



Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.



Ingeniería Bioquímica

REPORTE DE RESIDENCIA PROFESIONAL

“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PRODUCTIVA DE ETANOL DE 4 LEVADURAS AISLADAS DE LA “TABERNA”

PRESENTA:

Trujillo Jiménez Carlos Alberto

ASESORA:

M.C. Lucía María Cristina Ventura Canseco

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS; a 9 de enero de 2013

ÍNDICE

1. Introducción.....	4
2. Justificación.....	5
3. Objetivos.....	5
3.1 Objetivo general.....	5
3.2 Objetivos específicos.....	5
4. Caracterización del área de trabajo.....	6
5. Problemas a resolver.....	6
6. Alcances y limitaciones.....	7
7. Fundamento teórico.....	7
7.1 <i>Acrocomia aculeata</i>	7
7.1.1 Descripción.....	7
7.1.2 Taberna.....	7
7.1.2.1 Definición y propiedades.....	8
7.1.2.2 Proceso de obtención.....	8
7.1.2.3 Condiciones de fermentación.....	9
7.1.2.4 Microorganismos involucrados en la fermentación.....	10
7.2 Levaduras.....	11
7.2.1 Características morfológica.....	11
7.2.2 Características bioquímicas y fisiológicas.....	12
7.2.3 Composición química.....	13
7.2.4 Requerimientos nutricionales.....	13
7.2.5 Factores de estrés que afectan al crecimiento de una levadura.....	14
7.2.5.1 Osmotolerancia.....	14
7.2.5.2 Tolerancia a etanol.....	16
7.2.6 Fenotipo killer.....	18
7.2.7 Azúcares fermentables.....	19
7.2.8 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
7.3 Fermentación alcohólica.....	23
7.3.1 Condiciones a medir y controlar en el proceso de fermentación.....	26
7.3.2 Limitantes de la fermentación.....	27
7.4 Producción de etanol.....	28
8. Procedimiento y descripción de las actividades realizadas.....	29
8.1 Microorganismos.....	29
8.1.1 Reactivación.....	29
8.1.2 Resiembra.....	29

8.1.3 Preparación del inóculo.....	29
8.2 Determinación de biomasa.....	29
8.2.1 Cuenta al microscopio.....	30
8.2.2 Densidad óptica.....	30
8.3 Cuantificación de etanol.....	30
8.3.1 Método del dicromato de potasio.....	31
8.3.2 Destilación y uso del densímetro.....	31
8.4 Caracterización de levaduras.....	31
8.4.1 Osmotolerancia.....	31
8.4.2 Tolerancia a etanol.....	31
8.4.3 Efecto killer.....	31
8.4.4 Degradación de carbohidratos.....	31
8.4.5 Cinética de crecimiento y producción de etanol.....	31
9. Resultados y discusiones.....	32
9.1 Prueba de osmotolerancia.....	32
9.2 Prueba de tolerancia a etanol.....	37
9.3 Fenotipo killer.....	41
9.4 Degradación de carbohidratos.....	42
9.5 Cinética de producción de etanol.....	43
10. Conclusiones y recomendaciones.....	45
11. Anexos.....	46
12. Referencias bibliográficas.....	47

1. INTRODUCCIÓN

Desde el 2008 en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, se inició con el estudio de la fermentación, aislamiento e identificación de los diferentes microorganismos que participan en la fermentación alcohólica de la taberna, hasta hoy en día se han identificado cuatro diferentes cepas de *S. cerevisiae*, denominadas cepa 35, 51, 64 y TL-ITTG-06. Actualmente el trabajo de identificación molecular sigue en desarrollo.

La taberna es una bebida natural 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 alcohólica que se da en ella por la presencia de distintos tipos de microorganismos tales como levaduras (Rodríguez, 2008). En Chiapas, los principales centros taberneros se localizan específicamente en la región de la Frailesca, Centro y el Soconusco (Zuart, 1999).

Hasta hoy en día aun no ha sido estudiada la capacidad fermentativa que posee este consorcio microbiano de levaduras autóctonas de la taberna para producir 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, razón por la cual se realizaron pruebas de osmotolerancia y tolerancia etanol para cada microorganismo; así como también el efector killer.

El bioetanol, producto de fermentación alcohólica de diversos materiales orgánicos a través de la acción de microorganismos, está siendo nuevamente considerado luego de la elevación de los precios del petróleo.

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 bioetanol y a que se separan mejor después de la fermentación. Dentro de las especies más utilizadas está *Saccharomyces cerevisiae*.

En este trabajo se pretende encontrar a la mejor levadura fermentativa aislada de la “taberna” utilizando un medio sintético específico para la producción de etanol, así como también conocer los diferentes parámetros cinéticos de cada microorganismo.

2. JUSTIFICACIÓN

La energía es un recurso indispensable en el desarrollo de las actividades que realiza el hombre. La utilización del petróleo como fuente de energía es una amenaza continua puesto que este es un recurso no renovable y difícil de conseguir, por el contrario, el uso de etanol como fuente de energía se ha convertido en un tema amplio de investigación mundial, y su producción ha aumentado notablemente en los últimos años. La demanda de etanol para ser usado como combustible pasa de 19 billones de litros en el 2000 a 22 billones de litros en el 2004 (Enríquez, 2005; Cadena Agroindustrial, 2004).

El etanol ofrece diversas ventajas sobre los derivados del petróleo, como son: menores precios de las importaciones, disminución en el costo del combustible, apoyo a producciones agrícolas, mejoramiento de las situaciones económicas y sociales en las zonas rurales, mayor seguridad energética y reducción de la contaminación, puesto que se ha comprobado que en términos de generación de gases invernaderos, el etanol reduce la producción de estos gases en un 10 ó 15 % de los que se 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 (Pérez, 2007).

Por ello se hace necesario realizar un estudio comparativo para la producción de etanol, de las levaduras previamente aisladas de la taberna (*Saccharomyces cerevisiae*); debido a que este microorganismo ha sido estudiado ampliamente por su alta eficiencia en la fermentación alcohólica; volviendo rentable la producción de etanol mediante una vía microbiana, conduciendo así al desarrollo de energía renovable.

3. OBJETIVO GENERAL

- ❖ Evaluar la capacidad productiva de etanol y biomasa de cuatro diferentes levaduras aisladas de la “taberna”, empleando un medio de cultivo sintético.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Evaluar la capacidad de crecimiento celular a concentraciones elevadas de sustrato (osmotolerancia).
- ❖ Evaluar la capacidad de crecimiento celular a diferentes concentraciones de etanol (tolerancia a etanol).
- ❖ Identificar el fenotipo killer en cada una de las levaduras.

- ❖ Determinar los parámetros cinéticos de velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1}), tiempo de duplicación t_d (h) y velocidad máxima de crecimiento $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1}) de cada levadura.
- ❖ Evaluar de la producción de etanol a nivel matraz, empleando un medio de cultivo sintético.

4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO

El proyecto se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, en los laboratorios de Investigación y en el laboratorio de microbiología del Polo Nacional para el Desarrollo de Investigación y Pruebas Analíticas de Biocombustibles. De manera general el Polo Nacional, cuenta con diferentes laboratorios para realizar numerosos tipos de pruebas como cromatografías, espectroscopia infrarroja, análisis de densidad y viscosidad, análisis microbiológicos, así como también laboratorios para la recepción de materia prima.

Específicamente el laboratorio de microbiología del Polo Nacional cuenta con el equipo requerido para realizar el proyecto, tales como un cuarto de inoculación, balanza analítica, agitadoras, reactivos, microscopio electrónico, cámara de Neubauer, equipos Corning para destilación, parrillas de calentamiento, un biorreactor, material de cristalería y estufa de vacío.

Por otro lado el laboratorio de investigación cuenta con reactivos, material de cristalería, espectrofotómetro, cuarto de inoculación, autoclave, vórtex, agitadoras, cámaras de incubación y estufas de secado.

5. PROBLEMAS A RESOLVER

El etanol se perfila como un recurso energético potencialmente sostenible, de alta viabilidad técnica, que puede ofrecer ventajas medioambientales y económicas a largo plazo en contraposición al uso del petróleo, éste se obtiene a partir de fuentes vivas como microorganismos, los cuales realizan la fermentación de azúcares.

Se ha comprobado que la cantidad de gases emitidos usando etanol son menores que los que se producen con la gasolina, la cual, actualmente contiene 10% de etanol, para reducir la contaminación (Mancheno, 2006; Gonzales, 2007).

6. ALCANCES Y LIMITACIONES

Una de las limitantes que se encontró en este trabajo fue, que debido a que no se pudo estandarizar la técnica para identificar el fenotipo killer, estos resultados no se pudieron reportar.

La destilación y uso del densímetro ya no se utilizaron, debido a que se logró estandarizar la técnica de oxidación del etanol con dicromato de potasio, utilizando un solvente para su extracción (fosfato de tributilo), para cuantificar etanol.

7. FUNDAMENTO TEÓRICO.

7.1 *Acrocomia aculeata*

7.1.1 Descripción

A. aculeata es una palma que alcanza una altura de aproximadamente de 15 m y 40 cm de diámetro, se caracteriza por tener en su tallo espinas negras que pueden llegar a alcanzar los 7cm de longitud y que se disponen principalmente en la parte superior del mismo; presente hojas pinnado compuestas y las flores se encuentran en una panícula (Figura 1). Los frutos son nueces globosas, ligeramente comprimidas, su cascara es amarillenta verdosa, dura y delgada; la pulpa es muy fibrosa y escasa, de color pardo amarillenta, la cubierta de la semilla es de color negro, también dura, contiene un endospermo, el cual es rico en aceite. Fructifica de septiembre a noviembre (Miranda 1975). Como otras palmas, esta especie es perennifolia (presenta hojas durante todo el año), pero las hojas viejas no caen inmediatamente, permaneciendo colgadas por un tiempo más o menos largo, lo que da impresión de que la palma se está secando (Mc Currach, 1977). Esta palma se encuentra distribuida a lo largo de la planicie costera del Golfo de México y del Pacífico; en Chiapas, se encuentra específicamente en la región de la Frailesca, Centro y el Soconusco (Zuart, 1999).

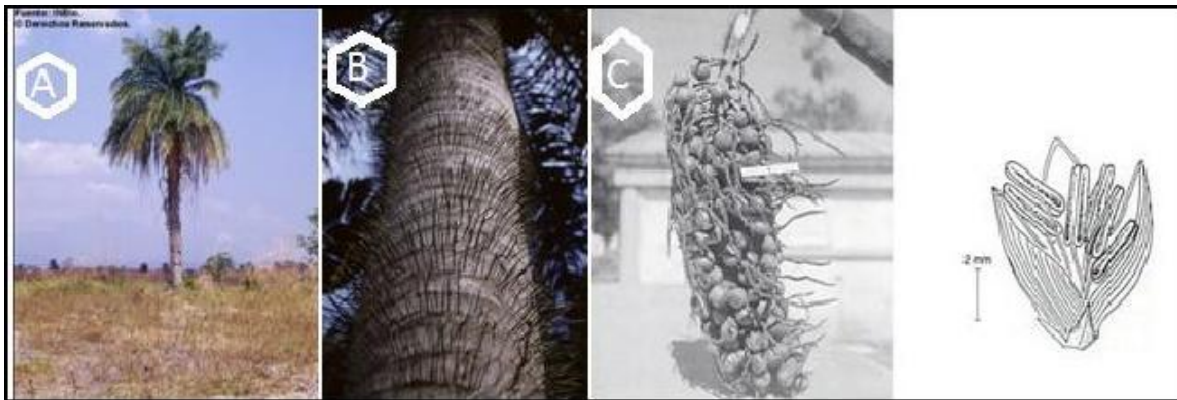


Figura 1. A) *Acrocomia aculeata* o palma de coyol. B) detalle de las espinas del tallo. C) detalle de los frutos

7.1.2 Taberna

La taberna es obtenida de la palma *Acrocomia aculeata* mejor conocida como palma de coyol. Su nombre deriva del Náhuatl “coyoli”, que significa “cascabel” y antiguamente

se le conocía como “cuauhcoyolli” o sea árbol de cascabeles, ya que al agitar el fruto fresco, éste produce un sonido semejante (Cabrera, 1991). *A. aculeata* es conocida como “coyol” en Sinaloa, Yucatán y norte de Chiapas, como “coquito y coyol” en Oaxaca, Veracruz y en el centro y costa de Chiapas, así como “map” en San Luis Potosí. En México, la “taberna” es una bebida tradicional producida por la fermentación natural de la savia de la palma de coyol (*Acrocomia aculeata*) misma que se asemeja al “vino de palma” de África (Alcántara *et al.*, 2010), esta es consumida en gran parte de la población de las regiones de la sierra madre de Chiapas.

Es una bebida alcohólica, blanca, ligeramente espesa y sobre todo muy refrescante. Se obtiene de la fermentación espontánea de la savia del tallo de la palma de coyol en los meses de marzo y abril cuando el calor es sofocante y se requiere de bebidas frescas, incluso se le atribuye propiedades medicinales para desinflamar, cicatrizar úlceras, tratamientos de vesículas, próstata y como laxante (*vox populi*).

Estas propiedades “curativas” de la taberna no son de sorprender ya que otras bebidas fermentadas también son empleadas para beneficios similares principalmente con los relacionados con el sistema digestivo o como un suplemento alimenticio, ya que contienen proteínas, vitaminas y un bajo contenido de grasas, además de que la fermentación que producen son láctica, alcohólica y acética, contando con la presencia de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y bacterias de las especies de *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. Los efectos de la “taberna” pueden incluir mareo y debilitamiento, este último se caracteriza por que quien la ingiere no puede sostenerse en pie aun cuando se sienta sobrio.

7.1.2.1 Proceso de obtención de la “taberna”

La “taberna” se extrae de los árboles adultos, esto quiere decir que la palma debe de tener una edad de 15 años como mínimo para que llegue el momento en que se pueda cortar para la extracción del líquido. Las palmas que pueden ser maniobradas en posición horizontal son elegidas para el corte. Esto es necesario para permitir el máximo flujo de savia (Figura 2).



Figura 2. Tallos de la palma de coyol para la obtención de la taberna

El proceso para producir la taberna consiste en tirar la palma de coyol arrancándola desde la raíz, se le quita todas las hojas y en la parte del “cogollo” (palmito) se le hace una incisión en forma rectangular de 10 cm de profundidad, ésta es denominada canoa (Figura 3) y se espera a que brote la savia del árbol. Es importante no cortar demasiado por debajo del palmito, ya que esto limita el flujo máximo de la savia, la cavidad hay que cubrirla con un pedazo de tela o cartón para dejar que el líquido brote, la savia se recoge dos veces al día de la mayoría de los árboles, el flujo de la savia de las palmeras recién cortadas es tan fuerte que la recolección puede llegar hasta tres veces durante los primeros días. Este líquido es de agua-miel dulce con sabor a agua de coco que se fermenta rápidamente. Es necesario vaciar y raspar todos los días esta cavidad para que la savia siga drenado, obteniéndose un promedio de 2 a 4 litros de taberna diarios por cada palma durante aproximadamente dos meses (proceso dependiendo del tamaño del árbol). La savia colectada generalmente se coloca en depósitos en donde continúa la fermentación. La mayoría de los árboles son talados por la mañana, se dejan fermentar naturalmente por 24 horas, éste proceso es conocido como “hirviendo” o “ebullición del vino” (Balik, 1990).



Figura 3. Elaboración de taberna. A) Corte del tallo de *A. aculeata*. B) Canoa de drenaje de la savia.

7.1.2.2 Condiciones de fermentación

El vino de la palma se presenta como un líquido blanquecino por fermentación natural de la savia (Uzogara *et al.*, 1990; Uzochukwuru *et al.*, 1991). La savia sin fermentar es limpia, dulce, es un jarabe incoloro que contiene alrededor de 10 al 12 % de azúcar, de lo cual principalmente es sacarosa (Bassir, 1962; Okafor, 1975). En la fermentación por la flora microbiana natural, el nivel de azúcar disminuye rápidamente a medida que se convierte en alcohol y otros productos (Obire, 2005) mientras que la savia se vuelve de color blanco lechoso debido a que la suspensión microbiana aumenta como resultado del crecimiento prolífico de los organismos fermentadores (Okafor, 1975).

La fermentación del vino de palma se puede describir en tres niveles o como en 3 etapas de fermentación. El primer nivel tiene lugar en el receptáculo de corte en la palma en sí, esto ocurre como un proceso de fermentación de cultivo continuo, aunque el recolector de vino de palma periódicamente perturba la población microbiana en el fermentador biológico (un semi-continuo). El segundo nivel se produce cuando el vino de palma se acumula en el recipiente colocado bajo el árbol. La acumulación de alcohol en el recipiente es más rápido que en el tronco del árbol, porque no hay pérdida del producto, aunque hay dilución continua de los contenidos por el goteo del jugo de la fermentación. El más alto nivel de acumulación de alcohol ocurre durante la distribución y mercadeo. Esta tercera etapa de la fermentación se produce como un proceso por lotes en condiciones más anaeróbicas, que favorecen a la fermentación por las levaduras (Amoa-Awua *et al.*, 2006).

7.2.4 Microorganismos involucrados en la fermentación

El vino de la palma obtenido de la savia de diversas especies de las palmas es una bebida común como en diversas partes de África y Asia (Balik, 1990). La presencia de varios microorganismos especialmente bacterias y levaduras son los responsables de la fermentación del vino de palma, los azúcares en la savia de la palma son metabolizados a alcohol y ácidos orgánicos (Okafor, 1975).

El vino de la palma es producido por la fermentación de la savia de las plantas tropicales de la familia *palmae* y es consumido en grandes cantidades en el sureste de Nigeria. Contiene componentes nutricionales importantes, incluyendo aminoácidos, proteínas, vitaminas y azúcares (Okafor, 1987). Esto hace de este vino un medio verdadero para el crecimiento de un consorcio de microorganismos, cuyo crecimiento, puede modificar las condiciones físico-químicas del vino, dando lugar a la competencia y sucesión de organismos. Muchos trabajos han llevado a cabo estudios destinados al aislamiento de las levaduras y la explotación del vino de palma para su proceso industrial. La producción de etanol portátil y la producción de proteína unicelular.

La savia de la palma se ha demostrado que es un medio rico capaz de soportar el crecimiento de varios tipos de microorganismos, como gran número de mesófilos aerobios, bacterias ácido lácticas, levaduras y bacterias ácido acéticas. Estas fueron encontradas en el vino de palma durante la intervención de los árboles de palma.

Amoa-Awua *et al.* (2006) evaluaron el contenido microbiológico y bioquímico del vino de palma de aceite (*Elaeis guineensis*) determinados durante la intervención y su almacenamiento durante 5 semanas. *Saccharomyces cerevisiae* fue la única especie aislada de las muestras.

7.2 Levaduras

Desde hace tiempo existe un acuerdo general en denominar levaduras a los hongos que presentan predominantemente carácter unicelular. La reproducción vegetativa tiene lugar habitualmente por gemación. Muchos hongos pueden presentar dos fases: miceliar y unicelular. Las levaduras solo se presentan en forma de células aisladas ó como pseudomicelios. Se reproducen por ascosporas o sólo asexualmente por gemación o división binaria. Las características generales de las levaduras por las que se las diferencia entre sí son más bien fisiológicas que morfológicas. En observación microscópica se las distingue a primera vista de las algas por no poseer pigmentación verde, de los protozoos por presentar pared rígida y ser inmóviles, y de las bacterias por presentar un tamaño mucho mayor.

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 a manera de sedimento, otras crecen uniformemente en todo el caldo y otras crecen sólo en la superficie como una película o nata (Pelczar, 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, 1993). La incubación a 30 °C suele ser satisfactoria.

7.2.1 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 μm de ancho por 5 a 30 μm o más de largo. Generalmente son ovoides, si bien algunas son esféricas y otras alargadas (Pelczar, 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 4). 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, 1993).

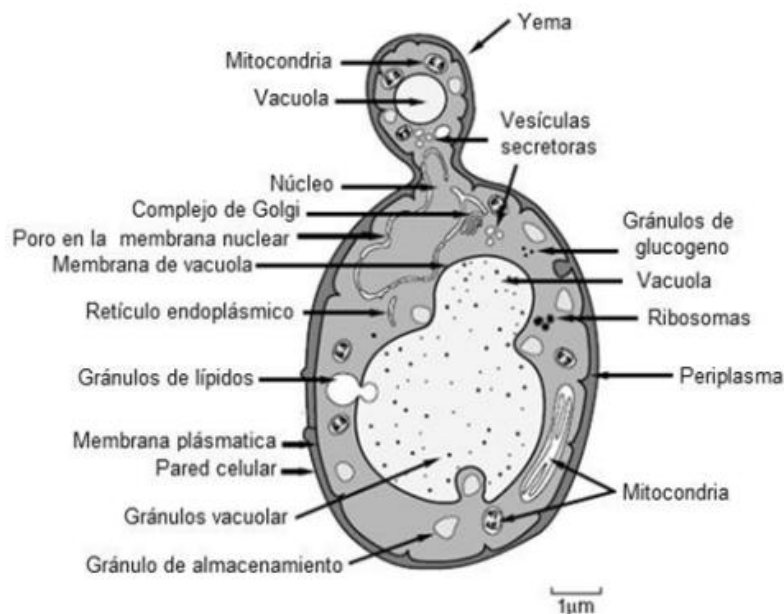


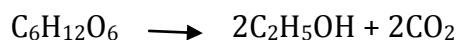
Figura 4. Estructura de una levadura

7.2.3. Características bioquímicas y fisiológicas

Las características morfológicas y sexuales permiten generalmente identificar el género, las características bioquímicas permiten definir la especie de la levadura. 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 de lugar a la acumulación de ácidos y otros productos intermediarios (Pelczar, 1993).

7.2.4 Composición química

Las levaduras contienen un 75% de agua y un 25% de materia seca aproximadamente. La composición seca de la levadura se representa en la tabla 1.

COMPONENTES	PORCENTAJE (%)
Ceniza	7
Carbohidratos	43
Proteínas	48
Grasa	2

Tabla 1. Composición química de las levaduras

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% (Haehn, 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 (Castellanos, 1991). 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).

7.2.5 Requerimientos nutricionales

Para que un organismo crezca es necesario suplirlo con nutrientes y para los microorganismos esto no es diferente. La mayoría de los microorganismos necesita de ambientes específicos y nutrientes complejos para crecer y reproducirse.

Los requisitos nutricionales de un microorganismo, en general, consiste de una fuente de carbono para la síntesis de las moléculas orgánicas y para la obtención de energía,

una fuente de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos y ácidos nucleicos, algunos elementos esenciales como el azufre y fósforo así como otros micronutrientes incluyendo diversos minerales y vitaminas que son importantes cofactores comprendidos en las reacciones bioquímicas. Algunos microorganismos como determinados linajes de *Saccharomyces cerevisiae* y *E. coli* poseen genes que codifican enzimas responsables por la síntesis de factores de crecimiento esenciales y cofactores para los más importantes caminos bioquímicos. Como resultado, ellos tienen la capacidad de producir dentro de la célula, nutrientes esenciales como aminoácidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos, cofactores y vitaminas.

El proceso de fermentación industrial requiere un rápido crecimiento, alta conversión de sustrato en biomasa o en un producto de interés específico originado del metabolismo y bajo costo de materia prima. Fuentes ricas de nitrógeno, como el extracto de levadura, son fuentes adecuadas para el crecimiento de microorganismos debido al contenido de proteína y aminoácidos libres.

7.2.6 Factores de estrés que afectan al crecimiento de una levadura

7.2.6.1 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” (Tilbury, 1976; Jermini *et al.*, 1987; Deak y Beuchat, 1996, citados por 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 estas levaduras (Tilbury, 1976; Jermini *et al.*, 1987; Deak y Beuchat, 1996, citados por 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 arabitól, manitol, arabinitol o glicerol (Fleet, 1992; Deak y Beuchat, 1996; Myers *et al.*, 1997; Praphailong y Fleet, 1997; citados por 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 osmóticos (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 (Myers *et al.*, 1997). Esta concentración intracelular de glicerol parece estar regulada por la a_w externa mediante una ATPasa de membrana (Deak y Beuchat, 1996). La acumulación de este polialcohol puede ser afectada por el tipo de soluto que provoca el descenso de a_w (Golden y Beuchat, 1992a).

Otros factores implicados en la resistencia a elevadas concentraciones de soluto son la composición alterada de la pared y membrana celulares (Praphailong *et al.*, 1997). Puesto que los polioles atraviesan con facilidad las membranas biológicas, en presencia de baja a_w , deben existir variaciones estructurales y/o funcionales en la mismas que les confiera menor permeabilidad al glicerol (Hocking, 1993). 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 preacondicionamiento, 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.

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 (R. 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).

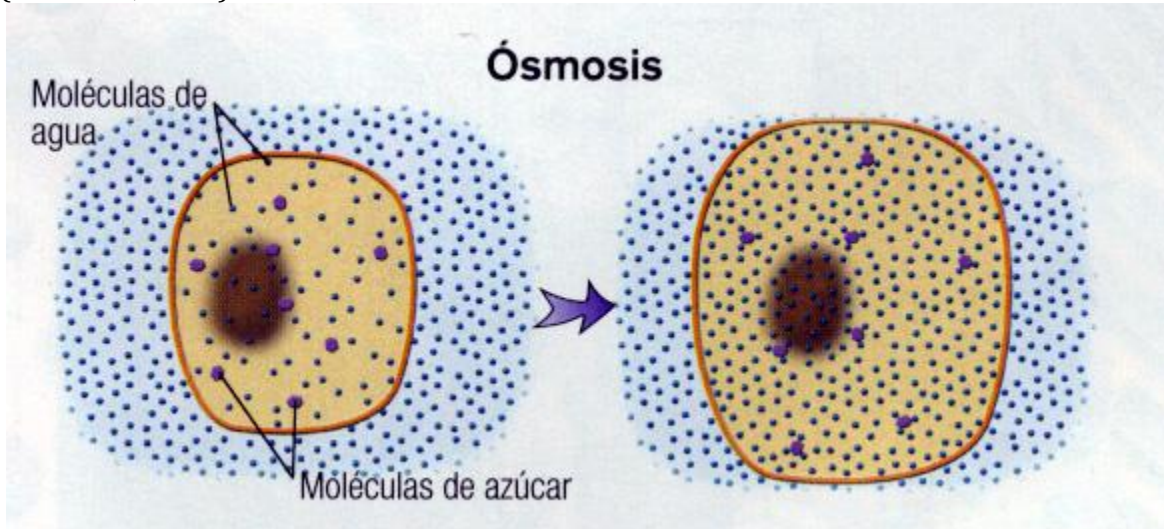


Figura 5. Presión osmótica

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. (Nishino *et al.*, 1985).

7.2.6.2 Tolerancia a Etanol

La conversión de los azúcares en etanol por la acción de los microorganismos es uno de los más antiguos procesos biotecnológicos conocidos por el hombre. Desde hace más de 6000 años las distintas sociedades de nuestro planeta han consumido bebidas alcohólicas producidas por fermentación de fuentes azucaradas variadas. El microorganismo productor más usado es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Es conocido que la actividad fermentativa de todos los organismos productores de etanol declina progresivamente a medida que este 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.

La estabilidad de la membrana citoplasmática como barrera semipermeable es esencial para el crecimiento y la supervivencia en cualquier medio. Los cambios evolutivos en las enzimas no tendrían ninguna consecuencia para la supervivencia en condiciones de estrés ambiental si no fueran precedidos por cambios que asegurasen el mantenimiento de una efectiva membrana citoplasmática (Medina *et al.*, 1999).

Según Ingram (1984), existen dos hipótesis básicas para explicar el mecanismo inhibitorio del etanol: deterioro de la membrana citoplasmática e inhibición por producto final de las enzimas glicolíticas. A pesar de ser una hipótesis atractiva, la inhibición por producto final de las enzimas glicolíticas no presenta gran trascendencia en *S. cerevisiae*. Estudios *in vitro* han mostrado que esas enzimas son relativamente resistentes al etanol y que se inhiben solamente a concentraciones muy superiores a las que existen durante la fermentación. Se ha debatido ampliamente acerca de la posibilidad de que las concentraciones intracelulares de etanol sean superiores a las del medio, de modo tal, que puedan provocar la inhibición enzimática. Sin embargo, estudios recientes han establecido que el etanol difunde libremente a través de la membrana equilibrando rápidamente sus concentraciones intracelular y extracelular.

La membrana citoplasmática de las levaduras es una estructura fluida formada por una bicapa fosfolipídica que contiene además proteínas globulares. En adición las levaduras sintetizan esteroides y los incorporan a la membrana. La composición lipídica afecta las funciones membranales y a su vez es afectada por las condiciones de cultivo.

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).

Las acciones del etanol sobre la membrana pueden dividirse en tres categorías:

- Interacciones
- Efectos coligativos.
- Efectos dieléctricos.

Las interacciones directas están dadas porque la presencia de una molécula netamente polar como el etanol incrementa la polaridad de la membrana, aumentando así su capacidad para solubilizar otras moléculas polares, y disminuyendo su capacidad como barrera.

Efectos coligativos: El etanol sustituye el agua en la formación de los enlaces de hidrógeno participantes en la solvatación de fosfolípidos y proteínas membranales, lo que cambia las propiedades coligativas del medio de crecimiento y del citoplasma debilitando las interacciones hidrofóbicas. Por esta razón ocurre una incursión libre de las moléculas polares a las profundidades de la superficie de la membrana. La disminución de las interacciones hidrofóbicas incrementa la capacidad del citoplasma

y del medio de solubizar grupos no polares presentes en la membrana, lo que hace aumentar su polaridad limitando su función de barrera.

Efectos dieléctricos: Una concentración elevada de etanol altera las propiedades dieléctricas del citoplasma y del medio de cultivo, incrementando las atracciones y repulsiones electrostáticas, cambiando el equilibrio de ionización hacia formas neutras conjugadas y variando las conformaciones de las macromoléculas, las interacciones entre estas, el pH óptimo de las reacciones enzimáticas o sencillamente el pH del medio (Ingram, 1984).

La célula modifica la composición en ácidos grasos de la membrana para minimizar los efectos de la disminución de la fluidez que produce el etanol (Guerzoni *et al.*, 1988). La adaptación de las levaduras al etanol también obedece a una modificación de la composición lipídica de las membranas básicamente debida a un enriquecimiento de las mismas en esteroides y ácidos grasos de cadena larga. (Charpentier, 1991). La acumulación intracelular de etanol y su posible influencia en la inhibición de la fermentación alcohólica han sido objeto de discusión durante los últimos tres lustros. Distintos autores han observado que el etanol adicionado exógenamente a cultivos de *S. cerevisiae* resulta menos tóxico que el producido por la propia levadura.

Se supone que esto se debe a que la velocidad de producción de etanol excede la velocidad a la que este puede ser excretado de la célula. Este desbalance implicaría que la concentración alcohólica dentro de la célula sea mayor que en el exterior de la misma. Investigaciones recientes han mostrado que la acumulación de etanol en el interior de la célula se produce durante las primeras etapas de la fermentación, luego comienza a decrecer y al final de la misma las concentraciones intra y extracelulares se igualan (Dasari, 1990).

Asimismo, la tolerancia puede determinarse por los efectos del etanol sobre la viabilidad celular, utilizando la tasa de pérdida de viabilidad celular, en presencia de etanol, como criterio. Kalmokoff e Ingledew (1985), comprobaron que el etanol afectaba a la viabilidad celular, en función del estado de crecimiento de las células, siendo más resistentes las células en fase estacionaria que aquellas que se encontraban en fase exponencial. También se pudo comprobar que las condiciones nutricionales, del medio de cultivo, afectaban a la tasa de pérdida de viabilidad celular.

7.2.7 Fenotipo Killer

Las cepas de levaduras killer fueron descubiertas por Bevan y Makower (1963) quienes demostraron que existen tres fenotipos: killer, neutro y sensible respecto al carácter killer. Las levaduras killer, se caracterizan por secretar una toxina que es letal para las cepas sensibles de su misma especie o de diferentes géneros, pero siendo ellas mismas inmunes a sus propias toxinas. Las cepas neutras ni producen toxina ni son sensibles a la toxina de killer (Wood y Bevan, 1968).

Las levaduras killer con buenas características de fermentación han sido seleccionadas para la fermentación de la cerveza, vino o sake, y por lo tanto pueden usarse como cultivos indicadores en la industria del vino y así prevenir contaminaciones por cepas de levaduras salvajes sensibles (Hara *et al.*, 19080 y 1981; Seki *et al.*, 1985; Longo *et al.*, 1990; Van Vuuren y Jacobs, 1992, citado por Rodríguez, 1998).

En el género *Saccharomyces*, el mecanismo bioquímico de la actividad killer está asociado a la presencia de dos tipos de partículas víricas intracelulares VLP (virus like particle). Estas VLP están formadas por dos cadenas de ARN de doble hélice, L y M (ésta última codifica la toxina y un factor inmune de autoresistencia a la toxina). Además, toda una serie de genes nucleares intervienen en el mantenimiento, replicación y expresión de estas VLP (Pretorius J., y Barre, P. 1992).

Las cepas killer secretan una toxina proteica que se fija sobre receptores glucídicos de la pared celular de la cepa killer- sensible interfiriendo en el gradiente electroquímico de la membrana citoplasmática, lo que implica la muerte celular. En el género *Saccharomyces* se han encontrado al menos tres grupos de actividad (K1, K2 y K3) y cinco de resistencia. Sin embargo, los grupos más estudiados son el K1 y K2. El pH óptimo para la producción de la toxina K1 se encuentra entre 4.6 y 4.8, por encima del pH del vino, lo que implica su escaso interés en la selección de levaduras vínicas. Por el contrario, el rango de pH para el grupo de actividad K2 coincide con el del vino entre 2.9 y 4.9. La toxina killer K2 es estable en las diferentes condiciones presentes en el vino (pH, Temperatura de fermentación, etanol, SO₂, compuestos fenólicos, etc.). Sin embargo, la adición de bentonita durante la fermentación alcohólica puede suprimir toda actividad killer (Young, T. W., 1987; Woods, D.R y Bevan, A., 1968, citado por Rodríguez, 1998).

La actividad killer puede representar uno de los mecanismos de antagonismo de levaduras durante la fermentación espontánea. En las poblaciones de *Saccharomyces* salvajes puede existir un número relativamente elevado de cepas killer-resistentes a la toxina, lo que reduciría el interés de las cepas killer. Por otra parte, las poblaciones killer salvaje presentes en los mostos de una bodega o un área determinada pueden malograr la siembra de una cepa killer-sensible seleccionada por sus mejores características enológicas. Sin embargo, generalmente, para la selección de las levaduras vínicas se debe atender a cepas con el fenotipo killer, ya que favorecen la eliminación de la población indígena (Barre, P., 1992; Hidalgo, P. y Flores, M. 1994; Angulo L. *et al.*, 1993 citados por Rodríguez, 1998).

7.2.8 Azúcares fermentables

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, una de baja afinidad que involucra difusión facilitada y otro de alta afinidad que se realiza por translocación de grupos, cuando se trata de algún oligosacáridos, incluida la sacarosa, o incluso dextrinas para algunas levaduras, primero son hidrolizados a monosacáridos por enzimas extracelulares o periplasmicas 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 (figura 6), 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).

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, aún 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).

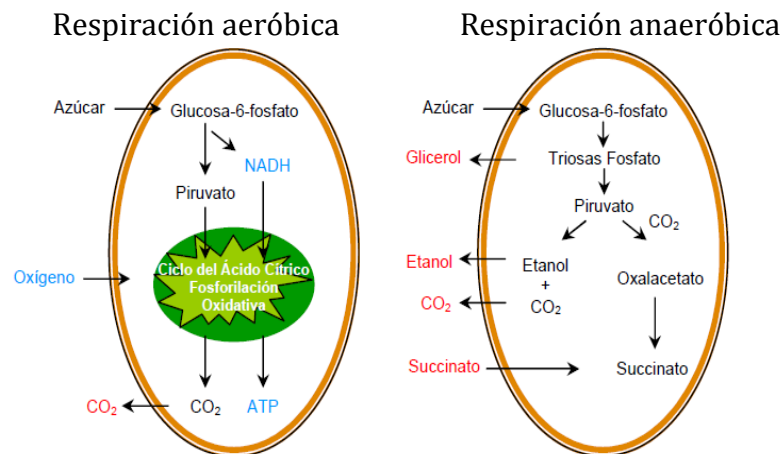


Figura 6. Ruta metabólica de carbohidratos.

7.2.9 *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 *Sacchacromycetaceae* (tabla 2).

Su metabolismo le permite crecer tanto en condiciones de aerobiosis como de anaerobiosis (Feldmann, 2005).

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

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae* (Carballo, 2000)

Posee alta actividad metabólica, por lo que en la fase aerobia se caracteriza por la producción de biomasa y la fase anaerobia 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 (Sánchez, 2010).

Las utilidades industriales más importantes de esta levadura son la producción de cerveza, pan y vino, gracias a su capacidad de generar dióxido de carbono y etanol durante el proceso de fermentación (Feldmann, 2005).

Saccharomyces cerevisiae (Figura 7) es quizás la levadura más importante para la humanidad, ya sea por su utilización desde hace miles de años 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.

Debido a su relevancia y al amplio conocimiento a nivel genético, el primer genoma eucariota completamente secuenciado fue el de esta levadura (Goffeau *et al.*, 1996). La reproducción de las levaduras es normalmente asexual, a través de la gemación en la superficie. Sin embargo también puede presentarse la reproducción sexual (figura 8).

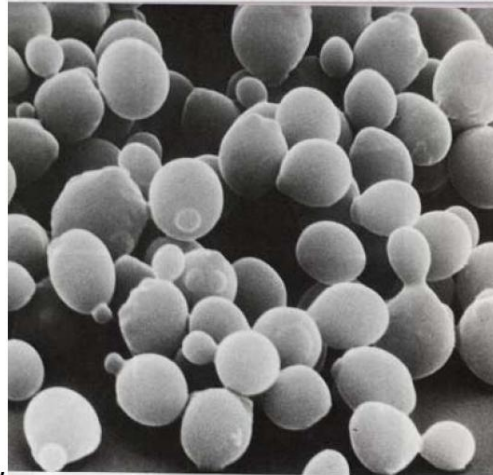


Figura 7. Micrografía electrónica de barrido de *S. cerevisiae*.

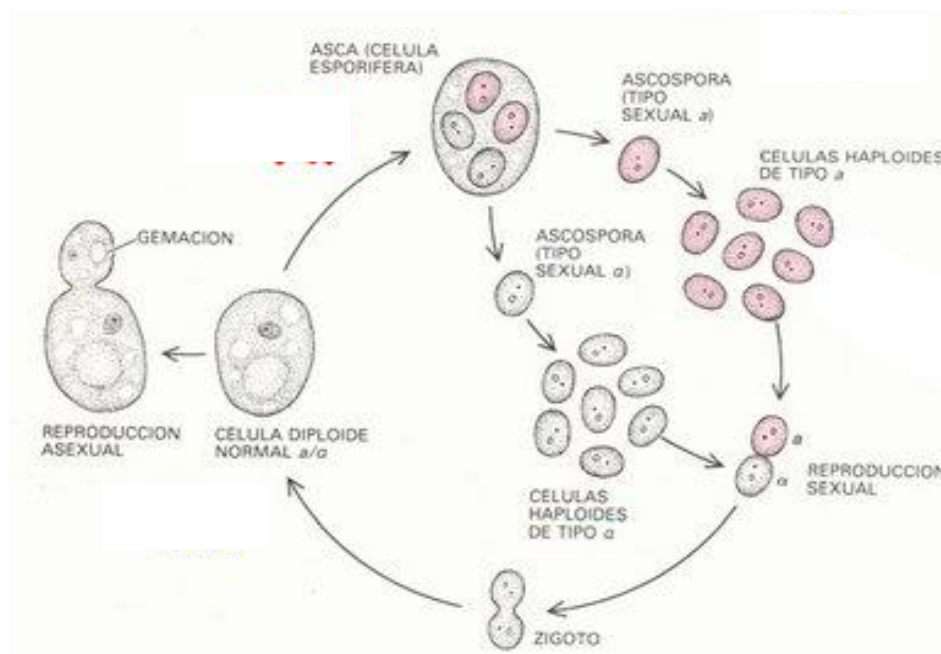


Figura 8. Reproducción de una levadura

Requerimientos nutricionales

Saccharomyces cerevisiae requiere ciertos nutrientes y condiciones ambientales para su apropiado crecimiento y reproducción. Algunos elementos son básicamente necesarios como por ejemplo carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo.

El carbono sirve como fuente de energía y como material constitutivo de la masa celular. El nitrógeno se encuentra en la célula formando parte esencial de las proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos; el fósforo se encuentra en los ácidos nucleicos, en la lecitina y en diversos compuestos fosforilados que participan activamente en los procesos de degradación oxidativa y de intercambio energético (ATP, ADP, AMP, NADP). Para que las fuentes de nitrógeno, fósforo y carbono

presentes en el sustrato sean aprovechados por la levadura, es necesario que se encuentren en forma asimilable (Ospina y Palacios, 1994).

Requerimientos físico-químicos

El crecimiento de *S. cerevisiae* se ve favorecido por un pH próximo a 4.0-5.0 y no se desarrollan bien en medio alcalinos 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.

7.3 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 (glicolisis) dando acetaldehído, y éste se reduce a etanol por la acción del NADH₂ (Jagnow, 1991).

El balance energético de la fermentación puede expresarse de la siguiente forma:



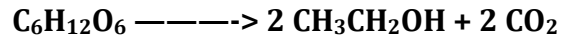
En la fermentación alcohólica los azúcares se oxidan hasta ser convertidos en piruvato en un proceso semejante a la glucólisis. Después el piruvato se descarboxila y se convierte en acetaldehído que posteriormente se reduce a etanol (figura 10).

En la fermentación alcohólica el ácido pirúvico es transformado en alcohol etílico (etanol). Esta fermentación la realizan, por ejemplo, las levaduras del género *Saccharomyces*. Se trata de un proceso de gran importancia industrial que, dependiendo del tipo de levadura, dará lugar a una gran variedad de bebidas alcohólicas: cerveza, vino, sidra, etc. En la fabricación del pan se le añade a la masa una cierta cantidad de levadura, la fermentación del almidón de la harina hará que el pan sea más esponjoso por las burbujas de CO₂.

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 de: el 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:



Glucosa \longrightarrow 2 Etanol + 2 Dióxido de carbono

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 *Zymomona 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 menciono 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 varia del 87 al 93 % del teórico (Vázquez y Dacosta, 2007).

Puesto que gran cantidad de residuos que contienen carbohidratos de precio muy reducido, pueden aprovecharse en la fabricación de etanol; este tipo de fermentación a escala industrial, ha sido usada años atrás por la humanidad para la elaboración de cerveza, vinos y en general bebidas alcohólicas y en la actualidad se le está dando un valor agregado a la producción de etanol para ser utilizado como biocombustible.

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 (Prescott y Cecil, 1992).

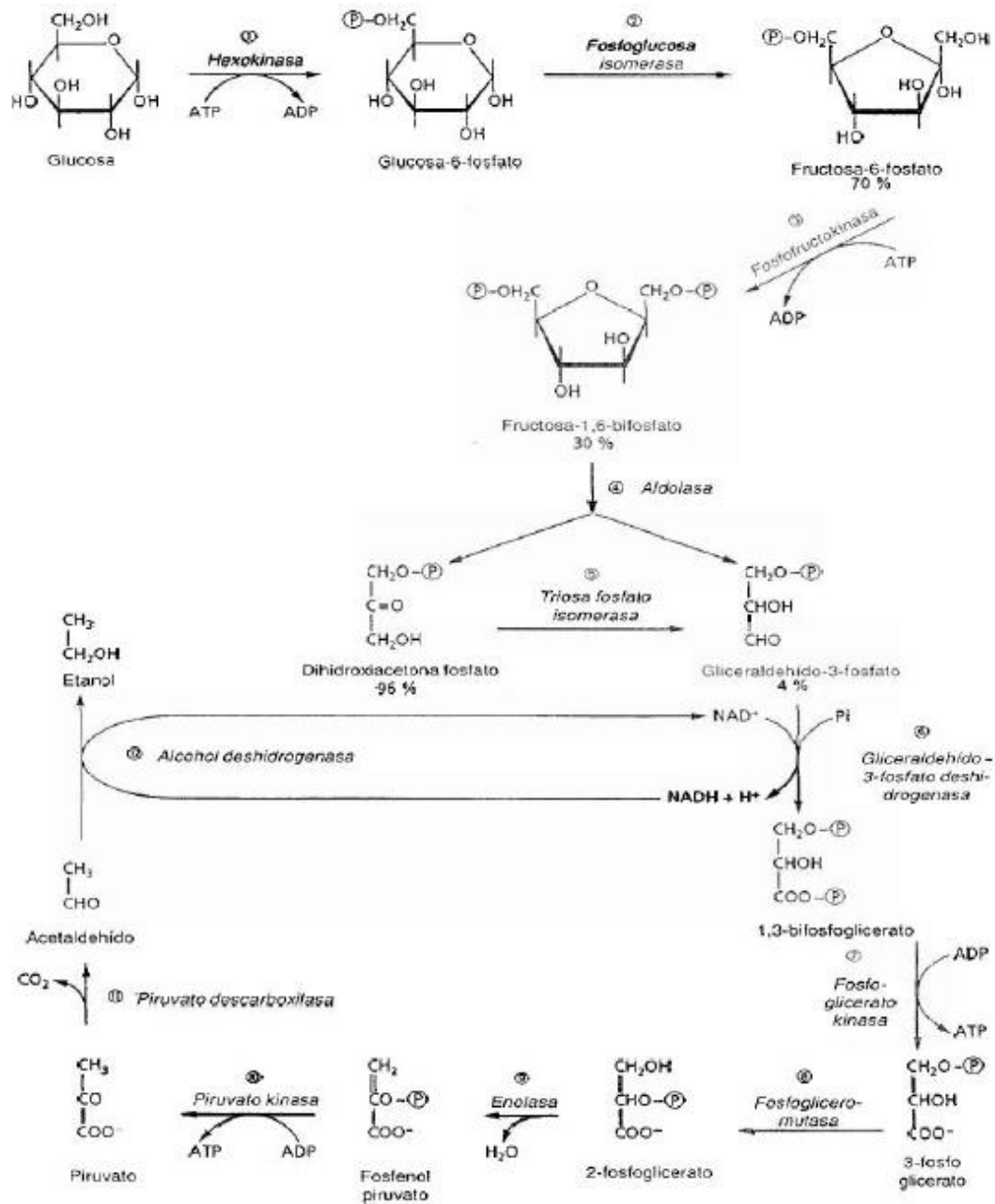


Figura 10. Fermentación alcohólica

Desde la glucosa hasta la síntesis de piruvato, se trata de una vía metabólica idéntica a la glucólisis muscular, denominada vía de las triosas o de Embden-Meyerhof. La enzima característica de la vía de Embden-Meyerhof es la fosfofructoquinasa (Looder, 1970).

7.3.1 Condiciones a medir y controlar en el proceso de fermentación

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 (Quintero, 1981).

Temperatura. La temperatura afecta el crecimiento de manera notable, principalmente por que los microorganismos de una especie dada solo pueden crecer en un rango restringido de temperatura, esto afecta de manera importante el crecimiento microbiano.

La temperatura óptima de crecimiento de las levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* es de 30 a 35 °C (Quintero, 1981).

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 (Quintero, 1981).

Nutrientes. Un medio de cultivo debe tener todos los elementos necesarios para el crecimiento microbiano, pero es conveniente señalar que las relaciones entre ciertos elementos son de particular importancia. Según investigaciones realizadas que en un cultivo para levaduras en malazas la relación carbono: nitrógeno de ser 1:1 para que la productividad celular sea máxima. También la relación fósforo: nitrógeno es relevante en lo que refiere a eficiencia de conversión energética y a la respiración (Quintero, 1981).

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.

Saccharomyces cerevisiae es una levadura que posee alta actividad metabólica, por lo que en un proceso fermentativo en fase aerobia se caracteriza por la producción de biomasa y en fase anaeróbica generalmente por la producción de etanol (Owen, 1991).

7.3.2 Limitantes de la fermentación

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).

Acidez del sustrato. El pH es un factor limitante en el proceso de la fermentación debido a que las levaduras se ven afectadas por el ambiente en el cual se desarrollan es decir alcalino o ácido. Las levaduras tienen rango óptimo de pH que va desde 3.5 hasta 5.5. 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 (Ríos, *et al.*, 2005).

Concentración de azúcares. Las concentraciones altas de azúcares afectan los procesos de osmosis dentro de la membrana celular, el rango óptimo de concentración de azúcar es de 10 a 18%, puesto que a concentraciones de 22% las levaduras empiezan a tener problemas en su proceso de respiración celular (Ríos, *et al.*, 2005).

Temperatura. Las levaduras son microorganismo mesófilos, por lo tanto su temperatura no puede sobrepasar lo 50°C, puesto que a esta temperatura o temperaturas superiores se produce su muerte.

7.4 Producción de etanol

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 (Enríquez, 2005).

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 (Volhardt, 2007; Ecopetrol, 2005). 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).

Actualmente es el biocombustible más importante, producto 100% renovable obtenido a partir de cultivos bioenergéticos y biomasa.

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.

8. DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

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

8.1 Microorganismos

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron donadas por el laboratorio de Investigación, estas cepas fueron previamente aisladas de la “taberna” (Alegría *et al.*, 2011), 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.

8.1.1 Reactivación

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/pulg² 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 sembró en tubos.

8.1.2 Resiembra en tubos

Se tomó una azada de cada levadura reactivada y se pasó a un tubo inclinado que contenía un medio 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.

8.1 3 Preparación del inóculo

Se realizó un preinóculo en un matraz erlenmeyer de 250 mL con relación 1/5 de medio YM el cual se inoculó una suspensión celular del 10% (v/v) obtenida de los tubos sembrados y se incubó a una temperatura de 30°C, 120 rpm, durante 8 h.

8.2 Determinación de biomasa

El crecimiento celular fue monitoreado cada 3 horas.

8.2.1 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 seguir la viabilidad del microorganismo. 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:

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

Donde: Y = promedio de levaduras contadas en los 5 cuadros

De cuadros = 25

Vol. Cámara = 0.2 mm x 0.2 mm x 0.1 mL x 25 cuadros = 0.1 mm³

Fd= factor de dilución

1000 mm³ = factor de conversión a mL.

8.2.2 Densidad óptica

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

8.3.2 Cuantificación de etanol

Se cuantificó el contenido de etanol por la técnica de oxidación por dicromato de potasio y por destilación.

8.3.1 Método del dicromato de potasio

El medio de cultivo fermentado, fue centrifugado a 10000 rpm por 5 minutos, se tomó 1 mL de éste y se depositó en un microtubo Ependof 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 o 10 minutos y se tomó 750 µL del sobrenadante adicionándole 750 µL de la solución oxidante de dicromato de potasio (10 g de dicromato de potasio en 100 mL de H₂SO₄ 5M) y se depositó en un microtubo Ependof de 2 mL, al cual se le dejó en agitación vigorosa por 30 minutos. Pasando este tiempo se dejó reposar de 5 a 10 minutos y se tomó 500 µL de la parte de abajo del microtubo, se le adicionó 3 mL de agua y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

8.3.2 Destilación y cuantificación de etanol por el densímetro

Se tomaron 100 mL de medio fermentado y se destiló en un equipo Corning durante 6 h a 95 °C, después se recolectó el volumen destilado y se calculó el rendimiento de etanol así como su concentración y densidad empleando un densímetro (Anton Paar DMA 4500 M).

8.4 Caracterización de las levaduras aisladas de la taberna

8.4.1 Prueba de osmotolerancia

Las cepas de levadura fueron sometidas a diferentes concentraciones de glucosa (2.35 g/L; 7.355 g/L; 12.35 g/L; 52.35 g/L; 202.35 g/L; 252.35 g/L; 302.35 g/L y 352.35 g/L), en medio 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 50 mL de medio y 10% (v/v) de inóculo. Los matraces se mantuvieron en agitación a 120 rpm, por 18-36 hrs y se monitoreo el crecimiento celular cada 3 h.

8.4.2 Prueba de 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 9.5% (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 50 mL de medio y 10% (v/v) de inóculo. Los matraces se mantuvieron en agitación a 120 rpm, por 18-36 hrs y se monitoreo el crecimiento celular cada 3 h.

8.4.3 Efecto killer

Se evaluó el fenotipo killer de las cepas aisladas empleando para ello cajas Petri con medio YPD (Extracto de levadura 10 g/L, peptona de caseína 20 g/L, agar 20 g/L, glucosa 20 g/L y azul de metileno 0.03 g/L) ajustando el pH a 4.5, las cajas con agar se dejaron deshidratar a una temperatura de 22 °C durante 4 días y después de esto cada una de las cepas en estudio se sembró en forma de césped colocando 100µl de inóculo, utilizando para la siembra en césped de 12 a 15 perlas de ebullición previamente esterilizadas y la otra cepa (contra la que se pretende evaluar el fenotipo killer) se sembró en forma lineal con un asa. Las placas se incubaron a 22°C durante una semana y después de este tiempo se observó el fenotipo killer.

8.4.4 Degradación de azúcares fermentables

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/pulg² 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.

8.5.4 Cinética de crecimiento y producción de etanol

Se evaluó el crecimiento y la producción de etanol de cada una de las levaduras, así como también el consumo de sustrato. Las pruebas para cada levadura se hicieron por duplicado, tomando muestra cada 2 h las primeras 14 h y después cada 3 h hasta completar las 48 horas de fermentación. Se prepararon 50 mL de inóculo en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con medio YM el cual se inoculó una suspensión celular del 10% (v/v), se incubó a una temperatura de 30°C, 120 rpm, durante 8 a 10 h.

Se preparó 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. El crecimiento celular se siguió por cuenta al microscopio en cámara de Neubauer, la cuantificación de etanol por oxidación con dicromato de potasio y el consumo de sustrato por la técnica de DNS.

9. RESULTADOS Y DISCUSIONES

9.1 Prueba de osmotolerancia

En la figura 1 se muestran los resultados obtenidos (cuenta al microscopio) del comportamiento cinético de la levadura 35 con diferentes concentraciones de glucosa (de 2.35 a 352.335 g/L), en la cual se observa que el máximo crecimiento se da cuando hay una concentración de glucosa de 52.35 g/L (1.22×10^8 Lev/mL) y el crecimiento mínimo cuando hay una concentración de 352.35 g/L (3.65×10^7). El crecimiento celular no se inhibe completamente en las concentraciones de 202.35, 252.35 y 302.35 g/L de glucosa, sin embargo se ve afectada al presentar un crecimiento muy bajo, comparado con la concentración de 52.35 g/L, en el cual se observa la inhibición por el azúcar, esto 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, la célula será plasmolizada (Tomasso, 2004).

En la figura 2 se observa los resultados obtenidos (densidad óptica) del comportamiento cinético de la levadura 35, sin embargo, estos difieren de los anteriores ya que se observa un crecimiento máximo con una concentración de glucosa de 202.35 g/L y un mínimo en una concentración de 2.35 g/L, esto se explica que debido a la metodología utilizada en cuenta al microscopio, se hizo una tinción previa con azul de metileno al 5% la cual diferencia la viabilidad de las células, no siendo así en densidad óptica que determina células vivas como células muertas.

Levadura 35

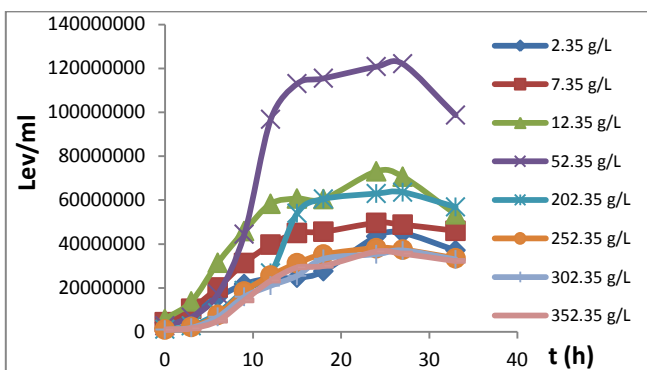


Figura 1: Cinética de crecimiento mediante cuenta al microscopio (Lev 35)

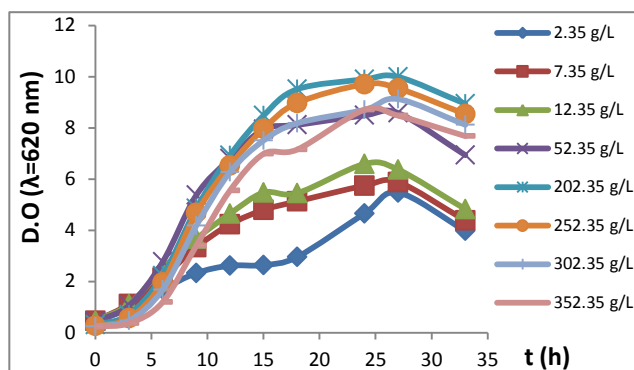


Figura 2: Cinética de crecimiento mediante densidad óptica (Lev 35)

En la tabla 1 se muestran los valores de las diferentes velocidades de crecimiento (μ) para cada concentración de glucosa y los tiempos de duplicación. En la figura 3 se observa el efecto de la concentración de sustrato (glucosa) sobre la velocidad de crecimiento de la levadura 35. La μ más alta se obtuvo con una concentración de 52.35 g/L de sustrato (glucosa) con un valor de $0.2993 \text{ }^{1/h}$, y un tiempo de duplicación mínimo de 2.31 h.

Tabla 1: Parámetros cinéticos de la Lev 35

[S] g/L	μ (1/h)	Td (h)
2.35	0.1485	4.64
7.35	0.1839	3.77
12.35	0.1938	3.57
52.35	0.2993	2.31
202.35	0.2365	2.93
252.35	0.2164	3.20
302.35	0.2103	3.29
352.35	0.193	3.60

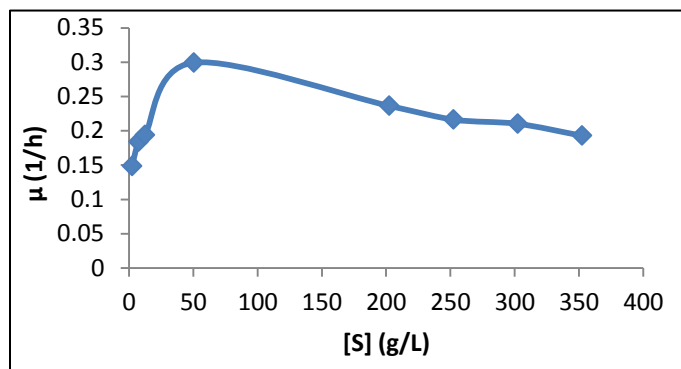


Figura 3: Efecto de la concentración de sustrato (glucosa) sobre la velocidad de crecimiento de Lev 35

Levadura 51

La figura 4 presenta la cinética de crecimiento de la levadura 51 (cuenta al microscopio). En ella se observa que el mayor crecimiento celular se da en la concentración de sustrato (glucosa) de 52.35 g/L con una concentración celular máxima de 1.63×10^8 Lev/mL a las 12 horas. La concentración celular mínima se da cuando hay 2.35 g/L de glucosa en el medio con 3.93×10^7 Lev/mL.

En la figura 5 se muestran los resultados de densidad óptica de la cinética de crecimiento de la levadura 51, en ella se observa que el crecimiento máximo se da cuando hay una concentración de sustrato de 352.35 g/L a las 24 horas

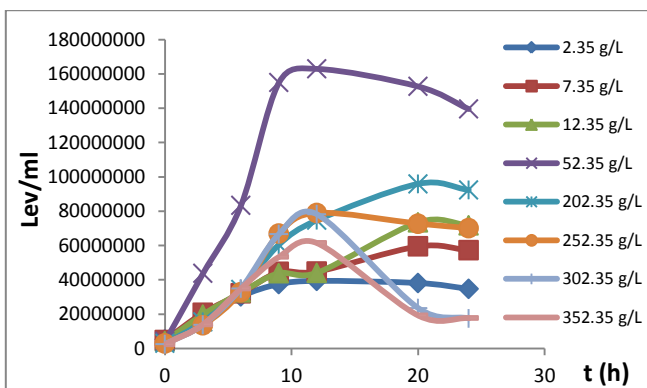


Figura 4: Cinética de crecimiento mediante cuenta al microscopio (Lev 51)

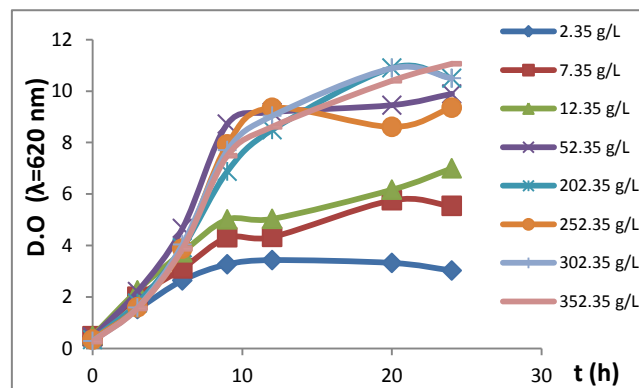


Figura 5: Cinética de crecimiento mediante densidad óptica (Lev 51)

En la tabla 2 se muestran los valores de las diferentes velocidades de crecimiento (μ) para cada concentración de glucosa y los tiempos de duplicación. En la figura 6 se observa el efecto de la concentración de sustrato (glucosa) sobre la velocidad de crecimiento de la levadura 51. La μ más alta se obtuvo con una concentración de 52.35 g/L de sustrato (glucosa) con un valor de $0.3835 \text{ } 1/h$, y un tiempo de duplicación mínimo de 1.8 h.

Tabla 2: Parámetros cinéticos de Lev 51

[S] g/L	μ (1/h)	Td (h)
2.4	0.2149	3.22
7.4	0.2355	2.94
12.4	0.2528	2.77
52.4	0.3835	1.8
202.4	0.3227	2.11
252.4	0.2667	2.6
302.4	0.263	2.63
352.2	0.223	3.10

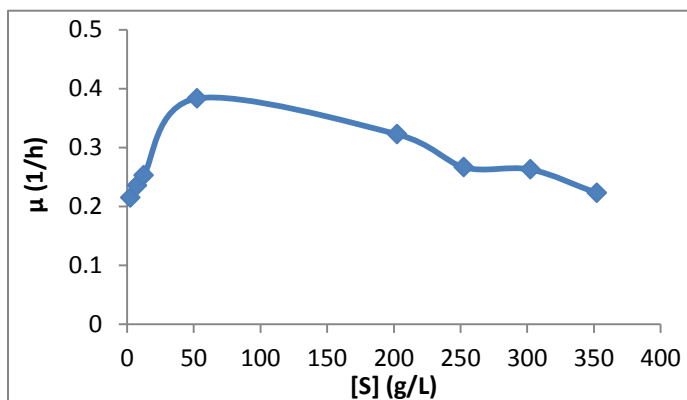


Figura 6: Efecto de la concentración de sustrato (glucosa) sobre la velocidad de crecimiento de Lev 51

Levadura 64

La figura 7 presenta la cinética de crecimiento de la levadura 64 (cuenta al microscopio). En ella se observa que el mayor crecimiento celular se da en la concentración de sustrato (glucosa) de 52.35 g/L con una concentración celular máxima de 1.82×10^8 Lev/mL a las 9 horas. La concentración celular mínima se da cuando hay 352.35 g/L de glucosa en el medio con 4.1×10^7 Lev/mL.

En la figura 8 se muestran los resultados de densidad óptica de la cinética de crecimiento de la levadura 64, en ella se observa que el crecimiento máximo se da cuando hay una concentración de sustrato de 200.35 g/L a las 18 horas.

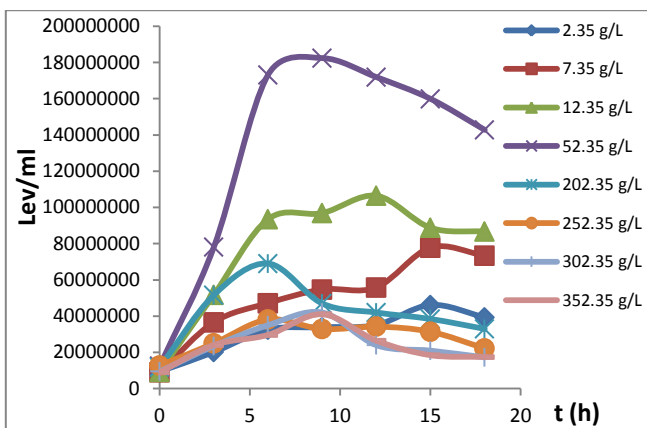


Figura 7: Cinética de crecimiento mediante cuenta al microscopio (Lev 64)

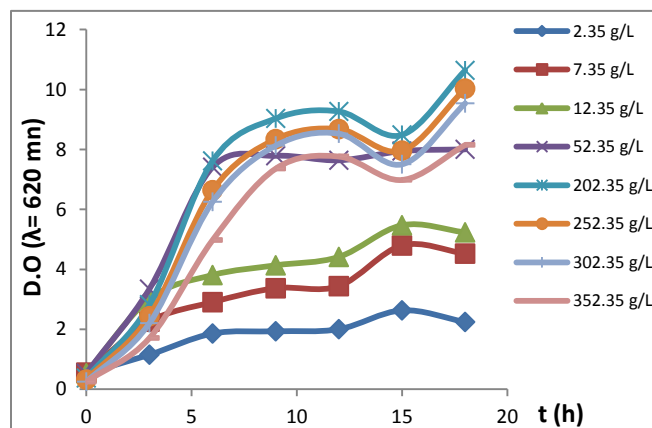


Figura 8: Cinética de crecimiento mediante densidad óptica (Lev 64)

En la tabla 3 se muestran los valores de las diferentes velocidades de crecimiento (μ) para cada concentración de glucosa y los tiempos de duplicación. En la figura 9 se observa el efecto de la concentración de sustrato (glucosa) sobre la velocidad de crecimiento de la levadura 64. La μ más alta se obtuvo con una concentración de 52.35 g/L de sustrato (glucosa) con un valor de $0.4381 \text{ } 1/h$, y un tiempo de duplicación mínimo de 1.58 h.

Tabla 3: Parámetros cinéticos de Lev 64

[S] g/L	μ (1/h)	Td (h)
2.35	0.2054	3.57
7.35	0.2758	2.51
12.35	0.3865	1.79
50.35	0.4381	1.58
202.35	0.2943	2.35
252.3	0.1829	3.79
302.35	0.1629	4.28
352.35	0.1586	4.37

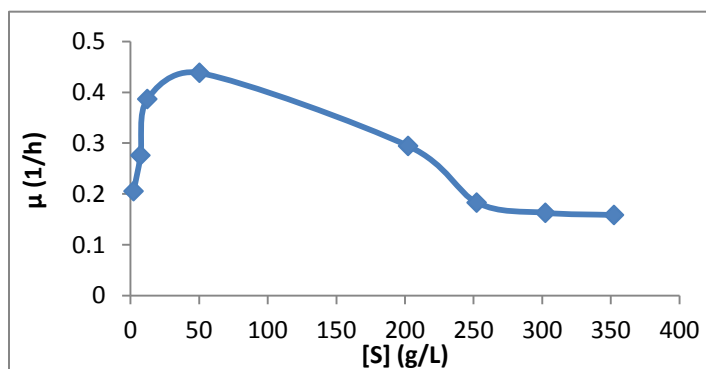


Figura 9: Efecto de la concentración de sustrato (glucosa) sobre la velocidad de crecimiento de Lev 64

Levadura TL-ITTG-06

La figura 10 presenta la cinética de crecimiento de la levadura TL-ITTG-06 (cuenta al microscopio). En ella se observa que el mayor crecimiento celular se da en la concentración de sustrato (glucosa) de 52.35 g/L con una concentración celular máxima de 1.47×10^8 Lev/mL a las 12 horas. La concentración celular mínima se da cuando hay 352.35 g/L de glucosa en el medio con una concentración celular de 3.9×10^7 Lev/mL.

En la figura 11 se muestran los resultados de densidad óptica de la cinética de crecimiento de la levadura 51, en ella se observa que el crecimiento máximo se da cuando hay una concentración de sustrato de 202.35 g/L.

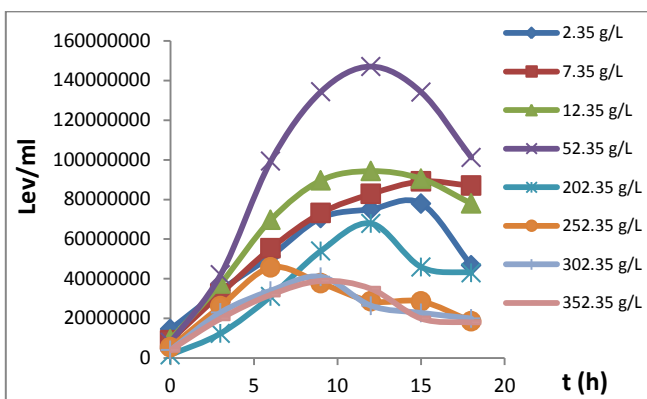


Figura 10: Cinética de crecimiento mediante cuenta al microscopio (TL-ITTG-06)

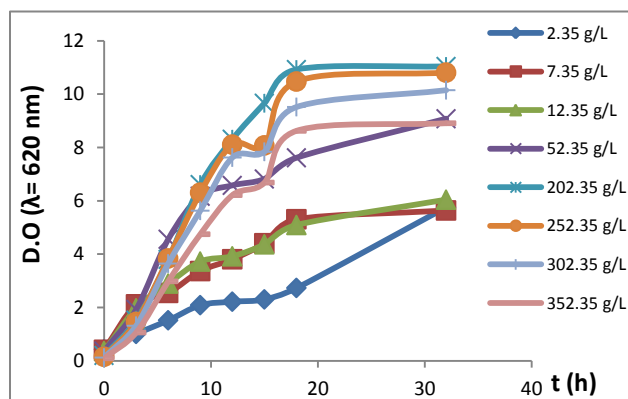


Figura 8: Cinética de crecimiento mediante densidad óptica (TL-ITTG-06)

En la tabla 4 se muestran los valores de las diferentes velocidades de crecimiento (μ) para cada concentración de glucosa y los tiempos de duplicación. En la figura 12 se observa el efecto de la concentración de sustrato (glucosa) sobre la velocidad de crecimiento de la levadura TL-ITTG-06. La μ más alta se obtuvo con una concentración de 202.35 g/L de sustrato (glucosa) con un valor de $0.3793 \text{ } 1/h$, y un tiempo de duplicación mínimo de 1.82 h.

Tabla 4: Parámetros cinéticos de TL-ITTG-06

[S] g/L	μ (1/h)	Td (h)
2.35	0.1709	4.05
7.35	0.2273	3.04
12.35	0.245	2.829
50.35	0.3113	2.22
202.35	0.3793	1.82
252.3	0.3531	1.963
302.35	0.2433	2.849
352.35	0.1921	3.608

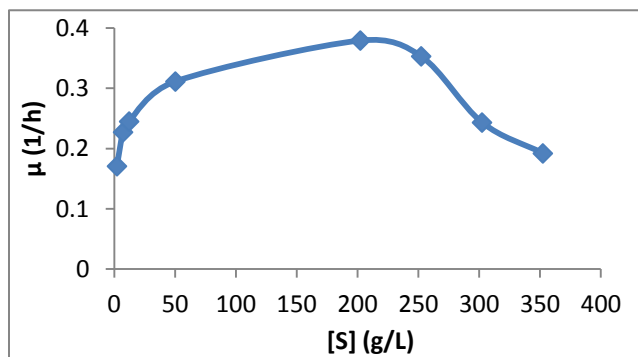


Figura 12: Efecto de la concentración de sustrato (glucosa) sobre la velocidad de crecimiento de Lev 64

De manera general, las más altas concentraciones de biomasa celular se dan con 52.35 g/L de glucosa, sin embargo todas las levaduras fueron capaces de crecer aun en condiciones extremas de sustrato. Cabe mencionar que las levadura 35 y 64, presentaron características de fermentación alcohólica como presencia de espuma y olor característico ha fermentado, en las concentraciones de sustrato de 302.35 y 352.35 g/L, a pesar de estar en un medio aireado, esto se debe a que se puede producir fermentación alcohólica incluso en condiciones aerobias (Van Dijken y Scheffers, 1986) si la concentración de glucosa sobrepasa un valor limite critico (Verduyn *et al.*, 1984). Esto se le conoce como efecto de Crabtree.

En las figuras 3, 6, 9 y 12, se puede observar el efecto que tiene las diferentes concentraciones de sustrato sobre la velocidad de crecimiento de cada microorganismo, a medida que va aumentando la concentración de glucosa, la velocidad especifica de crecimiento (μ) va creciendo, sin embargo, llega un límite en la cual el crecimiento se ve afectado por las altas concentraciones de glucosa y la velocidad comienza a decrecer, ya que cada microorganismo tiene una velocidad máxima de crecimiento denominada μ_{max} . Cabe mencionar que esta velocidad de crecimiento solo se presenta en la fase exponencial de cada microorganismo.

9.2 Tolerancia a etanol

La figura 13 representa el crecimiento cinético (cuenta al microscopio) de la levadura 35 a diferentes concentraciones de etanol (0%, 5%, 6.5%, 8% y 9.5%). Esta metodología fue comparada con la medición de la turbidez por densidad óptica (figura 14). Se puede observar que la presencia de etanol, afecta simultáneamente al crecimiento microbiano, sin embargo presentan casi el mismo crecimiento en concentraciones de 8 y 9.5%, al alcanzar un concentración máxima de 4.49×10^7 y 4.48×10^7 Lev/mL respectivamente a las 18 h.

Levadura 35

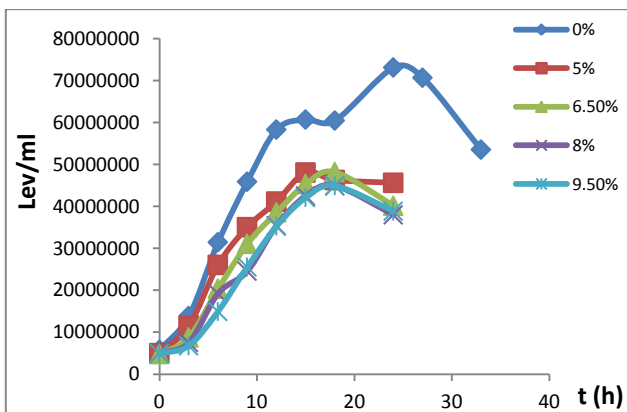


Figura 13: Cinética de crecimiento (cuenta al microscopio) de Lev 35 a diferentes concentraciones de etanol

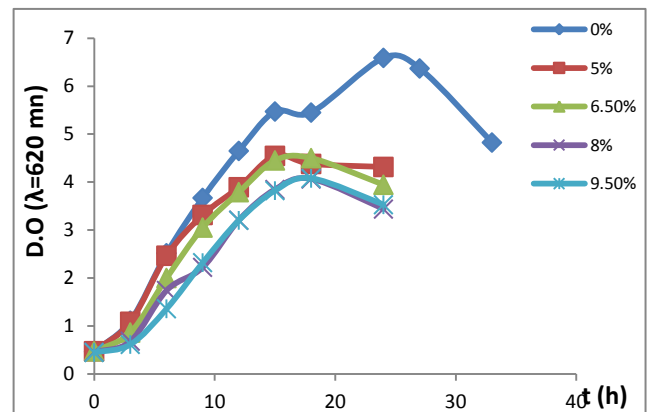


Figura 13: Cinética de crecimiento (densidad óptica) de Lev 35 a diferentes concentraciones de etanol

La tabla 5 representa los valores de la velocidad de crecimiento a diferentes concentraciones de etanol. Este valor se ve afectado a medida que aumenta la concentración de etanol, la velocidad va disminuyendo (figura15).

Tabla 5: Velocidad específica de crecimiento de Lev 35 en función de la concentración de etanol

[ETOH] % v/v	μ (1/h)
0	0.1938
5	0.1777
6.5	0.1621
8	0.1619
9.5	0.1505

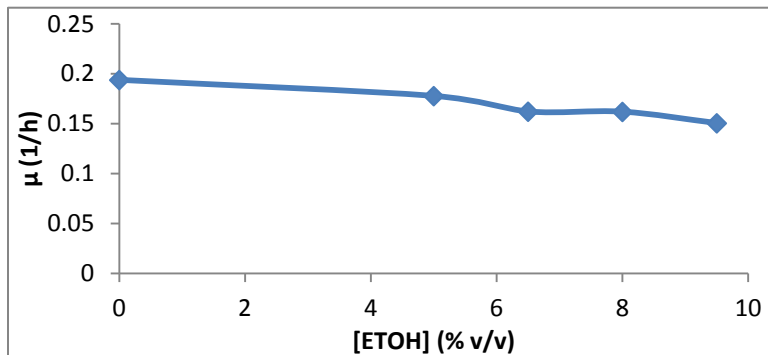


Figura 15: Efecto de la concentración de etanol sobre la velocidad de crecimiento de Lev 35

Levadura 51

En los resultados obtenidos en la tabla 16, se observa que la concentración celular máxima fue menor cuando el medio no contenía etanol, este comportamiento se debe a que la concentración inicial de inóculo fue más bajo.

En la figura 18 se observa como a medida que va aumentando la concentración de etanol en el medio, la velocidad de crecimiento va disminuyendo.

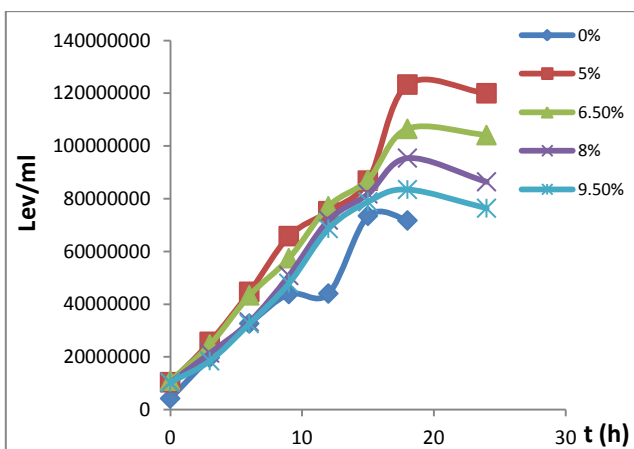


Figura 16: Cinética de crecimiento (cuenta al microscopio) de Lev 51 a diferentes concentraciones de etanol

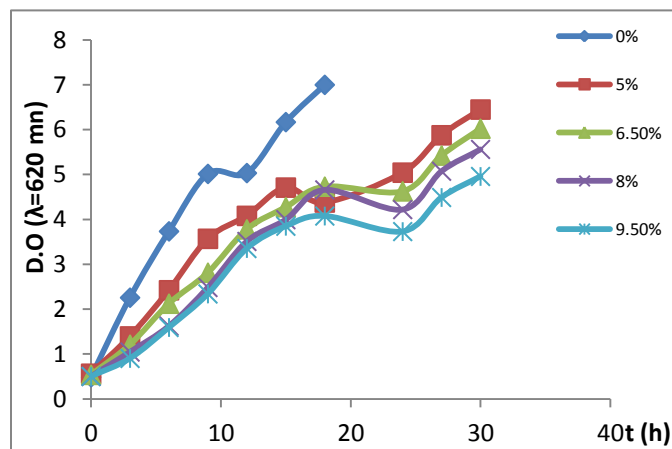


Figura 17: Cinética de crecimiento (densidad óptica) de Lev 51 a diferentes concentraciones de etanol

Tabla 6: Velocidad específica de crecimiento de Lev 35 en función de la concentración de etanol

[ETOH] %v/v	μ (1/h)
0	0.2518
5	0.2029
6.5	0.158
8	0.158
9.5	0.138

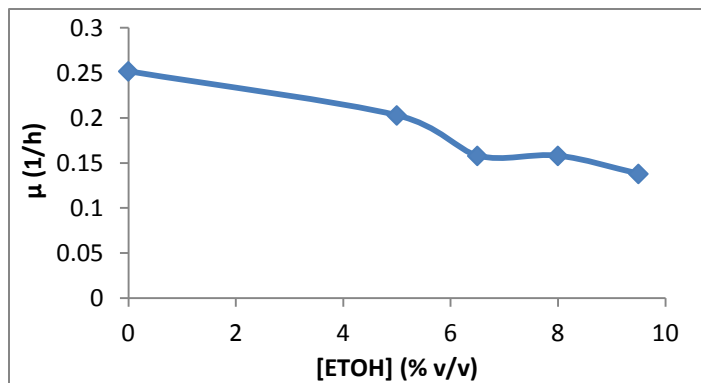


Figura 18: Efecto de la concentración de etanol sobre la velocidad de crecimiento de Lev 51

Levadura 64

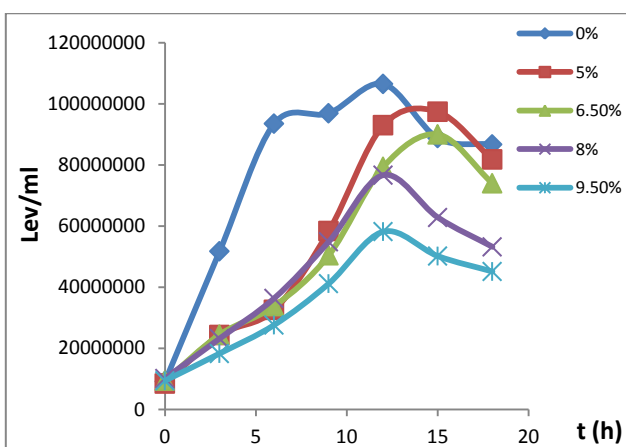


Figura 19: Cinética de crecimiento (cuenta al microscopio) de Lev 64 a diferentes concentraciones de etanol

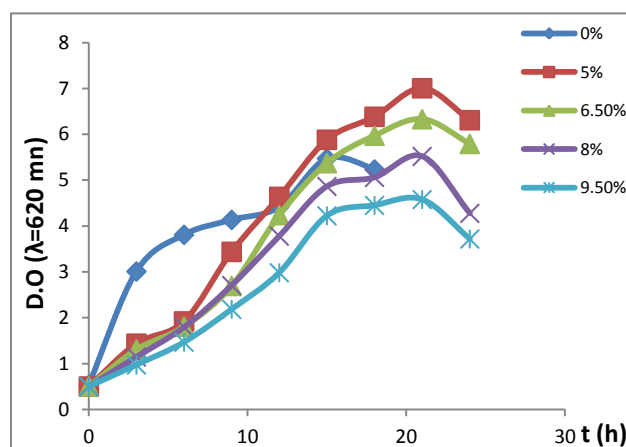


Figura 20: Cinética de crecimiento (densidad óptica) de Lev 64 a diferentes concentraciones de etanol

Tabla 7: Velocidad específica de crecimiento de Lev 35 en función de la concentración de etanol

[ETOH] %v/v	μ (1/h)
0	0.3865
5	0.1886
6.5	0.166
8	0.1635
9.5	0.1486

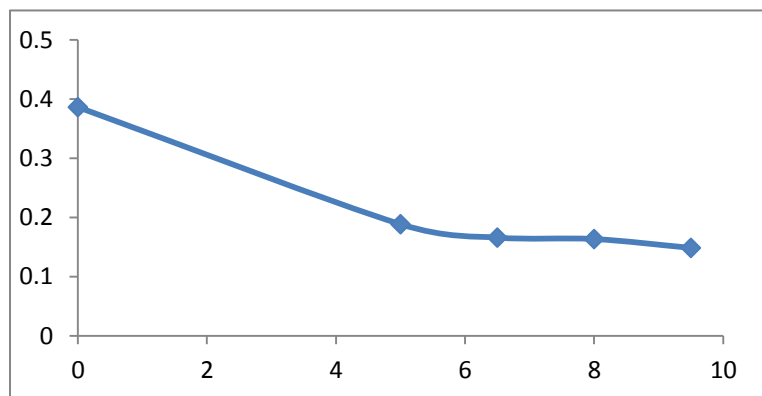


Figura 21: Efecto de la concentración de etanol sobre la velocidad de crecimiento de Lev 64

TL-ITTG-06

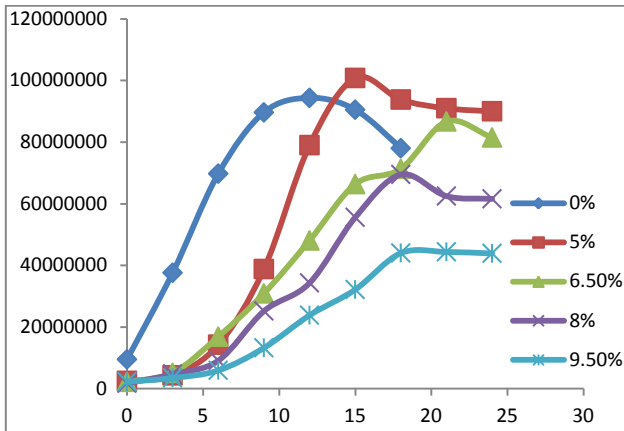


Figura 22: Cinética de crecimiento (cuenta al microscopio) TL-ITTG-06 a diferentes concentraciones de etanol

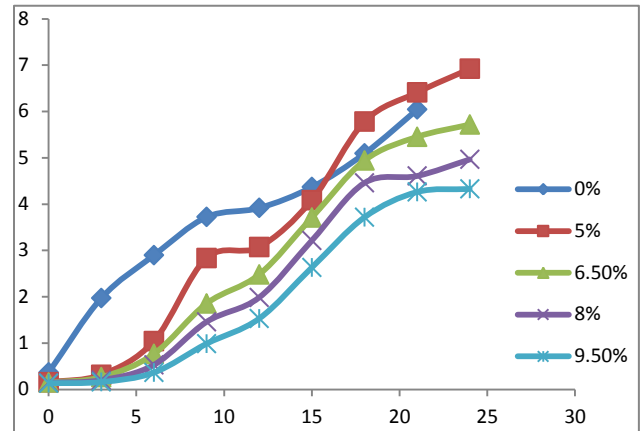


Figura 23: Cinética de crecimiento (densidad óptica) TL-ITTG-06 a diferentes concentraciones de etanol

Tabla 8: Velocidad específica de crecimiento de TL-ITTG-06 en función de la concentración de etanol

[ETOH] %v/v	μ (1/h)
0	0.24
5	0.2121
6.5	0.206
8	0.1684
9.5	0.1629

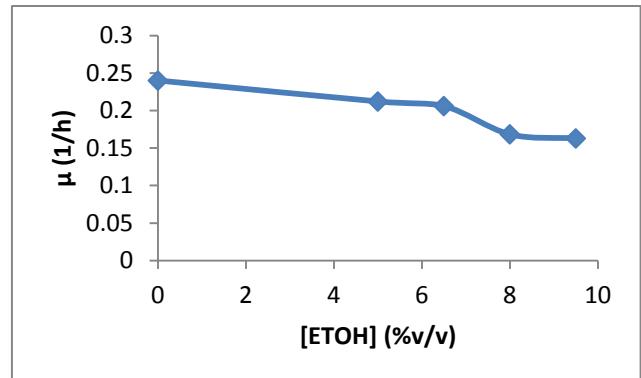


Figura 24: Efecto de la concentración de etanol sobre la velocidad de crecimiento de TL-ITTG-06

Comparando las figuras 15, 18, 21 y 24 se puede observar que la levadura 64 es la más 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.

Es conocido que la actividad fermentativa de todos los organismos productores de etanol declina progresivamente a medida que este 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 (Medina *et al.*, 1999), este comportamiento se puede observar en las figuras 15, 18, 21 y 24. 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).

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).

Cabe mencionar que el comportamiento cinético presentado en la levadura 51, fue inversamente, al presentar un menor crecimiento cuando el medio no tenía etanol, esto se le atribuye probablemente a que la concentración inicial en este medio, fue inferior a los demás, iniciando con una concentración de 4.25×10^6 Lev/mL, mientras que los demás presentaron una concentración celular inicial de 1.04×10^7 Lev/mL cuando el medio contenía 5% de etanol, 1.1×10^7 Lev/mL al tener 6.5% de etanol y 1.03×10^7 Lev/mL cuando tenía una concentración de 8% y 9.5%.

9.3 Fenotipo killer

Los resultados de esta prueba no fue posible reportarlos, debido a que el experimento no pudo estandarizarse.

9.4 Degradación de carbohidratos

Se evaluó el crecimiento en cinco diferentes carbohidratos (glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa y manitol) por las cuatro levaduras. Este crecimiento se siguió por la producción de gas, biomasa y turbidez (tabla 9).

Tabla 9: Degradación de carbohidratos

Cepas	Azúcares		96 h	Cepas	Azúcares		96 h
Lev 35	Glucosa	Gas	++++	Lev 64	Glucosa	Gas	++++
		Turbidez	++++			Turbidez	++++
		Biomasa	++++			Biomasa	++++
	Fructosa	Gas	++++		Fructosa	Gas	++++
		Turbidez	++++			Turbidez	++++
		Biomasa	++++			Biomasa	++++
	Sacarosa	Gas	++++		Sacarosa	Gas	++++
		Turbidez	++++			Turbidez	++++
		Biomasa	++++			Biomasa	++++
	Lactosa	Gas	-		Lactosa	Gas	++
		Turbidez	+			Turbidez	++
		Biomasa	+			Biomasa	++
Manitol	Gas	-	Manitol	Gas	-		
	Turbidez	-		Turbidez	-		
	Biomasa	-		Biomasa	-		
Lev 51	Glucosa	Gas	++++	TL-ITTG-06	Glucosa	Gas	++++
		Turbidez	++++			Turbidez	++++
		Biomasa	++++			Biomasa	++++
	Fructosa	Gas	++++		Fructosa	Gas	++++
		Turbidez	++++			Turbidez	++++
		Biomasa	++++			Biomasa	++++
	Sacarosa	Gas	++++		Sacarosa	Gas	++++
		Turbidez	++++			Turbidez	++++
		Biomasa	++++			Biomasa	++++
	Lactosa	Gas	-		Lactosa	Gas	-
		Turbidez	+			Turbidez	+
		Biomasa	+			Biomasa	+
Manitol	Gas	-	Manitol	Gas	-		
	Turbidez	-		Turbidez	-		
	Biomasa	-		Biomasa	-		

Nota (- nula; + poca; ++ moderada; +++ abundante; ++++ muy abundante)

Las cuatro levaduras evaluadas (Lev 35, 51, 64 y TL-ITTG-06) presentaron características similares al producir gas y biomasa en glucosa, fructosa y sacarosa, así como también ninguna de las cuatro no presentó crecimiento en manitol. Cabe mencionar que Lev 64 presentó una moderada producción de gas en lactosa y se observó un crecimiento moderado de biomasa. Este crecimiento probablemente se debe a que esta levadura posee un complejo enzimático (lactasa). Sin embargo, para el caso *Saccharomyces cerevisiae*, no contiene esta enzima 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 presento crecimiento debido a que sufrió contaminación alguna o podría tratarse de otra especie, se conoce algunas especies de levaduras capaces de fermentar lactosa como *K. marxianus* y *C. kefir* (Zumbano *et al.*, 2006).

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, cuando se trata de algunos oligosacáridos, incluida la sacarosa, primero son hidrolizados a monosacáridos por enzimas extracelulares o periplasmicas antes de entrar a la célula (Santillán *et al.*, 1998), es decir las cuatro levaduras poseen este complejo enzimático (invertasa) que le permite hidrolizar la sacarosa a monosacáridos (glucosa y fructosa) y posteriormente fermentarlos.

9.5 Cinética de crecimiento y producción de etanol

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

Las concentraciones de etanol, sustrato y biomasa al final de cada fermentación (48h) se muestran en la tabla 10.

Cuadro 9. Producción de etanol y biomasa y sustrato residual producida a las 48 h de fermentación

Cepa	X (Lev/mL)	[S] glucosa (g/L)	[ETOH] (g/L)	Y (p/x)
Lev 35	6.45x 10 ⁷	0.745	48.76	0.4913
Lev 51	897x 10 ⁷	0.52	32.07	0.343
Lev 64	9.62x 10 ⁷	0.6	32.95	0.308
TL-ITTG-06	8.85x10 ⁷	0.5	29.17	0.284

En las figuras 25, 26, 27 y 28 se observa la cinética de producción de etanol para cada levadura. La concentración de sustrato (glucosa) inicial fue diferente en cada levadura; 100 g/L para Lev 35, 122 g/L para Lev 51, 114.4 g/L para Lev 64 y 118.21 g/L para TL-ITTG-06, así como también su concentración celular inicial para cada levadura (35, 51, 64 y TL-ITTG-06), 8.25x 10⁶ Lev/mL, 1.065x 10⁷ Lev/mL, 8.9 x10⁶ Lev/mL y 7.65x 10⁶ Lev/mL respectivamente.

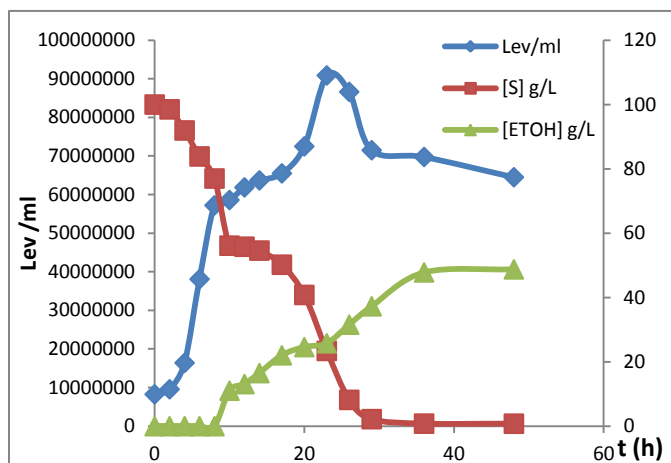


Figura 25: Cinética de producción de etanol de Lev 35

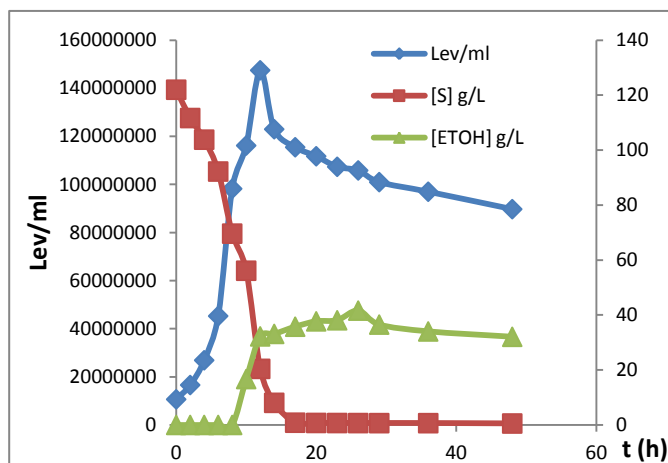


Figura 26: Cinética de producción de etanol de Lev 51

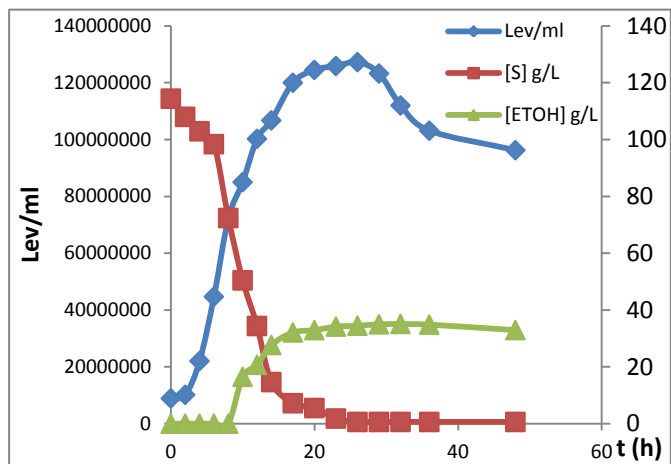


Figura 27: Cinética de producción de etanol Lev 64

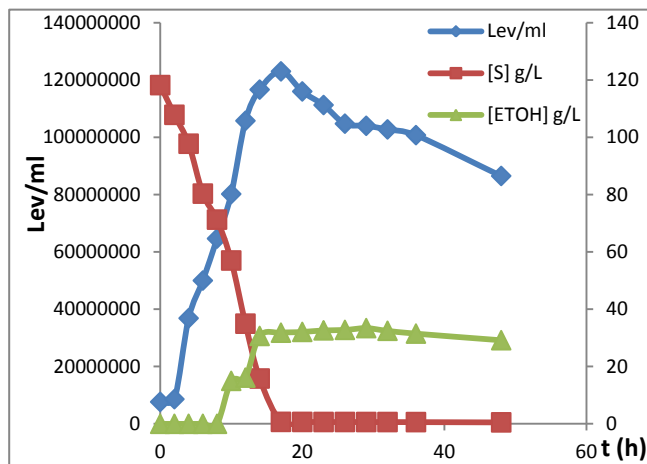


Figura 28: Cinética de producción de etanol TL-ITG-06

Las figura 25, 26, 27 y 28 muestran como la cantidad de etanol y biomasa van aumentado a medida que la glucosa disminuye, esto se debe a que los microorganismos consumen los azucres para su crecimiento y producción de etanol. Cuando la cantidad de sustrato es agotado detienen su crecimiento y la producción de etanol (Cervantes y Pedroza, 2007).

La cuantificación de etanol se determinó mediante la por 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 acido 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 a 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 aplicar un tratamiento con un solvente (fosfato de tributilo) para extraer el etanol de las muestras.

El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol, es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO₂ 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 mejor productora de etanol es la Lev 35, al presentar un 0.4913 gramos de etanol por cada gramo de glucosa, este resultado es muy semejante al valor teórico, lo cual nos dice que la Lev 35 es una excelente levadura para producir etanol.

Las levaduras 51, 64 y TL-ITTG-06, agotaron casi todo el sustrato, obteniendo eficiencia de 99.4 % para las tres levaduras, sin embargo, las cantidades de etanol obtenidas no fueron tan elevadas como el de la Lev 35, esto se le atribuye a que en una fermentación, las levaduras también utilizan el sustrato para el crecimiento celular.

10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De las cuatro levaduras evaluadas, las cuatro poseen muy poca capacidad de tolerar altas concentraciones de sustrato (glucosa) presentando un máximo crecimiento a una concentración de 52.35 g/L de glucosa.

El aumento en las concentraciones de etanol en el medio, inhibieron parcialmente el crecimiento celular, en el caso de las levaduras 35, 64 y TL-ITTG-06.

En la producción de etanol, la mejor productora de etanol fue la levaduras 35, al presentar 48.76 g/L de etanol a las 48 h de fermentación.

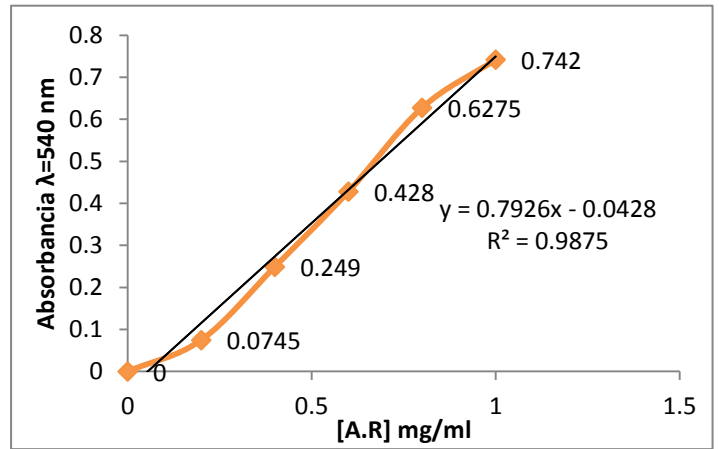
El crecimiento de estas levaduras es rápido y poseen buen consumo de sustrato al agotar el 99% de él, en aproximadamente 24 h, sin embargo parte de este sustrato se transforma en biomasa.

En la prueba para identificar si alguna de las levaduras eran tipo killer, no se pudo estandarizar debido a requiere de condiciones muy específicas para que se pueda apreciar este fenotipo, como lo es una temperatura específica de 22 °C, un medio de cultivo con un pH exactamente de 4.5. Para efectuar esta técnica es recomendable que al ajustar el pH, se tome las medidas necesarias para que no exista error, que no haya variación en la temperatura, debido que no se usa una incubadora, sino que se deja encendido el aire acondicionado para mantener la temperatura a 22 °C.

11. ANEXOS

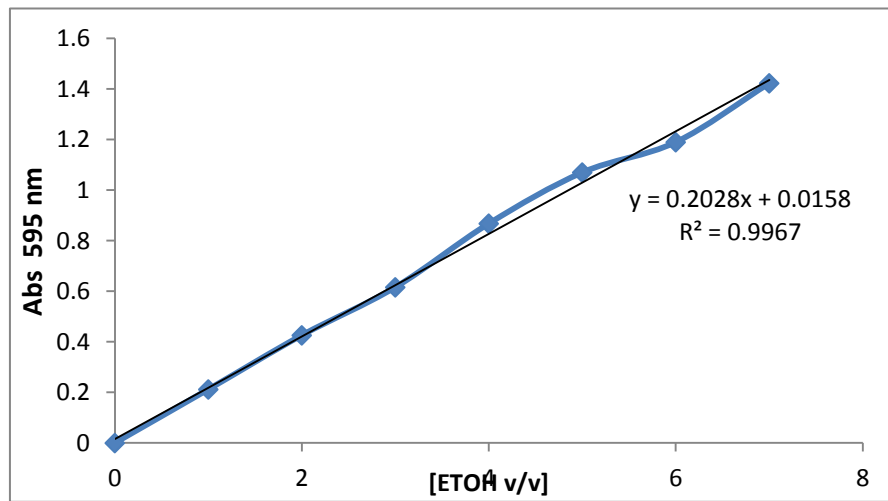
Curva patrón de azúcares reductores

[A.R] mg/mL	Abs 1	Abs 2	Abs Promedio
0	0	0	0
0.2	0.075	0.074	0.0745
0.4	0.252	0.246	0.249
0.6	0.427	0.429	0.428
0.8	0.627	0.628	0.6275
1	0.74	0.744	0.742



Curva patrón de dicromato de potasio

[ETOH] v/v	abs
0	0
1	0.212
2	0.426
3	0.616
4	0.868
5	1.07
6	1.19
7	1.423



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcántara-Hernández, R., Rodríguez-Álvarez, J., Valenzuela-Encinas, C., Gutiérrez-Miceli, F., Castañón-González, H., Marsch, R., Ayora-Talavera, T.

Alegría Mundo Horacio (2011). Evaluación de la dinámica poblacional de levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas durante la fermentación de la taberna. Tuxtla Gutiérrez Chiapas.

Amoa-Awua, W.K., Sampson, E. y Tano-Debrah, K(2006). Growth of yeasts, lactic and acetic bacteria in palm wine during and fermentation from felled oil palm (*Elaeis guineensis*) in Ghana. Journal of applied microbiology 102: 599-606.

Balik Michael J (1990). Production of coyol wine from *Acrocomia Mexicana* (Arecaceae) in Honduras. New York.

Bassir O. (1962). Observation of Palm wine. West Afr. J. Biol. Appl. Chem. 6:20-25.

Brown, A.D.; Simpson, J.R. (1972) Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. J. Gen. Microbiol. 72, 589-591.

Cadena Agroindustrial. (2004). Etanol: Análisis de Estudio de Cadena Etanol. Nicaragua.

Cabrera-Chacón T (1991). Plantas de Chiapas: usos, valores e importancia. El Coyol. No.6, Yashte del IHN. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. p.14.

Dasari, G. y cols. Biotechn. Bioengin.35, 109, 1990

Deak, T.; Beuchat, L.R. (1996) Handbook of Food Spoilage Yeasts. CRC Press, Boca Ratón, Florida.

Feldmann, Horst. (2005). Yeast Molecular Biology: A short compendium on basic features and novel aspects. University of Munich. Adolf Butenandt Institute. Munich.
Folch J., Garay A., Lledías F. y Covarrubias A. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Revista Latinoamericana de Microbiología. Vol. 46, No. 1-2. pp. 24-26.

Fleet, G. (1992) Spoilage yeasts. Cnt. Rey. Biotech. 12, 1-44.

Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldman H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H y Oliver SG (1996). Life with 6000 genes. Science 274; 543-567.

Golden, D.A.; Beuchat, L.R. (1992a) Effects of potassium sorbate on growth patterns, morphology, and heat resistance of *Zygosaccharomyces rouxii* at reduced water activity. *Can. J. Microbiol.* 38 (12), 1252-1259.

Haenh, H. 1991. *Bioquímica de las fermentaciones*. Editorial Aguilar. España. 42-48p.

Hara, S., Iimura, Y., Oyama, H., Kozeki, K., Kitano, K y Otsuka, K.(1981). The breeding of cryophilic killer wine yeasts. *Agric.Biol, Chem.*, 45, 1327-1334.

Hocking, A.D. (1993) Responses of xerophilic fungi to changes in water activity. En Jennings, D.H. (ed.), *Stress Tolerance of Fungi*, Marcel Dekker, Nueva York, pags. 248-249.

Ingram, L.O., Butke, T. *Adv. Microb. Physiol.* 25, 256, 1984

Jagnow, H y Dawid, W. *Biotecnología. Introducción con experimentos modelo*. Acribia, S.A. Zaragoza, 1991.

Myers, D.K.; Lawlor, D. [M.; Attfield, P.V. (1997) Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with a high sugar concentration by *E. cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1), 145-150.

Mc Currach CJ (1977). *Palms of the world*. Harper Brothers. New York, USA p.45.

Miran F (1975). *La vegetación de Chiapas*. Vol 1, 2ª. Edición. Ediciones del Gobierno del Estado. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. P. 235-236.

Obire O. (2005). Activity of yeast species in palm sap obtained from three areas in Edo state, Nigeria. *J Appl Sci Environ Manage*; 9: 25-30.

Okafor, N. (1972). Palm wine yeast from parts of Nigeria. *J. Food Sci. Agric.* 23:1399-1407.

Pelczar MJ, Reid R. (1993). *Microbiología*. 2ª. Edición. México, Editorial McGraw-Hill, Capítulo 16, p 271-286.

Praphailong, W.; Fleet, G.H. (1997) The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiol.* 14 (5), 459-468.

Sánchez L. (2010). Efecto del complejo enzimático producido por *Aspergillus oryzae* sobre la producción de alcohol etílico por *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones de laboratorio. Revisión de Tesis. Escuela de microbiología y parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú.

Tilbury, R.H. (1976) [The microbial stability of intermediate moisture foods with respect to yeasts. En Davies, R., Birch, G.G., Parker, K.J. (eds.). Intermediate Moisture Foods, Applied Science, Londres, pags. 138-165.

Tomasso, Mauricio. 2004. Tolerancia de las levaduras al etanol. Universidad de la República Uruguay. Facultad de Química.

Tuite, M. y Oliver, S. 1991. *Saccharomyces*. Editorial Plenum Press. New York, Estados Unidos. 272p.

Usseglio-Tomasset, L. *Química Enológica*. Mundi-Prensa. Madrid, 1998.

Uzochukwuru BUA, Balogh FE, Ngoddy PD (1991). Standard pure culture inoculums of natural fermented Palm sap. Nig. J. Microbiol. 9: 67-77.

Uzogara SG, Agu LN, Uzogara E O (1990). A review of traditional fermented food condiments and beverages in Nigeria. Their Benefits and possible problems. Ecol. Food Nutrient. 24:267-288

Zuart-Macías L, Ponce-Díaz P, Santiago Marroquín G, Quiroga-Madrigal R.(1999). Coyol palm (*Acrocomia mexicana*), a phylogenetic resource from Chiapas, México. II International Symposium on Ornamental Palms & other Monocots from the Tropics. En: ISHS Acta Horticulturae 486. Editor Caballero-Ruano M, Tenerife, España.