0.23 \pm 0.01$	$99.52 \pm 0.18$
CAS-AaL-02	$2.26 \times 10^7 \pm 6.26 \times 10^6$ <sup>e</sup>	$100.62 \pm 1.19$ <sup>e</sup>	$29.30 \pm 2.06$ <sup>cd</sup>	$0.29 \pm 0.01$	$99.50 \pm 0.19$
CAS-AaL-04	$2.19 \times 10^7 \pm 2.12 \times 10^5$ <sup>e</sup>	$98.36 \pm 0.43$ <sup>f</sup>	$32.44 \pm 1.34$ <sup>bc</sup>	$0.33 \pm 0.01$	$99.60 \pm 0.05$



Se puede observar que la concentración inicial de glucosa en las ocho levaduras fue diferente, esto se debe a que el medio se preparó en dos partes, una contenía la solución de glucosa y la otra los demás componentes del medio (extracto de levadura, sulfato de amonio, fosfato de potasio dibásico y sulfato de magnesio). Esto se hizo con la finalidad de evitar la reacción de Maillard al momento de esterilizar el medio. Ésta reacción tiene como base la interacción entre azúcares reductores y aminoácidos libres o grupos aminos terminales de las proteínas al ser expuestos a temperaturas mayores a 65°C, provocando la formación de una base de Schiff, seguido del reordenamiento de Amadori, una enolización y la reacción de Strecker (Miranda, *et al.*, 2007). La concentración de azúcar presente pudo variar al momento de hacer la mezcla del medio.

Con base a las concentraciones finales de azúcar reductor (glucosa), el consumo total de éstos, expresados en términos de porcentaje para las cepas LEV 35, LEV 51, LEV 64, TL-ITTG-06, A1, A3, CAS-AaL-02 y CAS-AaL-04 fueron 99.25, 99.5, 99.4, 99.5, 98.68, 99.52, 99.5 y 99.6 % respectivamente. De acuerdo a lo anterior se puede decir que en el consumo de azúcares de todas las cepas no existe diferencia significativa, sin embargo en términos de concentración de azúcar reductor consumido (figura 18), se puede observar de acuerdo al análisis de varianza por Anova simple, que todas las levaduras presentaron diferencia estadísticamente significativa, excepto LEV 64 y A3 al consumir casi la misma cantidad de glucosa. Esta variación de sustrato consumido se le atribuye a que las concentraciones iniciales de glucosa, fueron diferentes para cada levadura y al ser la glucosa un azúcar fácilmente asimilable, fue consumido casi en su totalidad por las levaduras.



**Figura 18.** Concentración de azúcar consumido en medio sintético a las 48h de fermentación

Para determinar la concentración de etanol producido al final de la fermentación (figura 19), primero se realizó una curva de calibración de dicromato de potasio, dándole un previo tratamiento a cada muestra con agente extractante denominado fosfato de tributilo.

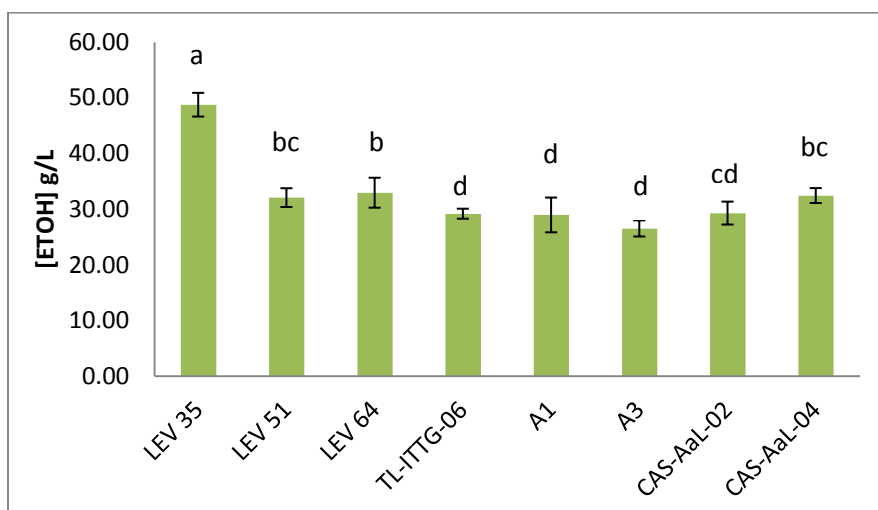
La cuantificación de etanol se determinó mediante la oxidación del etanol por dicromato de potasio, esta es una técnica colorimétrica la cual se fundamenta en el cambio de color, cuando el alcohol se difunde sobre una mezcla oxidante de dicromato de potasio en ácido sulfúrico, el ion crómico de color amarillo-naranja, se reduce a ion cromoso de color verde-azul y el etanol es oxidado cuantitativamente a acetaldehído, ácido acético y agua (Vela *et al.*, 2004), entre mayor sea la concentración de etanol en una muestra, el color verde será más intenso. El desarrollo de color fue aumentado al paso de las horas. Cabe mencionar que para aplicar esta técnica, fue necesario realizar un tratamiento con un agente extractante (fosfato de tributilo) para extraer el etanol de las muestras, éste tratamiento tiene la finalidad de evitar pasar por un proceso de destilación.

El Fosfato de tributilo (TBF) pertenece al grupo de extractantes que actúan por solvatación, fenómeno mediante el cual el metal en forma de moléculas o

complejos neutros inorgánicos que se encuentran en la fase acuosa, se rodean o son extraídos por las moléculas del extractante.

Los extractantes que actúan por solvatación se pueden clasificar en dos grupos: 1) los que contienen oxígeno o azufre unido a un átomo de fósforo, como por ejemplo los alquilfosfatos, 2) los que contienen oxígeno unido a un átomo de carbono, como las cetonas, alcoholes, éteres etc.

El TBF es un extractante neutro capaz de extraer ácidos y cationes metálicos mediante la interacción de un grupo capaz de donar electrones (grupo P=O de la molécula de TBF) y un par de electrones (el ión de la molécula que solvata) (Samaniego, 2006).



**Figura 19.** Producción de etanol en medio sintético a las 48h de fermentación

El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol, es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO<sub>2</sub> por cada gramo de glucosa (Vázquez y Dacosta, 2007). Comparando el rendimiento teórico con los rendimientos obtenidos por cada levadura, se puede observar que la mayoría de las levaduras, obtuvo un rendimiento mucho menor al teórico. Sin embargo este rendimiento teórico nunca es alcanzado en la práctica, esto se le atribuye a varias razones: los dos ATP generados en la glucólisis son empleados de inmediato para la biosíntesis celular, de esta manera, el crecimiento está fuertemente ligado a la

producción de etanol, por lo que la biomasa puede considerarse un subproducto de la fermentación generado a partir de la glucosa (Mariscal, 2011).

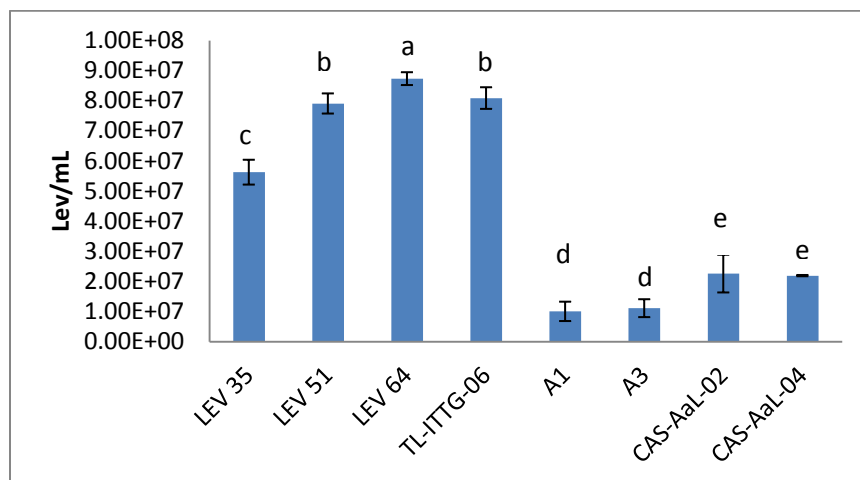
Otra razón se debe a que intermediarios de la ruta glucolítica se desvían inevitablemente, generando otros subproductos como glicerol, ácidos orgánicos y alcoholes mayores. Durante la fermentación las levaduras nunca encuentran un ambiente fisiológicamente óptimo y están expuestas simultáneamente y secuencialmente a una serie de condiciones de estrés. Estas condiciones impiden que los microorganismos se comporten normalmente y afecta la viabilidad, supervivencia y productividad (Mariscal, 2011).

La cepa LEV 35 presentó un rendimiento de 0.491 gramos de etanol por cada gramo de glucosa, este resultado es muy semejante al valor teórico, lo cual sugiere que la LEV 35 podría considerarse como una excelente levadura para producir etanol.

Venegas y Zapata (2010), determinaron la producción de etanol por oxidación con dicromato de potasio, usando como medio de cultivo buchón hidrolizado con *Pleurotus ostreatus*, fermentado por levaduras aisladas de macrofitas acuáticas, reportando una producción máxima de etanol de 36.42 g/L a las 48h de fermentación. Los resultados obtenidos por estos autores son superiores a los encontrados en este trabajo por la mayoría de las levaduras. Esto podría deberse a que en la fermentación está influenciada por varios factores como la temperatura, pH, concentración de azúcares y otras variables que influyen en el crecimiento de los microorganismos y la producción de etanol (Oviedo *et al.*, 2009)

Por otra parte Buitrago y Tenjo (2007) reportaron una producción de etanol de 9.33 g/L en un medio sintético con 20 g/L de glucosa, utilizando *S. cerevisiae*, obteniendo un rendimiento ( $Y^{P/s}$ ) de 0.45. Al comparar esta fermentación con la obtenida, se evidencia un mayor rendimiento de producto por estos autores, sin embargo la concentración de sustrato fue menor y el tiempo de fermentación fue de 18h. Esto indica que la levadura transforma con mayor eficiencia la glucosa en concentraciones mínimas.

Al evaluar la producción de biomasa de cada cepa (figura 20) al finalizar la fermentación, se observó que las levaduras aisladas de taberna presentaron un mejor crecimiento que las de aguamiel. Cabe mencionar que en el proceso de fermentación las levaduras provenientes de aguamiel, presentaron una mayor producción de espuma que las de taberna. Nahvi *et al.*, 2002, comprobaron que la generación de espuma es un interferente en el crecimiento del microorganismo.



**Figura 20.** Producción de biomasa en medio sintético a las 48h de fermentación

Las levaduras LEV 51, LEV 64, TL-ITTG-06, A1, A3, CAS-AaL-02 y CAS-AaL-04 agotaron casi todo el sustrato, obteniendo una eficiencia de conversión de sustrato superior al 99% para todas las levaduras, excepción de A1, con un 98.69%, sin embargo las cantidades de etanol obtenidas no fueron tan elevadas como el de la cepa LEV 35, esto se le atribuye a que en una fermentación, las levaduras también utilizan el sustrato para el crecimiento celular tal como lo expresa la figura 20. Se puede observar que A1, A3, CAS-AaL-02 y CAS-AaL-04 (levaduras aisladas de aguamiel), presentaron muy poca producción de biomasa, esto podría deberse a que en el proceso fermentativo hubo mayor producción de espuma tal como se menciona anteriormente, así como también, la glucosa pudo haber sido utilizada para generar otros subproductos como glicerol, ácidos orgánicos y alcoholes mayores (Mariscal, 2011).

La cepa LEV 35 presentó una menor producción de biomasa comparada con las demás cepas aisladas de taberna (LEV 51, LEV 64 y TL-ITTG-06), esto se le atribuye debido a que su producción de etanol fue la más elevada.

El análisis estadístico hecho por Anova simple, demostró que existió diferencia estadísticamente significativa en la producción de biomasa por todas las cepas, excepción de A1 y A3, al presentar un crecimiento celular similar.

La fermentación alcohólica es un proceso muy complejo; el incremento de la concentración de etanol a medida que transcurre la fermentación supone un obstáculo para el correcto crecimiento y desarrollo microbiano por los efectos negativos que esto conlleva. El etanol afecta la permeabilidad de la membrana celular disminuyendo su selectividad, de forma que las levaduras inmersas en una alta concentración alcohólica pierden propiedades funcionales y no pueden retener cofactores y coenzimas (Oviedo, 2009).

### 6.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE ETANOL EN MEDIO NATURAL

Se evaluó la producción de etanol de las ocho levaduras en un medio natural (melaza de caña) que contenía como fuente de carbono glucosa, fructosa y principalmente sacarosa. Las condiciones de fermentación se llevaron a cabo a temperatura ambiente (entre 28 y 30 °C) a una agitación de 100 rpm.

El cuadro 11, muestra las concentraciones de biomasa producida y sustrato consumido, así como también la producción de etanol a las 48h de fermentación y los rendimientos obtenidos.

**Cuadro 11.** Producción de etanol y biomasa en melaza de caña a las 48h de fermentación.

Cepa	(Lev/mL)	[S] g/L	[ETOH] (g/L)	Y (p/s)	% conversión de sustrato
	$X_{\text{producida}}$	$S_{\text{consumido}}$			
LEV 35	$2.16 \times 10^8 \pm 1.23 \times 10^{7a}$	$119.59 \pm 3.33^c$	$49.00 \pm 1.90^c$	$0.41 \pm 0.00$	$41.84 \pm 0.67$
LEV 51	$1.64 \times 10^8 \pm 2.08 \times 10^{7bc}$	$130.93 \pm 3.08^a$	$56.33 \pm 3.43^{ab}$	$0.43 \pm 0.01$	$44.68 \pm 0.60$
LEV 64	$1.53 \times 10^8 \pm 1.04 \times 10^{7cde}$	$123.71 \pm 0.00^b$	$55.60 \pm 0.80^{ab}$	$0.45 \pm 0.00$	$42.65 \pm 0.00$
TL-ITTG-06	$1.82 \times 10^8 \pm 1.52 \times 10^{7b}$	$123.71 \pm 2.06^b$	$56.80 \pm 2.47^{ab}$	$0.46 \pm 0.01$	$43.44 \pm 0.39$
A1	$1.54 \times 10^8 \pm 1.98 \times 10^{7bcd}$	$116.49 \pm 2.47^c$	$55.00 \pm 1.78^b$	$0.47 \pm 0.00$	$41.20 \pm 0.51$
A3	$1.25 \times 10^8 \pm 1.35 \times 10^{7e}$	$119.59 \pm 1.82^c$	$55.20 \pm 2.78^{ab}$	$0.46 \pm 0.01$	$41.84 \pm 0.37$
CAS-AaL-02	$2.13 \times 10^8 \pm 1.90 \times 10^{7a}$	$123.71 \pm 0.24^b$	$56.50 \pm 1.38^{ab}$	$0.45 \pm 0.01$	$42.67 \pm 0.04$
CAS-AaL-04	$1.32 \times 10^8 \pm 1.56 \times 10^{7de}$	$123.71 \pm 0.93^b$	$58.80 \pm 2.01^a$	$0.45 \pm 0.01$	$42.67 \pm 0.16$

De los tres tratamientos previos dados a la melaza, se obtuvo mejor resultado con una presión de 10psia por 10 minutos, ya que no presentó contaminación a las

48h y la concentración de azúcares reductores aumentó. El pH se mantuvo constante en los tres tratamientos aplicados. Con respecto a los °Brix, hubo el aumento de 1°Brix en este tratamiento. Dentro de ellos se pudo encontrar azúcares fermentables como glucosa, fructosa y mayoritariamente sacarosa, estos azúcares fueron cuantificados por la curva generada con el HPLC (Anexo D).

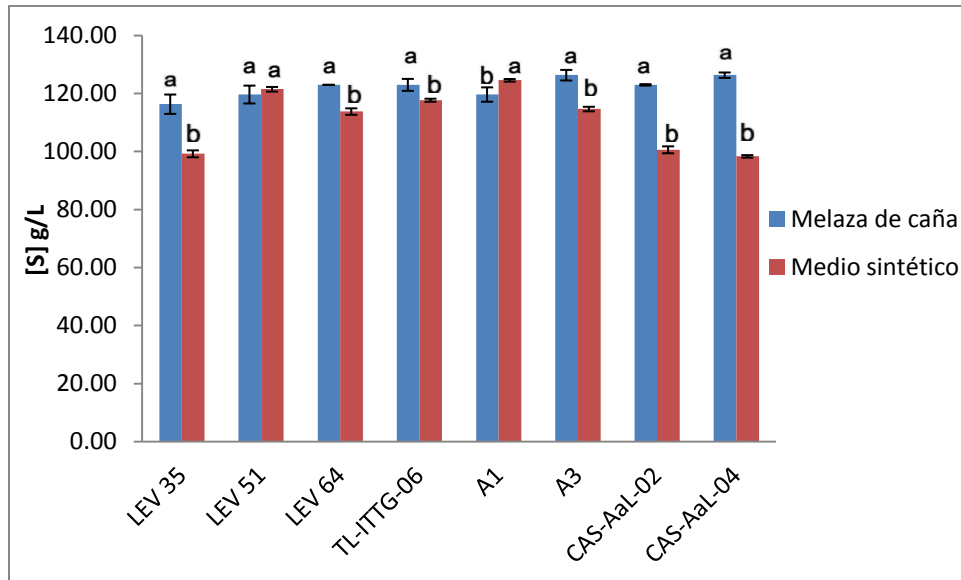
Los resultados obtenidos con respecto al consumo de sustrato en medio natural, demostraron que no existió diferencia estadísticamente significativa entre las ocho cepas, sin embargo comparando el consumo de sustrato con respecto al medio sintético (figura 21), se evidencia que si existió diferencia estadísticamente significativa por las levaduras a excepción de la cepa LEV 51. Cabe mencionar que la concentración de sustrato residual en el medio natural fue muy elevada, 162.02 g/L para LEV 51 y 166.18 g/L para las demás cepas. Peña y Arango, (2009), reportaron una concentración de sustrato residual superiores a 180 g/L, sin embargo fue en un tiempo de 30h de fermentación.

Este comportamiento podría deberse a que cuando se trabaja con concentraciones de azúcar muy altas, se observa una deficiencia respiratoria en la levadura y por lo tanto un descenso de la velocidad de fermentación. De la misma forma la baja concentración puede frenar el proceso. La deficiencia respiratoria se debe al efecto inhibitorio por sustrato, el cual tiene efecto sobre la velocidad específica de crecimiento de las células de levadura (Esteva, 2009).

Esta pobre eficiencia en el consumo de azúcares indica que existen condiciones fisiológicas o ambientales adversas. Según algunos autores esta baja en el consumo de azúcares se debe a muchos factores: Altas concentraciones de etanol, temperaturas extremas, deficiencia de algún tipo de nutriente, toxicidad de ácidos grasos, falta de agitación, falta de oxigenación, altas concentraciones de SO<sub>2</sub>.

La combinación de algunos de estos factores, provocan una mayor inhibición del crecimiento y por lo tanto, de la fermentación (Nieto, 2009).

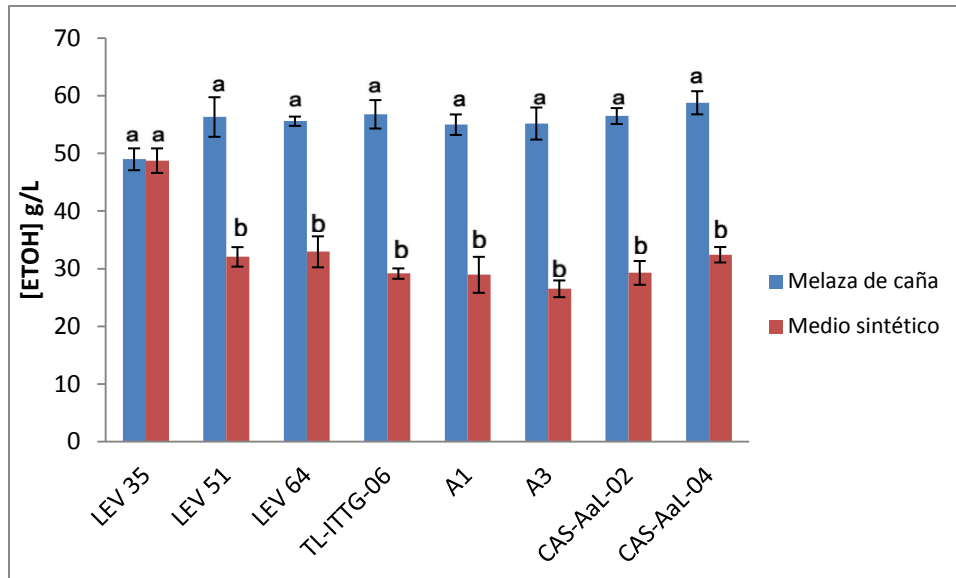




**Figura 21.** Concentración de azúcar consumido en melaza de caña y en medio sintético a las 48h de fermentación

Si se comparan los sustratos utilizados, melaza y medio sintético se puede observar que hubo una mayor producción de etanol cuando se utilizó melaza de caña (figura 22), esto se le atribuye a la concentración de etanol se incrementa con el aumento de la concentración de azúcar, sin embargo se debe de tener una concentración optima de azúcar para no causar inhibición por el alto contenido de sustrato. Los resultados obtenidos demuestran que la levadura que obtuvo mejor producción en etanol fue la denominada CAS-AaL-04 con  $58.8 \pm 2.01$  g/L y la de menor producción fue la cepa LEV 35 con  $49.00 \pm 1.90$  g/L.

En la figura 22 se puede observar que existió diferencia estadísticamente significativa en la producción de etanol por siete de las cepas, menos de LEV 35, quien obtuvo un valor similar al obtenido en medio sintético.

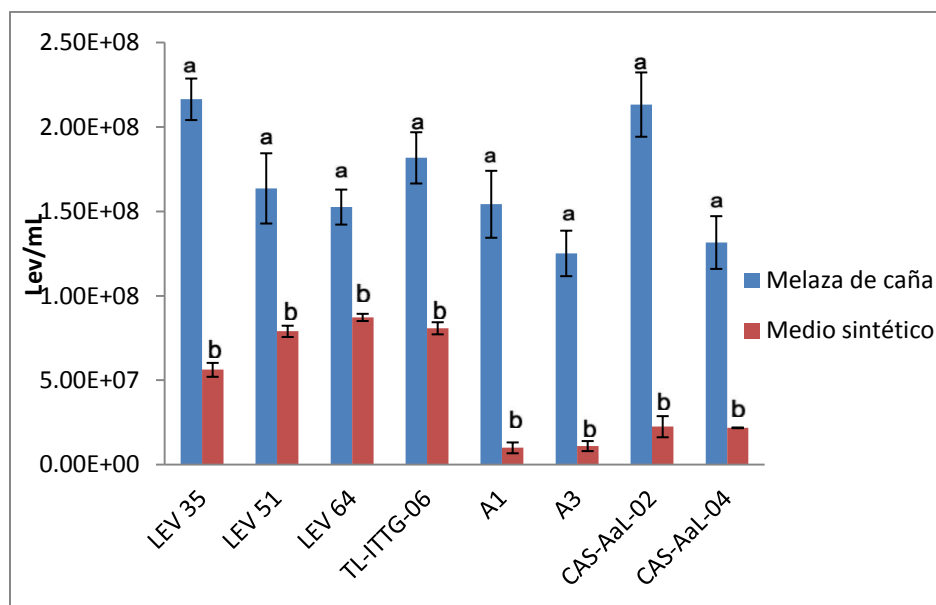


**Figura 22.** Producción de etanol en melaza de caña y en medio sintético a las 48h de fermentación

Los resultados obtenidos con respecto a la producción de biomasa en el medio a base de melaza de caña, comparados con los obtenidos en el medio sintético (figura 23), se observa que hay un incremento de un ciclo logarítmico en el medio natural en todas la cepas evaluadas.

El mayor crecimiento celular se dio por la cepa LEV 35 con  $2.16 \times 10^8$  Lev/mL, este crecimiento podría justificar por qué la producción de etanol fue menor en esta cepa.

El aumento en la producción de biomasa podría atribuirse a que la cantidad de azúcares fue mucho mayor en el medio natural, así como también porque la melaza es un medio complejo que contiene otros compuestos como minerales, entre ellos calcio, magnesio, fósforo y potasio, los cuales pudieron haber favorecido al crecimiento celular (Fajardo y Sarmiento, 2007)



**Figura 23.** Producción de biomasa en melaza de caña y en medio sintético a las 48h de fermentación

Por otro lado se comparó el rendimiento de producto en sustrato ( $Y^P/s$ ) obtenido por parte de todas la cepas en el medio sintético con las fermentación hechas en el medio natural (melaza). Estos rendimientos aumentaron en la mayoría de las levaduras a excepción de la cepa LEV 35, quien no hubo diferencia entra un medio y otro. Lo que afirma que el medio natural es un sustrato más complejo rico en nutrientes pero tendría que buscarse las condiciones óptimas para la producción de etanol. De esta manera se resalta que la concentración de melaza no puede ser tan alta por que puede inhibir el crecimiento y la producción de etanol.

Los rendimientos de etanol para las cepas LEV 35, LEV 51, LEV 64, TL-ITTG-06, A1, A3, CAS-AaL-02 y CAS-AaL-04 bajo la influencia del medio melaza fueron 0.41, 0.43, 0.45, 0.45, 0.47, 0.46, 0.457 y 0.47 respectivamente. Dichos rendimientos son similares o ligeramente superiores a los reportados por Peña y Arango (2009) para *Saccharomyces cerevisiae* con un valor de 0.4105 al estar cultivada en melaza con 270 g/L de fuente de carbono.

## 7. CONCLUSIONES

De las ocho levaduras evaluadas, las cuatro aisladas de la taberna, resultaron ser más resistentes a altas concentraciones de glucosa, así como también más resistentes a las concentraciones de etanol evaluadas.

En la prueba de degradación de diferentes azúcares, se observó que las ocho levaduras degradaron glucosa, fructosa y sacarosa, lo cual nos indica que las ocho levaduras poseen la enzima invertasa ya que esta hidroliza la sacarosa para después asimilarla.

En la producción de etanol en medio sintético la mejor productora de etanol fue la cepa LEV 35 con  $48.76 \pm 2.13$  g/L y en el medio natural fue la cepa CAS-AaL-04 con  $58.8 \pm 2.01$  g/L. En medio sintético, las ocho levaduras presentaron una buena eficiencia de conversión de sustrato, al obtener valores de 99%, mientras que en medio natural se obtuvieron valores entre 40 y 45%.

De acuerdo a los resultados obtenidos, al comparar estadísticamente la producción de etanol y biomasa, se observó que aumentó significativamente en el medio natural (melaza de caña) con respecto al medio sintético, sin embargo las concentraciones de sustrato residual resultaron ser muy elevadas.

La obtención de etanol a partir de melaza de caña representa una alternativa viable para el aprovechamiento de materias primas de bajo valor comercial de una manera más sustentable permitiendo a la sociedad un mejoramiento socioeconómico, sin embargo es necesario optimizar el proceso de fermentación para así obtener rendimientos más eficaces.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Alcántara Hernández RJ, Rodríguez Álvarez JA, Valenzuela Encinas C, Miceli FA, Castañón González H, Marsch R, Ayora Talavera T y Dendooven L, 2010. The bacterial community in taberna a traditional beverage of Southem México, J, *Appl. Microbiol.*, N° 5, 558-63.
- Ariza, B. y González, L., 1997. Producción de Proteína Unicelular a partir de levaduras y melaza de caña como sustrato. *Tesis de pregrado. Bacteriología*. Bogotá, Colombia.
- Bonilla Salinas, M. y otros, 1995. Isolation and identification of killer yeast from sugarcane molasses.. *Letters in Applied*, N° 2, pp. 115-116.
- Brown, A. D. y Simpson, J. R., 1972. Water relations of sugar-tolerant yeast: the role of intrecellular poliols.. *Gen. Microbiol.*, N° 72, pp. 589-591.
- Buitrago Estrada, J. C. y Tenjo Camacho, D. G., 2007. *OBTENCIÓN DE UN SUSTRATO FERMENTABLE DE ORIGEN VEGETAL Y SU EVALUACIÓN CON CÉLULAS LIBRES DE Saccharomyces cerevisiae.*, Bogota, Colombia.
- Cabrera, S. L.; Gómez, A. A.; Martínez, A. y Quintero, R. 2000. Biocombustibles a partir de recursos lignocelulósicos: estudio del caso, bagazo de caña en México, Centro de Investigación en Biotecnología-UAEM, Instituto Mexicano del Petróleo, Instituto de Biotecnología-UNAM. 21 pp.
- Carballo, F., 2000. Microbiología industrial: Microorganismos de interés industrial. España: Acribia, pp. 20-31.
- Casas Alcantarilla, E., 1999. Microorganismos responsables de alteraciones en alimentos azucarados. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.
- Castaño, S. C. G. y Londoño, C. H., 2009. *ESTUDIO COMPARATIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL ENTRE Saccharomyces cerevisiae silvestre, Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 Y Candida utilis ATCC 9950*, Pereyra.
- Damas Buenrostro, L. C., 2010. *Uso de levaduras industriales*.
- Erasmus DJ, van der Merwe GK, van Vuuren HJJ. (2003) "Genome wide analyses, metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress". *FEMS Yeast Res.* **3**:375-399.

- Esteva Gutiérrez, S., 2009. *OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DEL MANGO CRIOLLO DEL ITSMO DE TEHUANTEPEC*. Universidad del Itsmo, Oaxaca.
- Fajardo, E. E. y Sarmiento, S. C., 2007. *Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae*. Pontifica Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Básicas.
- Farreyra, M. M., 2006. *Estudio del proceso biotecnologico para la elaboración de una bebida alcoholica a partir de jugo de naranja*. Valencia., España.
- Fleet, G., (1992). Spoilage yeasts. *Rev. Biotech.* N°12, pp. 1-44.
- Folch Mallol, J. L., Garay Arroyo, A., Lledías, F. y Covarrubias Robles, A. A., 2004. La respuesta al estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 46(1-2), pp. 24-46.
- Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C. y Gombert, A., 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potencial. *Appl. Microbiol Biotechnol*, N° 79, pp. 339-354.
- Gibson, B. R. y otros, 2007. Yeast responses to stresses associatedwith industrial brewery handling. *FEMS*, pp. 535-569.
- Haenh, H., 1991. *Bioquímica de las fermentaciones*, España.
- Ingram, L. O. y Butke, T., 1989. *Adv. Microbiol. Physiol.* N° 25, p. 256.
- Jagnow, H. y Dawid, W., 1991. *Bioteconología: Introducción con experimentos modelos*. Zaragoza: Acribia S.A..
- Jurado López, S. E. y Sarzosa Pazmiño, X. S., 2009. *Estudio de la cadena agroindustrial de la cabuya en la producción de miel y licor de cabuya*. Quito, Ecuador:
- Lara Hidalgo CE, Moreno Suárez ST. y Rodríguez Vázquez SA, 2012. Optimización de la elaboración de una bebida espirituosa empleando como materia prima a los destildos de la fermentación de mieles de Agave americana L. y levaduras autóctonas. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
- Lehninger, A. L., 1981. *Bioquímica: Las bases moleculares de la estructura y función celular*. 2a. ed. Ed. Bercelesona: Omega.

- Mariscal Moreno, J. P., 2011. *Evaluación y selección de microorganismos para la producción de etanol a nivel industria.* , Manizales, Colombia.
- Medina, C. M., Sánchez, M. M., Aldama, T. F. y Comas, R. C., 1999. Algunas consideraciones sobre la tolerancia alcohólica en levaduras. *Revista Avanzada Científica IDICT.*
- Miranda, G., Ventura, J., Suárez, S. y Fuertes, C., 2007. ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTIOXIDANTE DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN DE MAILLARD DE LOS SISTEMAS DE MODELO D-GLUCOSA- GLICINA Y D-GLUCOSA- L-LISINA. *Revista Social Química* , 73(4), pp. 215-225.
- Mittal, G. 1992. Food biotechnology: techniques and applications. Pennsylvania, USA. Technomics Publishing Company. p. 245-305.
- Moreno Suárez, S. T. y Rodríguez Vázquez, S. A., 2012. *Optimización de la elaboración de una bebida espirituosa empleando como materia prima a los destildos de la fermentación de mieles de Agave americana L. y levaduras autóctonas.* Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
- Miller, G. L., 1959. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, pp. 31-426.
- Muller, L. E., 1964. *Manual de Laboratorio de Fisiología Vegetal*, Turrialba, Costa Rica.
- Myers, D. K., Lawlor, D. y Attfield, P. V., 1997. Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with a high sugar concentration by *S. cerevisiae*. *Appl. Environ Microbiol*, N° 1, pp. 145-150.
- Nahvi I. Emtiza G. y Alkabi L, 2002. Isolation of a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* and investigation of its performance in the fermentation of beet molasses to ethanol. *Biomass ang Bioenergy*. Volumen 23, pp. 481-186.
- Nieto Galarza, H. O., 2009. Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae* y jugo de caña de azúcar como sustrato para obtener etanol. Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la Vida, Ingeniería en Biotecnología.

- Oviedo Zumaque, L., Lara Mantilla, C. y Mizger Pantoja, M., 2009. Levaduras autóctonas con capacidad fermentativa en la producción de etanol a partir de pulpa de excedentes de plátano Musa (AAB Simmonds) en el departamento de Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana Bioetanol*, XI(1), pp. 40-47.
- Pelczar, M. J. y Reid, R., 1993. Microbiología. Segunda ed. México. Editorial McGraw-Hill, capítulo 16, pp. 271-286.
- Peña, C. y Arango, R., 2009. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL UTILIZANDO CEPAS RECOMBINANTES DE *Saccharomyces cerevisiae* A PARTIR DE MELAZA DE CAÑA. *Dyna*, 79(159), pp. 153-161.
- Petrenko, O., 2005. Estudio de algunas características de las cepas de levaduras y de su rendimiento celular utilizando un medio de cultivo a base de suero lácteo, Belgrado.
- Pina C., Santos C., Cout JA., Hogg T., 2003. Ethanol Tolerance of Five non-*Saccharomyces* Wine Yeast in Comparison with a Strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Influence of Different Culture Conditions. *Food Microb.* 21: 439-447.
- Ramírez Nieto, G. M. y Pedroza Flores, J. F., 2001. *Desarrollo de una fermentación alcohólica a pH regulado y temperatura de 25°C en el biorreactor bioflo 3000 M1227 y estudio inicial de fermentaciones en sistema continuo..* Bogotá, Colombia.
- Regodón Mateos JA, 2000. Obtención y caracterización de cepas autóctonas de levaduras para la elaboración estandarizada de vinos de calidad. Universidad de Extremadura, Dpto. de Biología y Producción de los Vegetales.
- Rodríguez Álvarez JA (2008). La taberna como Probiótico. Tesis profesional para la licenciatura de Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Chiapas, México.
- Salcedo Cárdenas, M. E., 2008. Aislamiento y selección de levaduras fermentadoras de melazas de caña (*Saccharum officinarum*), Morelia, Michoacán.
- Salmerón, I., 2011. *CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE Saccharomyces cerevisiae*, Chihuahua, México.



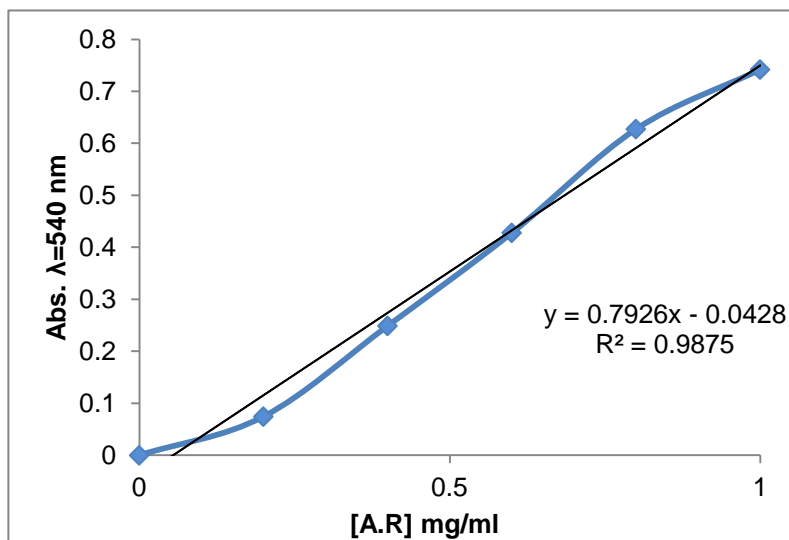
- Samaniego Peña, H., 2006. Valorización de efluentes de decapado ácido metálico. Recuperación de Zinc. Universidad de Cantabria, Departamento de Ingeniería Química y Química Inorgánica.
- Santillan Valverde, M. d. C. y Garcia Garibay, M., 1998. Biosíntesis de congenéricos durante las fermentaciones alcohólicas. *Revista Latinoamericana Microbiológica*, N° 40, pp. 109-119.
- Sarmiento A., Herrera J., 2003. Obtención y caracterización de un banco de levaduras con potencial aplicación probiótica. Trabajo de grado (Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Seo, H.-B., 2008. Measurement of ethanol concentration using solvent extraction and dichromate oxidation and its application to bioethanol production process. *J. Ind Microbiol Biotechnol*, pp. 285-292.
- Stewart G y Russell I., 1998. An introduction to brewery science and technology. Series III. Brewer's yeast. The Institute of Brewing, 33 Clarges street, London W1Y8EE, England.
- Tellez, D., 2004. Caracterización de las melazas empleadas en el proceso fermentativo de la destilería San Martín-Industria de Licores del Valle.. Universidad del Valle. Facultad de Salud. Escuela de Bacteriología y Laboratorio clínico.
- Tomasso, M., 2004. OSMOTOLERANCIA. pp. 2-15.
- Tomasso, M., 2004. TOLERANCIA DE LAS LEVADURAS AL ETANOL. pp. 1-22.
- Tuite, M. y Oliver, S., 1991. *Saccharomyces*. Plenum Press. New York, Estados Unidos. pp. 250-255.
- Uribe Gutiérrez Liz A., 2007. Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de Mora. Trabajo de grado (Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Vanegas, M. y Zapata Pineda, M., 2005. Aislamiento de levaduras capaces de producir alcohol a partir de macrofitas acuáticas extraídas mecánicamente de la laguna de Fúquene, Bogotá, Colombia.

- Vázquez H., Dacosta O., 2007. Fermentación alcohólica: una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería, Investigación y Tecnología VII(4)*. pp.249-259.
- Vela Arévalo, V., Rodríguez Feliciano, M. Á., Hernández Balboa, M. Á. y Valdez Enríquez, V. H., 2004. Propuesta de un método económico para la cuantificación de alcohol etílico. *Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica A.C*, 29(1), pp. 1-2.
- Villarreal, F., 2006. *Hongos y Levaduras*. [En línea] Available at: <http://es.scribd.com/doc/17103590/hongos-y-levaduras> [Último acceso: 02 Abril 2013].
- Zumbado Rivera, W., Esquivel Rodríguez P., Wong González E., 2006. Selección de una levadura para la producción de biomasa: Crecimiento en suero de queso. *Agronomía Mesoamericana*. N° 17, pp 151-160.

## 9. ANEXOS

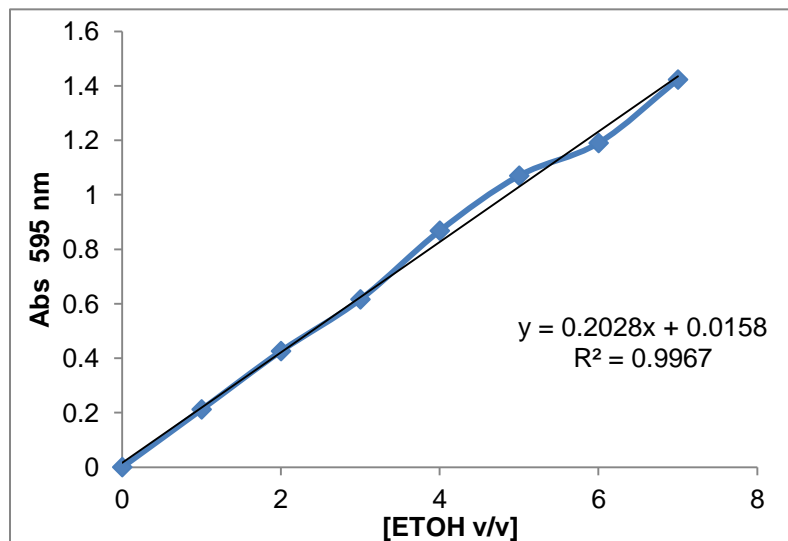
### ❖ Anexo A. Curva patrón de azúcares reductores

[A.R] mg/mL	ABS Promedio
0	0±0
0.2	0.0745±0.0007
0.4	0.249±0.0042
0.6	0.428±0.0014
0.8	0.6275±0.0007
1	0.742±0.0028



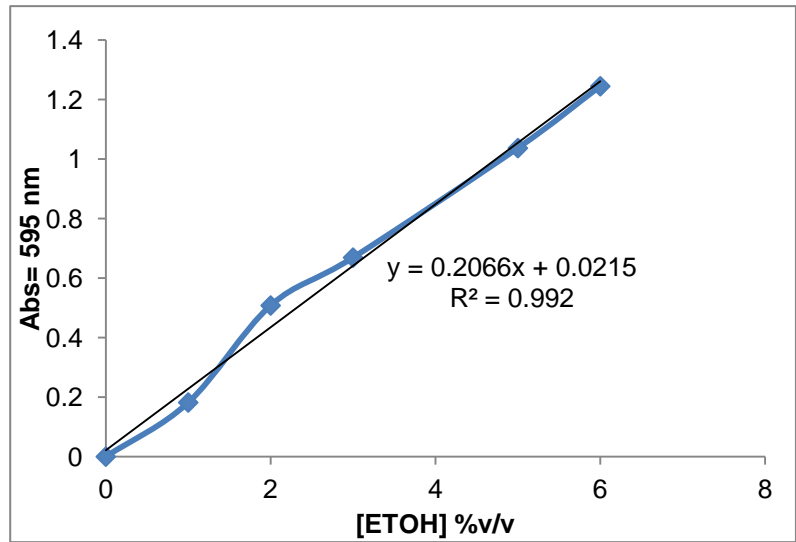
### ❖ Anexo B. Curva patrón de etanol (cuantificado por oxidación con dicromato de potasio) en medio sintético

[ETOH] v/v]	Abs
0	0±0
1	0.212±0.0012
2	0.426±0.0023
3	0.616±0.0031
4	0.868±0.0009
5	1.07±0.0017
6	1.19±0.0021
7	1.423±0.0016



❖ Anexo C. Curva patrón de etanol (cuantificado por oxidación con dicromato de potasio) en melaza de caña

[ETOH]% v/v	Abs
0	0±0
1	0.182±0.0021
2	0.508±0.0022
3	0.669±0.0042
5	1.037±0.0017
6	1.245±0.0010



❖ Anexo D. Correlación entre °Brix y Azúcares fermentables por HPLC

[A.F] g/L	°Brix
0	0
80.59	7.5
105.05	10
154.21	15

