

MAESTRÍA EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

**Evaluación de levaduras aisladas de mostos de
henequén (*Agave fourcroydes*) para la producción de
una bebida alcohólica**

**Tesis que presenta para obtener el grado de
Maestra en Ciencias**

Magnolia del Carmen Tzec Gamboa

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México

2006

Reconocimientos

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. bajo la dirección del Dr. Alfonso Larqué Saavedra; y financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con la beca crédito (No. 183562).

Dedicatorias

A mis padres, Luís Tzec y Frida Gamboa por darme la vida, la educación y valores que se necesitan para abrirse paso en la vida. De igual manera a mis hermana Rubí, a quien admiro profundamente y que cuando mas he necesitado su apoyo ha estado cerca de mi. A mi hermano Luís por su cariño y apoyo en cada etapa de mi vida.

Agradecimientos

Al Dr. Francisco Alfonso Larqué saavedra y la Dra. Patricia Lappe Olivera por la dirección y asesoría brindada para la realización de este trabajo. Gracias por su apoyo y confianza.

Al comité revisor integrado por la Dra. Elizabeth Ortiz, Dra. Renata Rivera y al Dr. Felipe Barahona por sus valiosas sugerencias y revisión del presente escrito.

A todos con quienes compartí mi estancia en el laboratorio: Q.B.B. Mirbella Cáceres Farfán, M. C. Jesús Martínez Torres, Ing. Agr. Juliet Barroso y M. C. Luís Rendón.

A la Dra. Daisy de la caridad Pérez Brito, Lic Q. Raúl Tapia Tussell, y al I.Q. Alberto Cortés Velásquez por permitirme hacer uso del Laboratorio GeMBio, sus amables consejos e inestimable amistad.

Al M.C. Rafael López Cetz por su apoyo durante la realización experimental de este trabajo y las facilidades otorgadas para la utilización de equipos del laboratorio de química aplicada de la Facultad de Química (UADY).

A quienes siempre me brindaron su apoyo desinteresado, pero sobre todo su valiosa amistad Silvia Vergara Yoisura, Ing. Agr. Rodolfo Martín Mex e Ing. Agr. Ángel Nexticapan. Muchas Gracias!

A mis amigos Delia, Laura, Susana, Rubí y a todos mis compañeros de la maestría, por los gratos momentos compartidos y a todas las personas que de alguna manera participaron en el desarrollo de este trabajo.

Contenido

Índice de Figuras	iv
Índice de Tablas	v
Lista de Abreviaturas	vi
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Capítulo 1. Antecedentes.....	5
1.1. Productos fermentados del mundo.....	5
1.2. Alimentos fermentados de México	6
1.3. Los agaves	7
1.4. Bebidas alcohólicas obtenidas a partir de agaves.....	7
1.5. El henequén.....	9
1.5.1. Importancia económica actual.....	9
1.5.2. Contenido de azúcares de los agaves.....	10
1.6. Definición de levadura.....	11
1.6.1. Características de las levaduras	12
1.6.2. Distribución de las levaduras en la naturaleza	12
1.6.3. Metabolismo y cinética de crecimiento de las levaduras	13
1.7. Fermentación alcohólica	14
1.7.1. Etapas de la fermentación alcohólica	17
1.7.2. Productos secundarios de la fermentación alcohólica	18
1.8. Selección de cepas para ser utilizadas como inóculo.....	19
1.9. Microbiota de bebidas alcohólicas de diferentes especies de Agave.....	20
1.10. Objetivos.....	23
1.10.1. General	23
1.10.2. Particulares	23

1.11. Literatura Citada	24
Capítulo 2. Materiales y Métodos.....	29
2.1. Microorganismos.....	29
2.2. Cinética de crecimiento de cepas de levaduras en medio de glucosa extracto de levadura y peptona (GELP)	30
2.3. Prueba de tolerancia a diversas concentraciones de etanol.....	30
2.4. Materia prima	31
2.5. Obtención del mosto	31
2.6. Preparación del medio de fermentación y condiciones físicoquímicas del proceso	31
2.7. Determinación del pH.....	32
2.8. Determinación de azúcares.....	32
2.9. Rendimiento en la producción de etanol	33
2.10. Determinación de los parámetros cinéticos.....	34
2.11. Literatura Citada	35
Capítulo 3. Resultados y Discusiones.....	37
3.1. Cinética de crecimiento de los diferentes aislados de levaduras en medio de GELP.....	37
3.2. Tolerancia a diversas concentraciones de etanol.....	40
3.3. Incremento de biomasa en el mosto	42
3.4. Parámetros cinéticos de crecimiento en el mosto	44
3.5. Cambios en el pH durante la fermentación	45
3.6. Evaluación del consumo de sólidos solubles durante la fermentación	45
3.7. Evaluación del consumo de ART durante la fermentación	48
3.8. Evaluación del consumo de ARD durante la fermentación.....	51
3.9. Producción de etanol	57
3.10. Parámetros cinéticos.....	62
3.11. Literatura Citada	64

Conclusiones	67
Perspectivas	69
Anexo	71

Índice de Figuras

Figura 1.1. Reacciones involucradas en la conversión de glucosa a etanol en una fermentación alcohólica, realizada por levaduras.	16
Figura 2.1. Diagrama de flujo de la fermentación alcohólica, realizada utilizando los diversos aislados de levaduras como inóculo para fermentar el mosto rectificado de <i>A. fourcroydes</i> utilizado en la presente investigación.	32
Figura 3.1. Cinética de crecimiento en medio GELP incubado en oscuridad a 37 °C y agitación constante (80 rpm)..	38
Figura 3.2. Cinética de crecimiento de los diferentes aislados en mosto rectificado e incubado a 37 °C en oscuridad. (a) Mosto inoculado con aislados autóctonos de K..	43
Figura 3.3. Cinética del consumo de sólidos solubles de los diferentes aislados en mosto rectificado e incubado a 37 °C en oscuridad..	46
Figura 3.4. Cinética del consumo de azúcares reductores totales de los diferentes aislados en mosto rectificado e incubado a 37 °C en oscuridad.....	50
Figura 3.5. Cinética del consumo de azúcares reductores directos de los diferentes aislados en mosto rectificado e incubado a 37 °C en oscuridad.....	53
Figura 3.6. Cinética de producción de etanol de los diferentes aislados en mosto rectificado e incubado a 37 °C en oscuridad..	59

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Especies de levaduras aisladas de bebidas alcohólicas obtenidas de diferentes especies de <i>Agave</i> y de <i>Dasyilirion</i>	20
Tabla 1.2. Especies de levaduras aisladas del mosto durante el proceso de elaboración del licor de henequén y del tequila	22
Tabla 2.1. Especies de levaduras empleadas como inóculo para la fermentación de mosto rectificado de henequén.	29
Tabla 3.1. Determinación de la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$) y del tiempo de duplicación (td), de aislados de <i>K. marxianus</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. colliculosa</i> , <i>C. guilliermondii</i> y <i>S. cerevisiae</i> , crecidas en GELP incubado en oscuridad a 37 °C, y agitación constante (80 rpm).	39
Tabla 3.2. Determinación de la tolerancia a diversas concentraciones de etanol de los diferentes aislados de levadura.	41
Tabla 3.3. Determinación de la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$) y del tiempo de duplicación (td), de aislados de <i>K. marxianus</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. lusitaniae</i> , durante la fermentación alcohólica de mosto de <i>A. fourcroydes</i>	44
Tabla 3.4. Concentración final de los sólidos solubles (°Brix) durante la fermentación alcohólica de mosto rectificado, incubado a 37 °C en oscuridad e inoculado con diferentes aislados de <i>K. marxianus</i> , <i>C. lusitaniae</i> y <i>S. cerevisiae</i>	47
Tabla 3.5. Resultados de las pruebas de fermentación de nueve carbohidratos realizadas a los aislados de levaduras obtenidas de hojas y mosto de henequén.	55
Tabla 3.6. Productividad de los diversos aislados evaluados en la producción de etanol durante la fermentación en mosto.	60
Tabla 3.7. Principales parámetros cinéticos registrados durante la fermentación del mosto rectificado de henequén a 37 °C, en oscuridad, con los diferentes aislados de levaduras.	63

Lista de Abreviaturas

Abs	Absorbancia
ARD	Azúcares reductores directos
ART	Azúcares reductores totales
ARI	Azúcares reductores indirectos
GELP	Glucosa, extracto de levadura, peptona
YM	Glucosa, extracto de malta, extracto de levadura, peptona
NCBI	National Center for Biotechnology Information
°Brix	Grados Brix
μ máx	Velocidad específica máxima de crecimiento
td	Tiempo de duplicación
Yp/s	Coeficiente de rendimiento de etanol
E%	Eficiencia en porcentaje
P	Productividad

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo principal, la evaluación en la producción de etanol de aislados de levaduras obtenidas de las hojas de henequén (*Agave fourcroydes*) y de una fermentación natural del mosto, para seleccionar aquellas que mostraran un buen rendimiento para ser utilizadas como inóculo en un proceso controlado y a gran escala. Se evaluaron ocho aislados autóctonos de las especies *Kluyveromyces marxianus* (4), *Candida guilliermondii* (1), *Candida colliculosa* (1), *Candida parapsilosis* (1) y un aislado alóctono de *Saccharomyces cerevisiae*. Después de comparar las cinéticas de las fermentaciones en el mosto, se observó que los aislados de *K. marxianus* mostraron la mejor adaptación. Esta especie se ha encontrado comúnmente asociada a diversas especies de agaves y a varias bebidas alcohólicas elaboradas con ellas. De los cuatro aislados de *K. marxianus*, el denominado Cicy Ki fue el más adaptado al mosto, con una eficiencia en la fermentación del 81% y un rendimiento en la producción de etanol de 1.45 g/ L de mosto/ hora. Por otra parte, las especies *C. guilliermondii*, *C. colliculosa* y *C. parapsilosis*, aunque fueron aisladas de mosto de agave recién extraído, no fueron capaces de adaptarse, crecer y fermentar el mosto rectificado empleado como sustrato para la fermentación, pues no se observó variación en los sólidos solubles (°Brix), ni en la turbidez del medio. El aislado alóctono de *S. cerevisiae* tuvo una eficiencia en la fermentación del 80%; sin embargo este microorganismo requirió más tiempo para adaptarse al mosto, para finalizar con una productividad de etanol de 1 g/ L de mosto/ hora. En base a los resultados obtenidos se propone a la cepa Cicy Ki (*K. marxianus*) para ser utilizada como inóculo en los procesos de fermentación del mosto de *A. fourcroydes*, para la obtención de una bebida alcohólica.

Abstract

The main objective of this work was to evaluate yeast isolates obtained from henequen leaves (*Agave fourcroydes*) and a natural fermentation of the must, in order to select those which showed a good yield in ethanol production and which could be used as inoculum in a large scale process. Eight autochthonous isolates of the species *Kluyveromyces marxianus* (4), *Candida guilliermondii* (1), *Candida colliculosa* (1), *Candida parapsilosis* (1) and one allochthonic isolate of *Saccharomyces cerevisiae* were evaluated. After comparing the kinetics of the fermentations in the must, the isolates of *K. marxianus* showed the best adaptation. This species has commonly been found in association with different species of agaves and with various alcoholic beverages elaborated from them. Of the four isolates of *K. marxianus*, the one denominated Cicy Ki showed the best adaptation to the must, with a fermentation efficiency of 81% and an ethanol yield production of 1.45 g/L of must/ hour. In the case of *C. guilliermondii*, *C. colliculosa* and *C. parapsilosis*, although they were isolated from freshly extracted agave must, they proved unable to adapt, grow and ferment the rectified must used as substrate for the fermentation, as no variation in the soluble solids (°Brix), or in the turbidity of the media was observed. The allochthonous isolate of *S. cerevisiae* registered a fermentation efficiency of 80%, this microorganism required a longer adaptation period to the must, and the ethanol productivity was 1 g/L of must/ hour. Based on these results, the Cicy Ki strain (*K. marxianus*) is proposed for use as an inoculum in the fermentation processes of *A. fourcroydes* must, for the elaboration of alcoholic beverages.

Introducción

El henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) es nativo de la península de Yucatán. Entre las principales características de esta planta, destaca la calidad y el alto contenido de su fibra, así como su buena adaptabilidad a condiciones ambientales adversas. A principios del Siglo XX, México era el principal productor de fibras naturales de henequén, ubicándose a la vanguardia de este mercado a nivel internacional (Castorena-Sánchez *et al.*, 1991).

Al finalizar la Primera Guerra Mundial comenzó el auge de las fibras sintéticas, las que desplazaron a las naturales; lo anterior, unido al incremento en el cultivo del henequén en el este de África y Brasil, llevó a la industria henequenera yucateca a un declive que se agudizó con el transcurso de los años y que provocó un fuerte impacto económico y social en Yucatán (García & de Sicilia, 1984).

En 1999 se inició en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) un desarrollo tecnológico enfocado a la producción de una bebida alcohólica a partir de la destilación de los mostos fermentados del henequén, el que se patentó en el 2004 ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI; Patente Mexicana No. 219235) (Larqué-Saavedra *et al.*, 2004).

Una etapa fundamental de este proceso es la fermentación, en la que las levaduras son los microorganismos clave ya que a partir del mosto producen etanol y compuestos volátiles que influyen en el sabor y aroma del producto final (Pinal *et al.*, 1997).

El uso de levaduras comerciales alóctonas aisladas de otros sustratos como vino, cerveza o pan, afecta el proceso de fermentación ya que las levaduras alóctonas deben adaptarse al nuevo sustrato; lo anterior retrasa el proceso, y afecta la síntesis de algunos metabolitos secundarios y de otros productos volátiles que influyen en el perfil sensorial del producto (Fleet, 2003; Cedeño, 1995).

Actualmente en la industria vinícola y del tequila existe la tendencia a utilizar cepas autóctonas o nativas, aisladas de fermentaciones espontáneas de mostos de uva o agave, como inóculo simple o mixto para

la fermentación a escala industrial. Esto ofrece diversas ventajas como la reducción o eliminación de la fase de adaptación, lo que se traduce en una disminución del tiempo de fermentación; la utilización de una cantidad menor de inóculo para iniciar el proceso, un control menos riguroso de los parámetros físico-químicos durante la fermentación, y la síntesis de una mayor cantidad de productos volátiles que influyen en el perfil sensorial de la bebida al emplear inóculos mixtos (Torija *et al.*, 2001; Cedeño, 1995).

El objetivo del presente trabajo, fue seleccionar a partir de aislados de levaduras obtenidos de plantas y mostos de henequén, aquellas que presentaran una alta eficiencia en la producción de etanol, para ser utilizadas como inóculo en la elaboración de un licor de henequén.

Capítulo 1. Antecedentes

1.1. PRODUCTOS FERMENTADOS DEL MUNDO

La fermentación se define como un proceso por el que se obtiene energía en ausencia de oxígeno. Las fermentaciones han estado presentes en la Tierra desde hace millones de años. Mucho tiempo antes de que el hombre apareciera, como lo demuestran los restos de microorganismos fósiles encontrados en rocas de aproximadamente 350 mil millones de años de antigüedad (Steinkraus, 1993).

Las fermentaciones alimentarias son cambios microbiológicos /enzimáticos en los sustratos que generan sabores, aromas y texturas aceptables para el consumo humano y en las cuales los microorganismos constituyen la clave del proceso (Steinkraus, 1993); son tecnologías muy antiguas, utilizadas por diversas culturas con la finalidad de conservar sus alimentos, por lo que han sido parte de la dieta del hombre y los animales desde tiempos inmemoriales.

Los primeros alimentos fermentados consumidos por el hombre probablemente fueron los vinos de miel y de bayas. Algunos antropólogos señalan que la dependencia del hombre hacia el alcohol ocasionó que éste se volviera sedentario e iniciara el cultivo de la vid (Battcock & Azam-Ali, 1998). De acuerdo a lo anterior se puede plantear que la producción de alimentos y bebidas modificados mediante procesos de fermentación ha sido una práctica común desde hace aproximadamente 10, 000 años; esto es, antes de que se reconociera la existencia de los microorganismos. Demain y colaboradores (1998) señalan que la elaboración de cerveza se originó en Sumeria en el 7 000 a.C; de ahí el arte de su elaboración pasó a Babilonia y posteriormente a Egipto, región en la que hacia el año 3 000 a.C. la elaboración de la cerveza y el pan se realizaban de manera simultánea utilizando los subproductos de la industria cervecera como inóculo para la producción de pan (Demain *et al.*, 1998; Battcock & Azam-Ali, 1998).

Las primeras referencias sobre la obtención de bebidas alcohólicas se hallaron en China en 10.000 a.C. y en ellas se describe el empleo de cereales enmohecidos denominados "chu" como inóculo para la fermentación (Battcock & Azam-Ali, 1998).

Actualmente en el mundo existe una amplia diversidad de alimentos fermentados. Cada país tiene alimentos tradicionales o autóctonos que son representativos de su cultura, su tipo de dieta y de los ingredientes disponibles en cada región. A través de los siglos estas tecnologías ancestrales se han modificado y mejorado gradualmente debido a la búsqueda del hombre para lograr la optimización del proceso de fermentación (Battcock & Azam-Ali, 1998).

1.2. ALIMENTOS FERMENTADOS DE MÉXICO

En México, desde la época prehispánica, los alimentos y bebidas fermentados han sido de gran importancia en la vida diaria y ceremonial de los numerosos grupos indígenas; la tradición de su consumo ha continuado hasta la época actual, no sólo por los grupos étnicos pues en mayor o menor grado, los grupos mestizos, y en forma más restringida, los criollos y los de inmigración reciente, aceptan esporádicamente algunos de dichos productos (Herrera, 1993).

Las bebidas y alimentos fermentados mexicanos pueden ser clasificados de acuerdo con los vegetales y las materias primas que se utilizan en su elaboración y con base en su composición química. En términos generales, puede hacerse una clara distinción entre los productos fermentados alcohólicos y ácidos, en tanto que otra clasificación los divide en: autóctonos o indígenas y alóctonos o de origen extranjero (Herrera, 1993).

Todos los productos fermentados mencionados hasta ahora no son destilados, pues en el México prehispánico se desconocía el alambique de cobre. Sin embargo muchas bebidas tradicionales como el tequila, el mezcal, el sotol y la bacanora son productos destilados de origen posthispánico obtenidos a partir de mostos fermentados de diversas especies de *Agave* y *Dasyliirion*. Se desconoce si en el México prehispánico existían las bebidas alcohólicas destiladas, ya que investigaciones arqueológicas recientes señalan la existencia de alambiques de barro en varias regiones del país (Brumann, 2000; Gentry, 1982).

1.3. LOS AGAVES

La familia *Agavaceae* incluye ocho géneros y 273 especies. Se encuentra distribuida en el continente americano desde el sureste de EUA hasta Colombia y Venezuela, incluyendo todas las islas del Caribe, las Bahamas, Aruba, Curacao y Trinidad y Tobago. México es su centro de origen y en él se encuentra la mayor diversidad con 205 especies, de las cuales 151 son endémicas. Los estados más ricos en número de especies son Oaxaca, Chihuahua, Sonora, Coahuila, Durango y Jalisco (Dahlgren *et al.*, 1985; García-Mendoza *et al.*, 1993).

El uso de los agaves en México se remonta a la época precolombina, cuando los pueblos indígenas encontraron en esta planta una fuente abastecedora de materia prima para elaborar numerosos productos de gran importancia en la alimentación humana, tal como se refiere en los diferentes códigos prehispánicos (García-Mendoza *et al.*, 1993) y como lo atestiguan restos de fibras encontrados en Coahuila y Teotihuacán que datan de 8,000 y 6,000 años, respectivamente. Hacia el año 2 000 a.C., los agaves ya eran cultivados por los habitantes de Tula, Tulancingo y Teotihuacan con el fin de obtener aguamiel (Gentry, 1982).

Los agaves tienen amplios usos y prácticamente puede emplearse toda la planta. Sin embargo, algunos han sido seleccionados para un uso en particular, ya sea como alimento o para la obtención de la fibra, con la cual se confeccionan cuerdas, sandalias, bolsas etc.

1.4. BEBIDAS ALCOHÓLICAS OBTENIDAS A PARTIR DE AGAVES

Uno de los usos más importantes de los agaves es la obtención de bebidas alcohólicas obtenidas por fermentación del jugo dulce de las piñas o cabezas cocidas (vino de mezcal), de la savia o aguamiel (pulque) y de bebidas destiladas elaboradas por la destilación de los mostos cocidos y fermentados de varias especies de *Agave*, como el mezcal o tequila (Brumann, 2000; Gentry, 1982).

La palabra pulque proviene del vocablo náhuatl "poliuhqui" (podrido, putrefacto), haciendo alusión a un pulque descompuesto (Herrera, 1993). El pulque es la bebida de agave más antigua que se conoce y que aún se produce; su origen se remonta varios años a.C y algunos historiadores consideran que fueron los antiguos Otomíes los primeros en elaborarlo. Su

importancia en las civilizaciones precortesianas está plasmada en la mayoría de los códigos mexicanos (Lappe & Ulloa, 1993).

El pulque fue para los aztecas una bebida-alimento divino, una medicina y un intoxicante ritual relacionado con su cosmología y con determinadas actividades agrícolas y de la vida cotidiana como la recolección de la cosecha, las ceremonias propiciatorias de la lluvia, el matrimonio, los nacimientos y los entierros. Sin embargo, con la caída del imperio azteca el pulque perdió su importancia dentro de los rituales y en la actualidad permanece sólo como una bebida popular, que algunos consideran la bebida nacional de México (García-Mendoza *et al.*, 1993; Lappe & Ulloa, 1993).

El pulque se obtiene por fermentación del aguamiel o savia que emana al cortar el brote floral de diversas especies de magueyes pulqueros. Particularmente de *A. salmiana* var. *salmiana*, *A. atrovirens*, *A. mapisaga*. Estas especies son cultivadas en el centro del país en los estados de Hidalgo, Tlaxcala, Querétaro, Estado de México, Michoacán, Distrito Federal, Puebla y Oaxaca (Lappe & Ulloa; 1993).

La palabra mezcal o mexcal proviene del náhuatl "metl" (maguey) e "ixcalao" (asar), es decir, maguey asado, aludiendo a su proceso de elaboración. Es el nombre genérico de las bebidas alcohólicas, incluyendo el tequila, que se obtienen por destilación de los mostos fermentados de varias especies de agaves (Herrera, 1993).

Los mezcales más conocidos son el mezcal de Durango, que se elabora con *A. kirchneriana* y *A. cupreata*; la bacanora y la lechuguilla de Sonora, que se obtienen a partir de *A. pacífica* y *A. lechuguilla*, respectivamente; y el mezcal de Oaxaca, famoso por su tradición, y que se produce con *Agave potatorum*, *A. angustifolia* y *A. esperima* (Gentry, 1982).

Sin embargo, el tequila es el mezcal mas conocido, denominado así por la región de Tequila, Jalisco, en donde se elabora y en la que existe una industria tradicional muy importante desde finales del siglo XVIII. En su elaboración se utiliza únicamente el *A. tequilana* Weber var. Azul como materia prima (Muria, 1990).

1.5. EL HENEQUÉN

El henequén (*A. fourcroydes*) es una especie de agave conocida mundialmente por la calidad e importancia de su fibra. Es un cultivo altamente productivo en áreas ecológicamente limitadas por la escasez de agua y pobreza de nutrientes en el suelo. Fue domesticado por los mayas en la época prehispánica a partir de la especie silvestre *A. angustifolia* (Castorena-Sánchez *et al.*, 1991).

En México es cultivado principalmente en el estado de Yucatán, aunque también se ha explotado en otras regiones del país y en otros países como Cuba, Brasil y este de África a partir del germoplasma yucateco (Colunga-GarcíaMarín, 1998).

Durante la época colonial la producción del henequén se incrementó debido a su importancia como fuente de fibra, ya que era utilizada para la fabricación de cables para navegación. El mayor auge de este cultivo fue la primera mitad del siglo XX debido a la fuerte demanda de fibra en EUA, lo que convirtió al henequén en el segundo producto de exportación del país después de la plata y al estado de Yucatán en el más rico de la república en ese momento (García & de Sicilia, 1984).

Después de la primera guerra mundial Yucatán perdió su posición dominante en la producción de las fibras duras debido al incremento en el cultivo de henequén en el este de África y Brasil, así como a la sustitución de las fibras naturales por fibras sintéticas. Esto ocasionó la caída de la industria henequenera en el estado de la cual no se ha podido recuperar (Eastmond *et al.*, 2000).

1.5.1. Importancia económica actual

La importancia económica del henequén radica en que satisface las necesidades de fibra en el estado de Yucatán y permite la exportación de artículos artesanales, además de tener un potencial de aprovechamiento integral: del jugo se pueden obtener esteroides y alcoholes; el bagazo puede ser empleado como alimento para el ganado y fermentado y secado puede utilizarse como abono, ya sea solo o en combinación con el suelo en el cultivo de plántulas de henequén y otras especies vegetales (Gentry, 1982; Eastmond *et al.*, 2000); por otra parte, la planta puede procesarse industrialmente para la obtención de papel o celulosa (Cazaurang *et al.*, 1990).

Además de los usos antes mencionados, existen evidencias en varios escritos acerca del aprovechamiento del henequén para la elaboración de bebidas alcohólicas. En 1910, se informó en una nota periodística que en la hacienda Yaxché de Peón, municipio de Mérida, se obtuvieron 360 litros de alcohol de 40° GL a partir de 2, 160 litros del jugo obtenido durante el desfibrado de hojas de henequén. Posteriormente, en 1967 la Unión de Crédito Agrícola presidida por Solís Aznar, financió una fábrica para la producción del tequila yucateco (T'Kí'la), usando como materia prima las piñas de plantas que habían terminado su ciclo productivo (aparición del varejón). La producción se estimó en aproximadamente 26, 000 litros de alcohol. Sin embargo, problemas jurídicos con los productores tequileros del estado de Jalisco y la falta de comercialización, hicieron fracasar el proyecto (Larqué-Saavedra *et al.*, 2004)

Posteriormente, Cordemex reportó la obtención de alcohol etílico por fermentación de la celulosa del bagazo de las hojas degradadas por enzimas. El rendimiento fue de 1 L de etanol/ 4.16 Kg. de bagazo. También se estudió la posibilidad de obtener etanol de la piña de henequén, un subproducto de la industria de la fibra, aprovechando los azúcares contenidos en ella; para ello se utilizó una metodología similar a la empleada para producir mezcales. Sin embargo, se consideró que la producción de etanol era muy baja para competir en el mercado (Larqué-Saavedra *et al.*, 2004).

1.5.2. Contenido de azúcares de los agaves

Algunas especies de plantas, entre ellos los agaves, tienen como sustancias de reserva carbohidratos polímeros de fructosa (fructosanos), como la inulina, que presentan moléculas más pequeñas y más solubles en agua que las de almidón. La cantidad y el tipo de azúcares que contienen las piñas de agave son muy importantes, debido a que estos son el sustrato que utilizan las levaduras durante el proceso de fermentación para la producción de etanol. El contenido de inulina en *A. tequilana* Weber es de un 20-24% y durante la cocción de las piñas se degrada originando, principalmente, varias moléculas de fructosa, alrededor de un 20% de sacarosa y el trisacárido 1- β -fructosil inulobiosa (Bautista-Justo *et al.*, 2001).

El contenido promedio de azúcares reductores totales (ART) en los agaves varía entre el 20 y el 30% de su peso fresco (Granados, 1993) y se

conforman por los azúcares reductores directos (ARD) y los azúcares reductores indirectos (ARI). La fructosa y la glucosa son azúcares reductores directos que tienen en su estructura grupos aldehídos o cetonas libres que reaccionan como agentes reductores libres, por lo que pueden ser fermentados por las levaduras para producir alcohol y bióxido de carbono. Además pueden interactuar con las proteínas dando como resultado la caramelización o reacción de Maillard. Los azúcares reductores indirectos o no reductores están formados por azúcares simples unidos a través de sus grupos carbonilos y por lo tanto no son reductores hasta que son hidrolizados a azúcares más simples (Téllez, 1998).

Considerando la aceptación que tienen el mezcal y el tequila en el mercado internacional, así como los antecedentes en cuanto a la producción de etanol a partir de piñas de henequén que quedan como subproducto de la industria de la fibra, Larqué y colaboradores (2004) adaptaron la tecnología de producción del mezcal para elaborar un licor regional (patente No. 219235), mediante la fermentación y destilación de los mostos extraídos de las piñas de henequén cocidas lentamente.

1.6. DEFINICIÓN DE LEVADURA

El término levadura se asocia, en diferentes idiomas, con palabras que significan espuma o levantamiento y que describen la apariencia o características de los procesos de fermentación que dan origen a la cerveza o el pan. Dichas palabras derivan ya sea del latín “*levare*” que significa levantar o crecer, o del griego “*zestos*” que significa hervir. Ambos hacen referencia a la producción de bióxido de carbono (CO₂) durante la fermentación, que en sustratos líquidos ocasiona la formación de espuma y en sustratos sólidos, como el pan, el crecimiento o levantamiento de la masa (Phaff, 1966).

Las levaduras son hongos unicelulares que no constituyen una entidad taxonómica real, sus teleomorfos se clasifican en los *phyla* Ascomycota y Basidiomycota del reino Fungi. Incluyen más de 800 especies, clasificadas en 100 géneros, se estima que este número corresponde sólo al 1% de las especies que existen en la naturaleza (Kurtzman & Fell, 1998).

1.6.1. Características de las levaduras

La forma y dimensión celular de las levaduras es diversa; pueden ser esféricas, ovales, elípticas, cilíndricas, lo cual depende de diversos factores, como el sustrato en el que viven y la edad. Toleran amplios intervalos de pH (3 a 11) y de temperatura (0 a 45 °C), aunque algunas pueden soportar hasta 50 °C (Kurtzman & Fell, 1998). Su reproducción vegetativa o asexual es por gemación o fisión. Cuando se reproducen por gemación, la célula madre desarrolla una yema o brote que representa a la célula hija; ésta sigue creciendo hasta que alcanza un tamaño similar al de la madre y entonces se separa (Owen, 1989). Sin embargo, ambas pueden quedar unidas formando cadenas de células llamadas pseudomicelio. Algunas levaduras pueden desarrollar filamentos largos con septos, los que constituyen el micelio verdadero (Herrera & Ulloa, 1990). Cuando las condiciones son adversas la mayoría de las levaduras se reproducen sexualmente generando ascas y ascosporas, o basidios y basidiosporas, las cuales no quedan confinadas dentro de un cuerpo fructífero (Kurtzman & Fell, 1998).

1.6.2. Distribución de las levaduras en la naturaleza

Las levaduras se encuentran distribuidas en la naturaleza formando comunidades, constituidas por varias poblaciones de diferentes especies. Generalmente se asocian con hábitats que contienen azúcares, por lo que es frecuente encontrarlas en la superficie de frutas maduras y dañadas, tallos, hojas y exudados de plantas, en fermentaciones o en ambientes creados por el hombre (Arana, 1990; Kurtzman & Fell, 1998).

En un mismo hábitat coexisten tanto especies de levaduras autóctonas como alóctonas. Las autóctonas son componentes esenciales de la comunidad y ocupan un hábitat singular, por lo que se consideran especialistas, que de acuerdo a sus habilidades nutricionales son oligotróficas, es decir, necesitan pocas fuentes alimenticias para desarrollarse. Las alóctonas son especies transitorias en la comunidad, se presentan fortuitamente, están dotadas de un nicho amplio que les permite ocupar varios hábitats, y se consideran politróficas, es decir, que tienen la capacidad de asimilar gran cantidad de nutrientes (Arce, 2003).

Las levaduras son diseminadas por diversos vectores, principalmente insectos, debido a la importancia nutricional de esos microorganismos en

el ciclo de muchas especies de insectos (Phaff, 1966), con las cuales establecen fuertes relaciones mutualistas (Arce, 2003).

1.6.3. Metabolismo y cinética de crecimiento de las levaduras

El metabolismo que predomina en las levaduras en condiciones aerobias es el oxidativo, pero algunas especies, además de éste, presentan en condiciones anaerobias, uno fermentativo. Las levaduras producen un número reducido de enzimas por lo que sólo hidrolizan algunos compuestos, principalmente azúcares (Kreger-van Rij, 1984). Debido a esta característica son utilizadas en varios procesos industriales para la obtención de bebidas alcohólicas, biomasa y varios productos metabólicos como enzimas, vitaminas, polisacáridos, pigmentos carotenoides, alcoholes polihídricos, lípidos, glicolípidos, ácido cítrico, etanol, dióxido de carbono, y además de productos sintetizados por la introducción de ADN recombinante en las levaduras, en algunas fases de la producción de antibióticos y hormonas esteroides. Algunos de estos productos son generados comercialmente, mientras que otros son potencialmente valiosos en biotecnología (Demain *et al.*, 1998; Olalde, 2003)

Debido a que las levaduras son organismos facultativos, tienen la capacidad de producir energía para su uso, a partir de productos orgánicos bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

En condiciones aerobias el azúcar es metabolizado a la formación de dióxido de carbono (CO_2) y agua, para la producción de energía. En estas condiciones las levaduras se multiplican rápidamente, con un rendimiento en biomasa muy alto (1 g de levadura por cada 4 g de azúcar consumidos).

Bajo condiciones anaerobias, la producción de energía por molécula de azúcar es menor, llevándose a cabo la fermentación de los azúcares de forma incompleta y generando etanol, CO_2 y energía. De igual manera, si existe una alta concentración de azúcares en el medio puede llevarse a cabo la producción de alcohol en condiciones de aerobiosis. En estas condiciones el rendimiento en biomasa es de 1 g de levadura por cada 100 g de azúcares consumidos y el rendimiento neto es de dos moléculas de ATP (Mesas & Alegre, 1999; Suomalainen & Oura, 1971).

Durante el metabolismo oxidativo las levaduras se multiplican rápidamente, por lo que la composición del medio de cultivo, la

concentración de biomasa y la de metabolitos en el sustrato cambia de forma continua. Durante la cinética de crecimiento es posible distinguir cuatro etapas (Shuler & Kargi, 2002).

Fase de latencia. Es la etapa de adaptación de los microorganismos a su nuevo ambiente; en ella existe inicialmente un aumento en el número de células muy lento, principalmente se observa un aumento en la biomasa de las células.

Fase exponencial. Las células están adaptadas a las nuevas condiciones y el crecimiento de la masa celular puede ser descrito cuantitativamente, en función de la duplicación del número de células por unidad de tiempo (td). Aunque las células alteran el medio debido a la utilización del sustrato, y a la secreción de productos metabólicos, la velocidad de crecimiento permanece constante. Durante esta etapa, la representación del crecimiento exponencial es una línea recta. Durante la fase exponencial las células comienzan a mostrar sus características visibles: morfología, color de sus colonias, y densidad. En esta fase las células son metabólicamente más activas (Shuler & Kargi, 2002):

Fase estacionaria. La biomasa aumenta sólo gradualmente o permanece constante debido a que el sustrato ha sido metabolizado y se han formado o sintetizado sustancias tóxicas. Como resultado el crecimiento desciende o se inhibe.

Fase de muerte. En esta fase las reservas de energía de las células se agotan, lo que impide la supervivencia del microorganismo, ocasionando la inactivación de células y posteriormente la muerte (Shuler & Kargi, 2002; Crueguer & Crueguer, 1993).

1.7. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

Es un proceso bioquímico anaerobio por el cual las levaduras transforman los azúcares en etanol, bióxido de carbono y agua (Sols *et al.*, 1971). Su ecuación fue propuesta por Gay-Lussac (1815):



Las levaduras utilizan los azúcares del medio, principalmente glucosa, para llevar a cabo la fermentación alcohólica el cual requiere como primer paso, de un transporte facilitado de la glucosa a través de la membrana

plasmática, la cual es altamente impermeable aún a los compuestos del tamaño de los azúcares. Este transporte puede llevarse a cabo bajo condiciones equilibradas por difusión facilitada (Sols *et al.*, 1971).

La primera serie de reacciones involucra la conversión de glucosa 6-P en piruvato, por medio de la ruta Embden-Meyerhof. Una vez que la glucosa es transportada al interior de las células, comienza su fosforilación hacia glucosa 6-P (Paso 1, Figura 1.1), la enzima encargada de llevar a cabo esta reacción irreversible es una *hexoquinasa*, y por medio de un arreglo la *glucosafofato isomerasa* mantiene un equilibrio entre glucosa 6-P y fructosa 6-P (Paso 2, Figura 1.1); la siguiente reacción es la fosforilación de la fructosa 6-P a fructosa 1,6-difosfato (Paso 3, Figura 1.1) catalizada por la enzima *fosfofructoquinasa*, finalmente la conversión de fructosa 1,6-difosfato a piruvato es llevado a cabo cuando una *aldolasa* cataliza la ruptura de la fructosa 1,6-difosfato hacia la formación de dihidroxiacetona-P y gliceraldehído 3-P (Paso 4, Figura 1.1). La interconversión de estos dos productos es catalizado por la enzima *triosafofato isomerasa*, y el equilibrio entre dichos productos esta puesto a favor de la dihidroxiacetona-P (Constante de equilibrio $K=22$), pero como el gliceraldehído 3-P es utilizado por la siguiente enzima glicolítica, la reacción transcurre en dirección de la formación de esta última. La última serie de reacciones para formar piruvato ocurre catalizada por la enzima *gliceraldehído 3-P deshidrogenasa*. Esta reacción es la única reacción oxidativa de la glucólisis, que libera una gran cantidad de energía utilizada para la incorporación de fosfato en la molécula y formar 1,3-difosfoglicerato (Paso 5, Figura 1.1). A continuación, la *fosfoglicerato quinasa* y la *fosfogliceromutasa* catalizan las siguientes dos reacciones mediante la transferencia de un grupo fosfato de 1,3-difosfoglicerato para formar el 3-fosfoglicerato + ATP (Paso 6, Figura 1.1), y la isomerización de este hacia 2-fosfoglicerato (Paso 7, Figura 1.1) respectivamente. En seguida de esta reacción, una *enolasa* cataliza la isomerización del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato por medio de una deshidratación (Paso 8, Figura 1.1). Por último la *piruvato quinasa* es la encargada de formar piruvato en una reacción acoplada a la transferencia de su energía rica en fosfato hacia la síntesis de ATP (Paso 9, Figura 1.1).

El piruvato formado en la glucólisis puede ser convertido en acetil CoA y oxidado en el ciclo del ácido tricarboxílico, o bien, hacia la formación de etanol, en este ultimo caso, el piruvato primero es descarboxilado por la *piruvato descarboxilasa* formando acetaldehído (Paso 10, Figura 1.1), el

cual es reducido a etanol por una *alcohol deshidrogenasa* dependiente de NADH_2 (Paso 11 Figura 1.1) (Sols *et al.*, 1971; Gancedo, 1986).

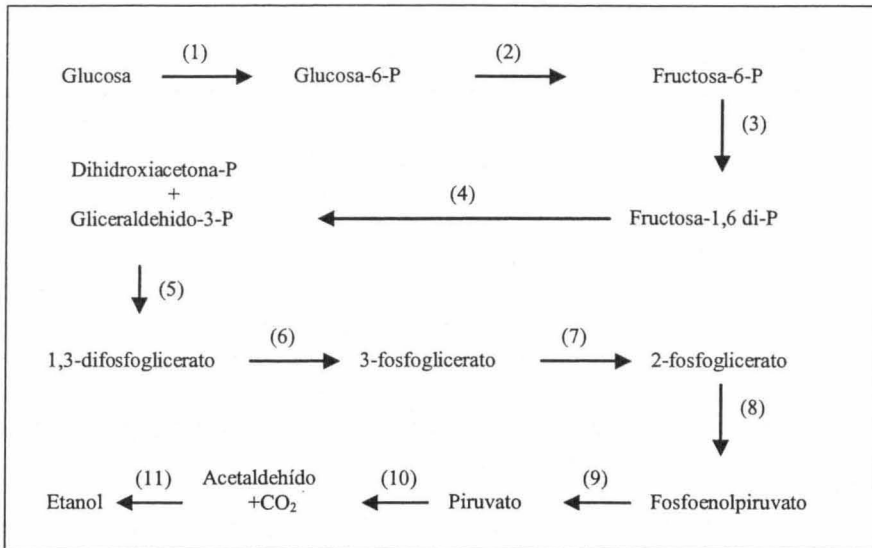
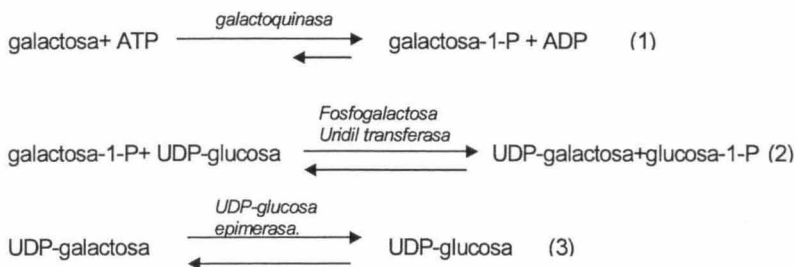


Figura 1.1. Reacciones involucradas en la conversión de glucosa a etanol en una fermentación alcohólica, realizada por levaduras (Gancedo, 1986).

Aunque la glucosa es la principal fuente de azúcar para la glucólisis, otros azúcares como la manosa, la fructosa y la galactosa también pueden entrar en la vía glucolítica. La manosa y la fructosa son transportadas dentro de la célula y fosforiladas por acción de una *hexoquinasa* en la posición 6. Puesto que la fructosa-6-P es un intermediario de la glucólisis, entra directamente en la vía. La manosa-6-P se convierte a fructosa-6-P por la *fosfomanosa isomerasa*.

La utilización de la galactosa requiere de una permeasa específica, la *galactoquinasa*, y del nucleósido difosfato uridina-diP-glucosa (UDP-glucosa). La conversión de la galactosa a glucosa-1-P ocurre de la siguiente manera:



La glucosa-1-P producida en la segunda reacción entra a la vía glucolítica después de su isomerización a glucosa-6-P por una *fosfoglucomutasa*.

El grado de fermentación alcohólica depende principalmente del inóculo utilizado, de la composición del mosto y de las condiciones fisicoquímicas (temperatura, aireación, pH, etc.) (Owen, 1989; Kunkee & Amerine, 1970).

Hay levaduras altamente productoras de alcohol, las cuales para producir un grado de alcohol consumen de 17 a 18 g de azúcar. Su capacidad para tolerar concentraciones de etanol, es variable y se ubica en el intervalo de 5% hasta 17 y 18% v/v (Mesas & Alegre, 1999).

1.7.1. Etapas de la fermentación alcohólica

La fermentación espontánea suele desencadenarse de forma natural a partir de la microbiota presente en el mosto. Se caracteriza porque en el transcurso de la misma intervienen una gran cantidad y variedad de microorganismos.

Inicialmente, el mosto es un medio adecuado para el crecimiento de los microorganismos, pero paulatinamente se vuelve inhóspito, debido a la formación y acumulación de metabolitos secundarios, así como a la disminución de azúcares reductores y de los demás macro y micro nutrientes necesarios para el metabolismo microbiano. Una vez superado el período inicial de adaptación, las poblaciones de levaduras y bacterias se incrementan rápidamente, y las especies de ambos grupos microbianos pueden coexistir o sucederse a lo largo de la fermentación (Mesas & Alegre, 1999).

Durante la fermentación alcohólica es posible distinguir dos fases, en las que se desarrollan especies de levaduras con características distintivas:

Primera fase. Se presenta al principio de la fermentación alcohólica, se caracteriza por que en el sustrato hay bajas concentraciones de etanol y una alta cantidad de nutrientes. Las levaduras que se presentan en esta fase se caracterizan por producir una gran cantidad de productos secundarios enriquecedores del sabor y del aroma del producto. Las especies más frecuentes son *Kloeckera apiculata*, *C. guilliermondii* y *Rhodotorula sp.*, que tienen un poder alcohológeno muy bajo, y especies de *Kluyveromyces* que pueden estar presentes también en la fase intermedia de fermentación (Mesas & Alegre, 1999).

Segunda fase. Ocurre en un estado avanzado de la fermentación, se caracteriza por que en el sustrato hay escasez de nutrientes y una alta concentración de etanol. Las levaduras de esta fase producen y toleran altas concentraciones de etanol. Ejemplo de especies de levaduras de esta fase son las del género *Saccharomyces* (*S. cerevisiae* y *S. bayanus*) que tiene un poder alcohológeno de 17 y 15% respectivamente, así como *Torulaspora rosei* (= *Torulaspora delbrueckii*) con 8-14%, y de fermentación lenta, por lo que la acidez volátil que genera es menor (Mesas & Alegre, 1999).

1.7.2. Productos secundarios de la fermentación alcohólica

La producción de compuestos volátiles se inicia en las primeras horas de fermentación y concluye en la fase exponencial del crecimiento de las levaduras (Pinal *et al.*, 1997). Se incrementa cuando el proceso fermentativo es lento, pero depende también de las características físico químicas bajo las cuales se realiza el proceso de fermentación, pero principalmente de las características genotípicas de las cepas de levaduras empleadas como inóculo. Se ha demostrado que cepas nativas aisladas del mosto de *Agave* sintetizan mayor cantidad de compuestos volátiles, que cepas derivadas de otros sustratos (panificación, cerveza, vino) y que frecuentemente son empleadas como inóculo en la producción de tequila (Cedeño, 1995; López, 1999).

En 2001 López determinó los compuestos volátiles mas abundantes en los tres diferentes tipos de tequila, blanco, reposado y añejo. Encontró que el 3-metilbutanol y feniletil alcohol eran más abundantes en los tipos reposado y añejo, y algunos ácidos grasos, como el ácido decanoico y el

ácido dodecanóico, se encontraron en menor proporción. La autora sugirió que estas diferencias se deben al proceso de elaboración de las bebidas, a la localización geográfica del cultivo y a la edad de los agaves (López, 2001).

En otras bebidas destiladas tradicionales de México como el mezcal, la bacanora y el sotol se identificó que después del etanol, los compuestos más abundantes en todas ellas fueron los ésteres, aldehídos, cetonas, terpenos, y ácidos orgánicos. (Vallejo-Cordoba *et al.*, 2001).

1.8. SELECCIÓN DE CEPAS PARA SER UTILIZADAS COMO INÓCULO

En la actualidad muchas industrias enfocadas a la producción de bebidas alcohólicas aún continúan con prácticas antiguas de fermentación, dejando que esta ocurra de manera espontánea, con las levaduras presentes en el sustrato y en el ambiente, es decir, no utilizan una cepa seleccionada de levadura como inóculo.

En este tipo de fermentación espontánea, se producen gran variedad de compuestos volátiles que influyen en el sabor y olor del producto final (Mateo *et al.*, 1991; Fleet, 2003). Sin embargo, con frecuencia se obtienen bajos rendimientos en la producción de etanol, se prolongan los tiempos de fermentación, en ocasiones hasta siete días, y se afecta la reproducibilidad de la calidad del producto (Cedeño, 1995; Morrissey *et al.*, 2004).

Por otra parte, otras compañías inoculan el mosto con levaduras comerciales deshidratadas (20-50 células/mL) de vinificación o panificación, lo que no es muy recomendable, ya que repercute en las características organolépticas del producto (Cedeño, 1995).

Debido a esto, algunas compañías tequileras han optado por utilizar cepas de levaduras autóctonas, aisladas de una fermentación natural del mosto (jugo de la piña cocida del agave). El desarrollo de un inóculo apropiado, con una cepa seleccionada y el establecimiento de las condiciones fisicoquímicas óptimas del proceso, han permitido una serie de ventajas en el proceso fermentativo en forma integral, lo que ha repercutido en la calidad y homogeneidad de la bebida (Arrizon & Gschaedler, 2002; Torija *et al.*, 2001).

1.9. MICOBIOTA DE BEBIDAS ALCOHÓLICAS DE DIFERENTES ESPECIES DE AGAVE

En estudios sobre la micobiota de bebidas alcohólicas obtenidas de diferentes especies de *Agave*, como pulque (Estrada-Godina *et al.*, 2001; Lappe *et al.*, 2006), aguamiel (Estrada-Godina *et al.*, 2001), mezcal (Cisneros, 1997) y de especies de *Dasyllirion* como el sotol (Cisneros, 1997), se identificaron varias especies de levaduras que se citan en la tabla 1.1.

Tabla 1.1. Especies de levaduras aisladas de bebidas alcohólicas obtenidas de diferentes especies de *Agave* y de *Dasyllirion*.

Especie	Aguamiel*	Pulque*/***	Mezcal**	Sotol**
<i>Cryptococcus spp.</i>		+		
<i>Torula sp.</i>		+		
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>		+		
<i>Pichia membranifaciens</i>		+		
<i>Rhodotorula incamata</i>		+		
<i>Saccharomycopsis sp.</i>		+		
<i>Saccharomyces pastorianus</i>		+		
<i>Saccharomyces bayanus</i>		+		
<i>Debaryomyces carsonii</i>		+		
<i>Candida sp.</i>		+		
<i>Candida colliculosa</i>		+		
<i>Candida rugopelliculosa</i>		+		
<i>Candida lusitaniae</i>	+			
<i>Candida valida</i>		+		+
<i>Candida parapsilosis</i>		+		
<i>Candida guilliermondii</i>		+		
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	+	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	+

Fuente: * (Estrada-Godina *et al.*, 2001); ** (Cisneros, 1997); *** (Lappe *et al.*, 2006).

Tamayo y colaboradores (1991) realizaron el primer estudio de la micobiota del jugo de henequén, del cual obtuvieron diez aislados de

levaduras identificadas como *Candida macedoniensis* (=K. *marxianus*), *Candida famata*, *Candida peltata* y *Candida pulcherrima*.

Lachance (1995) estudió la sucesión de la microbiota durante el proceso de elaboración y fermentación de tequila, y posteriormente Lappe y colaboradores (2004) determinaron la micobiota presente en hojas del henequén, en el mosto recién extraído de las piñas cocidas y en el mosto fermentado espontáneamente durante 24 y 48h (Tabla 1.2).

Con los antecedentes señalados y considerando el hecho de que ya se producía una bebida alcohólica a partir del henequén desde el siglo pasado, se decidió realizar el presente estudio con el fin de profundizar en el conocimiento de las levaduras presentes en las hojas y en el mosto de henequén.

Tabla 1.2. Especies de levaduras aisladas del mosto durante el proceso de elaboración del licor de henequén (LH*) y del tequila (T**).

Especie	Piña cocida		Agua de lavado		Mosto recién extraído		Mosto fermentado (24 h)		Mosto fermentado (48 h)	
	LH	T	LH	T	LH	T	LH	T	LH	T
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	+	+	+		+		+	+	+	+
<i>Candida colliculosa</i>	+	+	+	+	+	+		+		
<i>Candida fermentati</i>	+				+					
<i>Candida lusitanae</i>	+		+		+					
<i>Candida guilliermondii</i>	+		+		+					
<i>Candida parapsilosis</i>					+					
<i>Pichia siamensis</i>	+		+		+					
<i>Pichia farinosa</i>			+							
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>			+		+					
<i>Cryptococcus albidus</i>			+							
<i>Pichia membranifaciens</i>		+	+			+		+		+
<i>Rhodotorula sp.</i>		+								
<i>Candida intermedia</i>		+						+		
<i>Brettanomyces anomalus</i>		+				+		+		+
<i>Hanseniaspora spp.</i>		+		+		+		+		+
<i>Candida spp.</i>		+				+		+		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		+		+		+		+		+
<i>Pichia anomala</i>		+								
<i>Issatchenkia/Pichia sp.</i>		+								
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>		+						+		
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>		+						+		+
<i>Candida milleri</i>								+		+
<i>Candida krusei</i>								+		
<i>Brettanomyces bruxeliensis</i>								+		+
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>								+		

Fuente: *Lappe et al., 2004; **Lachance, 1995

1.10. OBJETIVOS

1.10.1. General

A partir de los aislados de levaduras obtenidos de la base de las hojas y del mosto de henequén, seleccionar aquellos que muestren mayor eficiencia en la producción de etanol durante la fermentación del mosto de henequén, para utilizarlos como inóculo en la producción de una bebida alcohólica de henequén.

1.10.2. Particulares

- Determinar la cinética de crecimiento de los aislados seleccionados de las diferentes especies de levaduras en medio de glucosa-extracto de levadura-peptona (GELP).
- Determinar la tolerancia a diferentes concentraciones de etanol de cada uno de los aislados de levadura.
- Evaluar la producción y rendimiento de etanol, de cada uno de los aislados de levadura al utilizarlos como inóculo para fermentar el mosto de henequén.

1.11. LITERATURA CITADA

- Arana, F. 1990.** Ecología para principiantes. Ed. Trillas, México.
- Arce Rocha, G. 2003.** Levaduras y mohos aislados de secreciones gomosas de nopal. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Arrizon, J. y Gschaedler, A. 2002.** Increasing fermentation efficiency at high sugar concentrations by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of the tequila fermentation process. *Can. J. Microbiol.* **48**: 965-970.
- Bautista-Justo, M., García-Oropeza, L., Salcedo-Hernandez, R. Y Parra-Negrete, L. 2001.** Azúcares en agaves (*Agave tequilana* Weber) cultivados en el Estado de Guanajuato. *Acta Universitaria.* **11**(1): 33-38.
- Battcock, M. y Azam-Ali, S. 1998.** Fermented fruits and vegetables. A global perspective. FAO Agricultural services Boletín No. 134. Consulta en internet el 09/03/2004. www.fao.org/docrep/x0560e/x0560e00.htm
- Brumann, H. J. 2000.** Alcohol in Ancient Mexico. The University of Utah Press. UT.
- Cazaurang, M. N., Peraza, S. R. y Cruz, C. A. 1990.** Dissolving grade pulps from henequén fibers. *Cell. Chem. Technol.* **24**: 629-638.
- Castorena-Sánchez, I., Escobedo, R. M. y Quiroz, A. 1991.** New cytotaxonomical determinants recognized in six taxa of *Agave* in the sections *Rigidae* and *Sisalanae*. *Can. J. Bot.* **69**: 1257-1264.
- Cedeño, C. M. 1995.** Tequila Production. *Critic. Rev. Biotech.* **15**: 1-11.
- Cisneros, V. M. E. 1997.** Determinación de levaduras en tres bebidas fermentadas tradicionales del norte de México: tesgüino, sotol y mezcal. Tesis de Licenciatura. Escuela Superior de Biología. Universidad Juárez del Estado de Durango. Durango. México.
- Colunga-GarcíaMarín, P. 1998.** Origen, variación y tendencias evolutivas del henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) Sección perspectivas *Bol. Soc. Bot. México.* **62**: 109-128.
- Crueguer, A. y Crueguer, W. 1993.** Biotecnología: Manual de microbiología industrial. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza.
- Dahlgren, R., Clifford, H. y Yeo, P. 1985.** The Families of the Monocotyledons. Structure, Evolution and Taxonomy. Springer-Verlag, Berlin.
- Demain, A.L., Phaff, H.J. y Kurtzman, C. P. 1998.** The industrial and agricultural significance of yeasts. En: *The Yeast, A Taxonomic*

- Study. Kurtzman, C. P. y Fell J. W. (eds). 4th ed. Elsevier, Amsterdam. 13-19 pp.
- Eastmond, A., Herrera, J. L. y Robert, M. 2000.** La biotecnología aplicada al henequén: Alternativas para el futuro. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C, Mérida, Yuc., México.
- Estrada-Godina, A. R., Cruz-Guerrero, A. E., Lappe, P., Ulloa, M., García-Garibay, M. y Gómez-Ruiz L. 2001.** Isolation and identification of Killer yeasts from *Agave* sap (aguamiel) and pulque. W. J. Microbiol. & Biotechnol. **17**: 557-560.
- Fleet, G. H. 2003.** Yeast interactions and wine flavour. Int. J. Food. Microbiol. **86**: 11-22.
- Gancedo, J. M. 1986.** Carbohydrate metabolism in yeast. En: Carbohydrate Metabolism in Cultured Cells. Morgan, M. J. (ed). Plenum Press. New York. 256-259, 263-264 pp.
- García, F. A. y de Sicilia, A. 1984.** El mercado mundial de las fibras duras. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C, Mérida, Yuc., México. 279 p.
- García-Mendoza, A., Colunga-García Marín, P. y Bye, R. 1993.** Los usos de *Agave angustifolia* Haw., ancestro silvestre del henequén, en toda su área de distribución geográfica. Memorias de la Conferencia Nacional sobre el Henequén y la zona henequenera de Yucatán. Gobierno del Estado de Yucatán, CONACYT-UADY-INIFAP. Mérida, Yuc. México. 92-112 pp.
- Gentry, H. S. 1982.** Agaves of Continental North America. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona.
- Granados, S. D. 1993.** Los agaves en México. Universidad Autónoma de Chapingo, Texcoco, Edo. de México, México.
- Herrera, T. 1993.** Semblanza del estudio de las bebidas y de los alimentos fermentados mexicanos. En: Alimentos Fermentados Indígenas de México. Wachter, M. C. y Lappe, P. (comp.). Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. 21-27 pp.
- Herrera, T. y Ulloa, M. 1990.** El reino de los hongos: Micología básica y aplicada. Universidad Nacional Autónoma de México, Fondo de Cultura Económica. México, D. F.
- Kreger-van Rij, N. J. W. (ed). 1984.** The Yeasts. A Taxonomic Study. 3th. ed. Elsevier, Amsterdam.
- Kunkee, R., y Amerine, M. 1970.** Yeasts in wine-making. En: The Yeasts. Vol. 3. Rose, A. y Harrison, J. (eds). Yeasts Technology. Academic Press, London. 7-14 pp.
- Kurtzman, C. P. y Fell, J. W. (eds) 1998.** The Yeasts: A Taxonomic Study. 4th ed. Elsevier, Amsterdam.

- Lachance, M. A. 1995.** Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*. **68**: 151-160.
- Lappe, P. y Ulloa, M. 1993.** Microbiología del pulque. En: Alimentos fermentados indígenas de México. Wachter, M. C. y Lappe, P. (comp.). Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 75-79 pp.
- Lappe, P., Ulloa, M., Arce-Rocha, G., Cáceres-Farfán, M., Tapia-Tussell, R., Pérez-Brito, D. y Larqué, A. 2004.** Isolation and identification of the mycobiota present in *Agave fourcroydes*. Proceedings of the XI International Congress on Yeast. Yeast in science and technology the quest for sustainable development, 15-20 Agosto, Rio de Janeiro, Brazil. 175p.
- Lappe, P., Moreno-Terrazas, R., Herrera, T., Wachter, C., Ruiz-Terán, F., Ulloa, M. y Lappe-Mansilla, A. B. 2006.** Mexican Alcoholic Fermented Foods. En: Handbook of Indigenous Fermented Foods. Keith H. Steinkraus (ed). 3th ed. En prensa.
- Larqué-Saavedra, F. A.; Magdub, M.A. y Cáceres, F. M. 2004.** Proceso para la fabricación de bebida alcohólica a partir de henequén (*Agave fourcroydes*). Patente 219235. IMPI. México, D.F.
- López, M. G. 1999.** Tequila aroma. En: Flavor Chemistry of Ethnic Foods. Shahidi. F. y Ho C-T (eds). Kluwer Academic/ Plenum Publisher, New York. 211-217 pp.
- López, M. G. 2001.** Una sinfonía de aromas. Avance y perspectiva. Volumen especial. XX aniversario de la Universidad de Irapuato "Biotecnología e ingeniería genética de plantas". **20**: 421-424.
- Mateo, J. J., Téllez, M., Huerta T. y Pastor, A. 1991.** Contribution of different yeasts isolated from musts of monastrell grapes to aroma of wines. *Int. J. Food. Microbiol.* **14**:153-160.
- Mesas, J. M. y Alegre, M. T. 1999.** El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. *Ciencia y Tecnol. Aliment.* **2**(4): 174-183.
- Morrissey, W. F., Davenport, B., Querol, A. y Dobson, A. D. W. 2004.** The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider. *J. Appl. Microbiol.* **97**: 647-655.
- Muria, J. M. 1990.** El tequila. Boceto histórico de una industria. *Cuad. Difus. Cient.* **18**:13.
- Olalde Rodríguez, A. 2003.** Aislamiento e Identificación de cepas de levaduras marinas en columna de agua y sedimento en una zona coralífera en Cozumel, Quintana Roo, México. Un estudio polifásico. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México D.F.

- Owen, P. 1989.** Biotecnología de la fermentación, principios, procesos y productos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza.
- Phaff, H. J. 1966.** The Life of Yeasts, their Nature, Activity, Ecology and Relation to Mankind. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Pinal, L., Cedeño, M., Gutiérrez, H. y Álvarez Jacobs. 1997.** Fermentation parameters influencing higher alcohol production in the tequila process. *Biotechnol. Lett.* **19**(1): 45-47.
- Shuler, M. L. y Kargi, F. 2002.** Bioprocess Engineering. Basic Concepts. 2nd. ed. Prentice Hall, New Jersey. 148-160, 516, 517 pp.
- Sols, A., Gancedo, C. y DelaFuente, G. 1971.** Energy-yielding metabolism in yeasts. En: The Yeasts. Vol. 2. Rose, A. y Harrison, J. (eds). Physiology and Biochemistry of Yeasts. Academic Press. London. 276-283 pp.
- Steinkraus, K. H. 1993** Microbes, food and man. En: Alimentos fermentados indígenas de México. Wachter, M. C. y Lappe, P. (comp.). Universidad Nacional. Autónoma de México, México D.F. 5-9 pp.
- Suomalainen, H. y Oura, E. 1971.** Yeast nutrition and solute uptake. En: The Yeasts. Vol. 2. Rose, A., H. y Harrison J. H. (eds). Physiology and Biochemistry of Yeasts. Academic Press. London. 3-73 pp.
- Tamayo, C. E., Ortiz, V. E. y Cedeño, C. M. 1991.** Identificación de levaduras aisladas del jugo de henequén. *Revista del Centro de Graduados e Investigación. Instituto Tecnológico de Mérida (ITM), México, Año VII.* **11:** 1-10.
- Téllez, M. P. 1998.** El cocimiento, una etapa importante en la producción de tequila. *Bebidas Mexicanas.* **7** (1): 19-20.
- Torija, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón J.M. y Mas, A. 2001.** Yeasts population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek.* **79:** 345-352.
- Vallejo-Cordoba, B., González-Córdoba, A. F. y Mazorra-Manzano, M. A. 2001.** Characterization and comparison of volatiles in traditional mexican distilled beverages: Tequila, Mezcal, Bacanora and Sotol. *ITT. Annual Meeting.* New Orleans, Louisiana. Consultado en Internet el 12/03/2003.
- http://ift.confex.com/ift/2001/techprogram/paper_8763.htm

Capítulo 2. Materiales y Métodos

2.1. MICROORGANISMOS

Para llevar a cabo la fermentación de los mostos se utilizaron como inóculo ocho aislados de levaduras, obtenidos de la base de las hojas y del mosto de henequén recién extraído o fermentado durante 24 o 48 horas en el laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Los aislados utilizados fueron especies de *Kluyveromyces marxianus*, *Candida guilliermondii*, *Candida colliculosa*, *Candida lusitanae*, *Candida parapsilosis* y un aislado de *Saccharomyces cerevisiae* obtenido en la planta Licores de Henequén S.A. localizada en Izamal, Yucatán, cuando el proceso de elaboración del licor tenía un año de haber sido establecido, por lo que se considera a este aislado como una cepa alóctona (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Especies de levaduras empleadas como inóculo para la fermentación de mosto rectificado de henequén.

Clave Aislado	Especie	Sustrato	Nº Acceso GenBank
SCP	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	mosto	-
CICY KI	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	hojas de henequén	AY894821
Exo C1	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	mosto recién extraído	AY894822
Ex 24C3	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	mosto fermentado 24 h	DQ139802
Ex 48C4	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	mosto fermentado 48 h	-
Exo C54	<i>Candida guilliermondii</i>	mosto recién extraído	EF063127
Exo C3	<i>Candida colliculosa</i>	mosto recién extraído	EF063124
Exo C7	<i>Candida lusitanae</i>	mosto recién extraído	EF063126
Exo C16	<i>Candida parapsilosis</i>	mosto recién extraído	AY894827

Los aislados fueron identificados a especie por la Dra. Lappe del IBUNAM, mediante sus características morfo-fisiológicas (Yarrow, 1998; Kurtzman & Fell, 1998; Barnett *et al*, 2000) y su identidad se corroboró en el laboratorio GeMBio del CICY, por la secuencia de pares de bases de nucleótidos del dominio D1/D2 del gene 26S ADNr (Kurtzman & Robnett, 1998) utilizando los primers universales NL1 y NL4 de acuerdo con los protocolo de Tapia-Tussell *et al.*, (2006) y Kurtzman & Robnett, (1998).

2.2. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE CEPAS DE LEVADURAS EN MEDIO DE GLUCOSA EXTRACTO DE LEVADURA Y PEPTONA (GELP)

La cinética de crecimiento de los aislados de levaduras se realizó por duplicado en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio GELP (glucosa 20 g, extracto de levadura 5 g, peptona 10 g, agua 1000 mL) que se inocularon con 1 mL de una suspensión de 3.5×10^6 células/mL de cada uno de los aislados. Los matraces se taparon con torundas de algodón para permitir el intercambio gaseoso, luego se incubaron a 37 °C en agitación continua a 80 rpm durante 24h, en oscuridad.

El muestreo se realizó tomando 4mL de medio de cultivo GELP cada 3 h durante 24 h, o hasta llegar a la fase estacionaria de crecimiento de cada aislado. El crecimiento celular se determinó por turbidez, tomando lectura en un espectrofotómetro previamente calibrado, a una longitud de onda de 590 nm.

2.3. PRUEBA DE TOLERANCIA A DIVERSAS CONCENTRACIONES DE ETANOL

La prueba de tolerancia a etanol se realizó de acuerdo con el protocolo de Lachance (1995). Los aislados de levadura (Tabla 2.1) se inocularon por asada en medio YM (extracto de malta 0.3%, extracto de levadura 0.3%, peptona 0.5 y glucosa 1%) y se incubaron por 24 h a 37 °C en oscuridad. A partir de esta suspensión se inocularon, por triplicado, y por asada, tubos de ensayo conteniendo 8 mL de medio YM, adicionado con 4-12% (v/v) de etanol absoluto, con incrementos sucesivos del 1%. Los tubos se incubaron a 37 °C bajo las mismas condiciones y el crecimiento celular se evaluó visualmente por turbidez durante 9 días.

2.4. MATERIA PRIMA

Se utilizaron las piñas o cogollos (seudotallo) de plantas de henequén (*A. fourcroydes*), colectadas en el poblado de Baca, en el estado de Yucatán.

2.5. OBTENCIÓN DEL MOSTO

Las piñas se partieron y se cocieron a 121 °C y a una presión de 1 kg/cm² en un autoclave durante 4 h para hidrolizar la inulina y obtener azúcares fermentables, principalmente fructosa. Las piñas cocidas se prensaron en un molino o "trapiche" para obtener el jugo o mosto (Larqué-Saavedra *et al.*, 2004). El jugo se almacenó en botellas de 1 L en el ultracongelador a -70 °C hasta su utilización.

2.6. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE FERMENTACIÓN Y CONDICIONES FISICOQUÍMICAS DEL PROCESO

Como sustrato para las fermentaciones se utilizaron 250 mL de mosto descongelado, rectificado a 14 °Brix con agua destilada y suplementado con 0.15 % de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, el medio de cultivo, contenido en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, se esterilizó en un autoclave (15 min, 121 °C y 1 kg/cm²), y se inoculó con 10% (v/v) del inóculo activo en GELP de cada uno de los aislados de levaduras. Los matraces se taparon con algodón y se incubaron a 35-37 °C (incubadora: Cole-Parmer Modelo 39060-04) durante 48 h en oscuridad. Los ensayos se hicieron por triplicado (Larqué-Saavedra *et al.*, 2004).

El muestreo de las fermentaciones se realizó cada 4 horas, durante las primeras 24 h de fermentación, y cada 6 horas hasta finalizar la fermentación a las 48 h. Como muestra se tomó un volumen de 6 mL al que se le determinaron pH, sólidos solubles en °Brix y crecimiento celular por turbidez en un espectrofotómetro a una absorbancia de 590 nm. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 3, 500 rpm (10 min) y el sobrenadante se conservó en ultracongelación (-70 °C), para la posterior determinación de azúcares reductores totales (ART), azúcares reductores directos (ARD) y etanol (Figura 2.1).

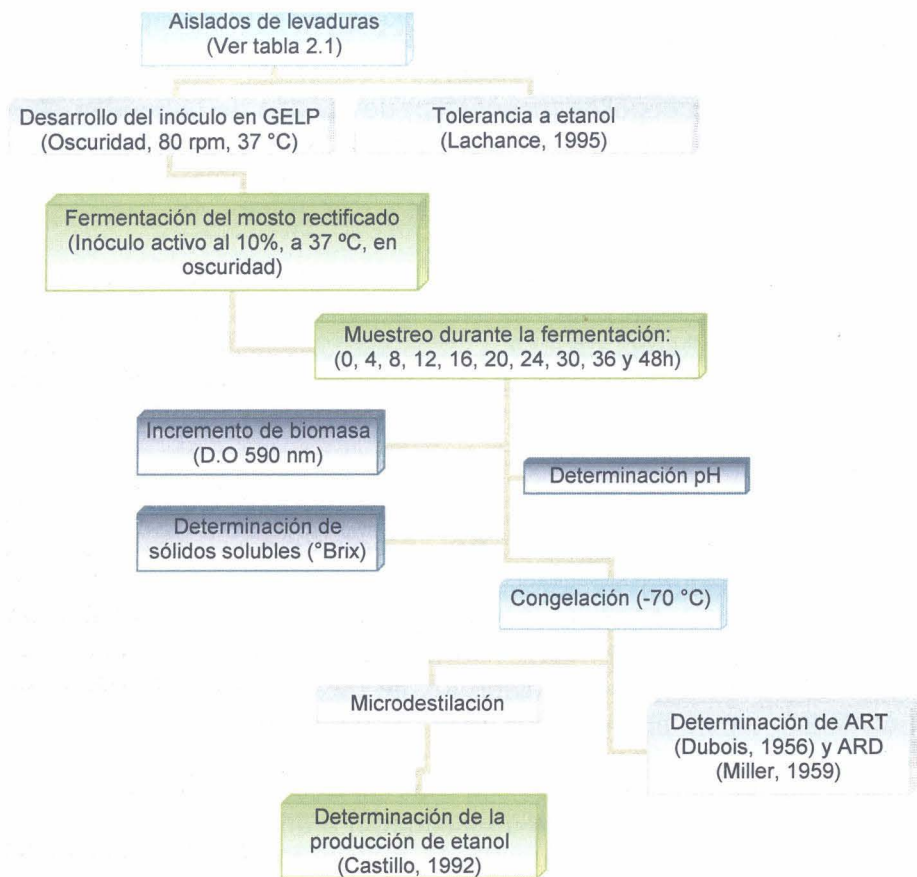


Figura 2.1. Diagrama de flujo de la fermentación alcohólica, realizada utilizando los diversos aislados de levaduras como inóculo para fermentar el mosto rectificado de *A. fourcroydes* utilizado en la presente investigación.

2.7. DETERMINACIÓN DEL PH

La medición del pH durante la fermentación, se realizó en un potenciómetro Beckman 40 debidamente calibrado con buffer (pH 4 y 7).

2.8. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES

La concentración de azúcares se evaluó de tres maneras:

1) Los sólidos solubles se cuantificaron en °Brix, en un refractómetro Cole-Parmer, modelo RHB-32.

2) Los azúcares reductores directos (ARD) se determinaron por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959): a 1 mL de muestra se le adicionaron 1.5 mL del reactivo DNS (Tartrato de sodio y potasio 200 g/L, Fenol 2g/L, Metabisulfito de sodio 0.5 g/L, Hidróxido de sodio 10g/L, Ácido 3,5-dinitrosalicílico 10g/L). La mezcla se calentó en baño María en ebullición durante 10 minutos exactos, se dejó enfriar en un baño de agua fría, y posteriormente la muestra se aforó a 10 mL con agua destilada libre de CO₂. La lectura de la muestra se hizo en un espectrofotómetro a 550 nm y los valores se compararon con una curva de calibración de glucosa en el intervalo de 0.1-1 g /L.

3) Los azúcares reductores totales (ART) se determinaron por el método de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*; 1956): a 1 mL de muestra se le adicionó 1 mL de fenol al 5% (p/v) recién preparado; inmediatamente se agregaron a la mezcla, en forma brusca, 5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado y se dejó reposar 15 min en baño de agua fría. La lectura se realizó en un espectrofotómetro a 490 nm y los valores se compararon con una curva de calibración de sacarosa en el intervalo de 0.01-0.1 g/ L.

2.9. RENDIMIENTO EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL

La cantidad de etanol producido en los diferentes tiempos de fermentación se determinó por el método de dicromato de potasio, que requiere que las muestras estén destiladas. Por ello, a cada una de las muestras fermentadas y centrifugadas, se le adicionó agua destilada, en una proporción de 1:1. La destilación se realizó en un equipo de microdestilación hasta recuperar el volumen inicial de la muestra, que fue de 4 mL. El contenido de etanol se determinó en 1 mL del destilado, al que se adicionaron 2 mL de dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇). La mezcla se dejó reposar 10 min, se le agregaron 5 mL de agua destilada y se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 585 nm. Los valores se compararon con una curva de calibración de 2-20 g/ L de etanol (Castillo, 1992).

Al conocer la concentración de etanol en los destilados, el rendimiento en la producción de este alcohol se obtuvo al relacionar la cantidad de azúcares utilizados para producir el etanol cuantificado.

2.10. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS

La velocidad específica máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$) se calculó utilizando los datos experimentales para la fase de crecimiento exponencial de acuerdo a la ecuación (Quintero-Ramírez, 1993):

$$\mu_{\max} = \ln(X_f/X_i) (1/t) \quad (\text{Ec. 2.1})$$

En donde

X_f = Crecimiento final

X_i = Crecimiento inicial

t = Tiempo

$\ln$ = logaritmo natural

El tiempo de duplicación (t_d) se calculó con la ecuación:

$$t_d = \ln 2 / \mu \quad (\text{Ec. 2.2})$$

El coeficiente de rendimiento de etanol ($Y_{p/s}$), a partir de los azúcares reductores directos (ARD) utilizados se estimó por la ecuación (Quintero-Ramírez, 1993):

$$Y_{p/s} = (P_f - P_i) / (S_f - S_i) \quad (\text{Ec. 2.3})$$

En donde:

P_f = Producto final (etanol)

P_i = Producto inicial

S_f = Concentración final de sustrato (ARD)

S_i = Concentración inicial de sustrato (ARD)

Este coeficiente se calculó a partir de los datos experimentales obtenidos.

Una vez obtenidos los valores de $Y_{p/s}$, se determinó la eficiencia de cada aislado dividiendo este valor entre el máximo alcanzado en una fermentación (0.511) y multiplicado por cien se obtuvo su eficiencia en porcentaje (E%).

La productividad (P) de las cepas se determinó con la siguiente relación:

$$P = [\text{etanol}] / t \quad (\text{Ec. 2.4})$$

En donde:

[etanol] = Es la concentración máxima de alcohol alcanzada en la fermentación.

t = El tiempo que ocurrió para obtener la concentración máxima de etanol.

2.11. LITERATURA CITADA

- Barnett, J. A., Payne, R. W. y Yarrow, D. 2000.** Yeasts: Characteristics and Identification. 3th ed. University Press, Cambridge.
- Castillo, V. A. 1992.** Comparación de diferentes fuentes de nutrientes para el crecimiento y fermentación en melaza de caña. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Guadalajara. Jalisco, México. 39 p.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Annal. Chem.* **28**: 350-356.
- Kurtzman, C. P. y Fell, J. W. (eds) 1998.** The Yeasts: A Taxonomic Study. 4th ed. Elsevier, Amsterdam.
- Kurtzman, C. P. y Robnett, C. J. 1998.** Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek.* **73**: 331-371.
- Lachance, M. A. 1995.** Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek.* **68**: 151-160.
- Larqué-Saavedra, F. A.; Magdub, M.A. y Cáceres, F. M. 2004.** Proceso para la fabricación de bebida alcohólica a partir de henequén (*Agave fourcroydes*). Patente 219235. IMPI. México D.F.
- Miller, L. G. 1959.** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Annal. Chem.* **31**(3): 4226-428.
- Quintero-Ramírez, R. 1993.** Ingeniería bioquímica. Teoría y aplicaciones. Editorial Alhambra-Mexicana. México, D.F.
- Tapia-Tussell, R., Lappe, P., Ulloa, M., Quijano-Ramayo, A., Cáceres-Farfán, M, Larqué-Saavedra, A. y Pérez-Brito, D. 2006.** A rapid and simple method for DNA extraction from yeast and fungi isolated from *Agave fourcroydes*. *Mol. Biotechnol.* **33**(1): 67-70.
- Yarrow, D. 1998.** Methods for the isolation, maintenance and identification of yeast. En: Kurtzman, C. P. y J. W. Fell. (eds.). The Yeasts. A Taxonomic Study. 4th ed. Elsevier, Amsterdam. 1055 p.

Capítulo 3. Resultados y Discusiones

3.1. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LOS DIFERENTES AISLADOS DE LEVADURAS EN MEDIO DE GELP

Las cinéticas de crecimiento de los diversos aislados mostraron tres perfiles de comportamiento (Figuras 3.1a y 3.1b). El primero corresponde a dos aislados de *K. marxianus* (Cicy Ki, Exo C1) y uno de *S. cerevisiae* (SCP), que no mostraron una fase de adaptación al medio y que desde su inoculación en el medio mostraron un crecimiento exponencial acelerado, es decir, una adaptación inmediata al medio GELP hasta las 9 horas, cuando la turbidez del medio se mantuvo constante.

El segundo perfil observado fue el que presentó *C. lusitaniae* (Exo C7), que tuvo un comportamiento similar al primer grupo ya que no mostró una fase de adaptación, pero alcanzó su valor de crecimiento máximo a las 18 h, el doble de tiempo que los aislados descritos anteriormente (Figura 3.1a).

El tercer perfil de crecimiento fue el de *C. guilliermondii* (Exo C54) y *C. colliculosa* (Exo C3) que presentaron tres etapas en su crecimiento; una primera etapa de adaptación al medio de cultivo de 9 y 12 h, respectivamente, seguida de una fase de crecimiento exponencial de 15 h (Exo C54) y 12 h (Exo C3). Posteriormente los dos aislados finalizaron con una fase estacionaria a las 24 h (Figura 3.1a).

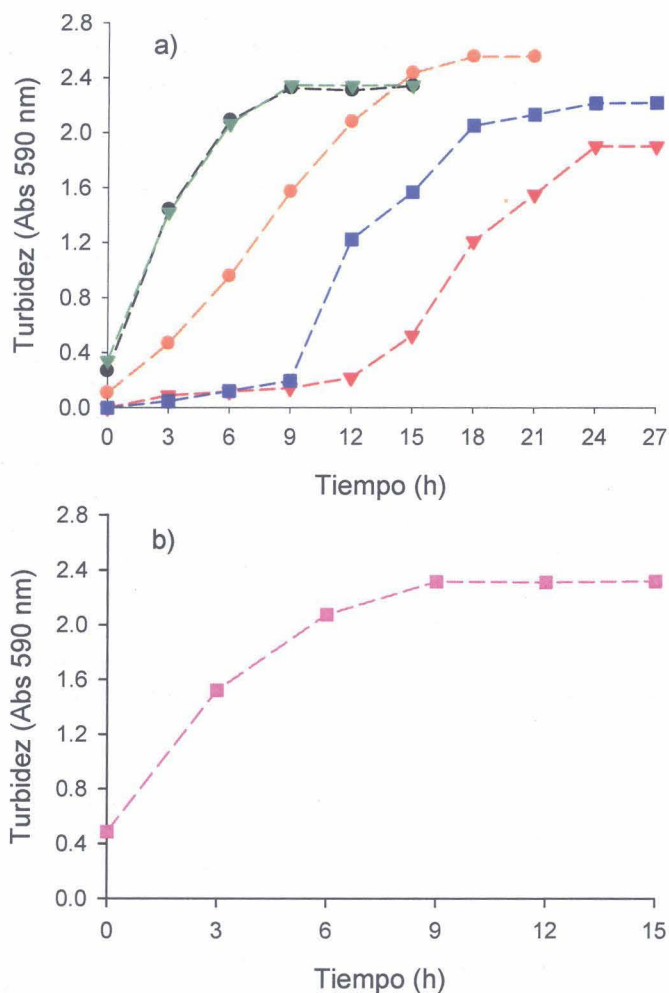


Figura 3.1. Cinética de crecimiento en medio GELP incubado en oscuridad a 37 °C y agitación constante (80 rpm). (a) Con aislados autóctonos de *K. marxianus* (Exo C1 -●- y Cicy Ki -▼-), *C. lusitaniae* (Exo C7 -○-), *C. colliculosa* (Exo C3 -▲-), *C. guilliermondii* (Exo C54 -■-). (b) Un aislado alóctono de *S. cerevisiae* (SCP -■-). Los resultados son el promedio de dos repeticiones.

La velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$) y el tiempo de duplicación (td) se calcularon con las ecuaciones 2.1 y 2.2.. Los datos se obtuvieron de la cinética de crecimiento de la fase exponencial de cada especie evaluada. Los aislados de *K. marxianus* tuvieron los mayores valores de $\mu_{\max}$ y por lo tanto los menores tiempos de duplicación, ya que no mostraron una fase de adaptación. Se considera que los aislados de *K. marxianus* (Cicy Ki y Exo C1) fueron los que mejor desarrollo tuvieron en medio GELP. Con respecto a los demás aislados los valores de $\mu_{\max}$ y td fueron similares entre ellos y no se notaron diferencias entre los aislados autóctonos y el alóctono (Tabla 3.1).

De acuerdo con los datos obtenidos en la cinética de crecimiento, el tiempo de incubación del inóculo en medio GELP será de 9 h para los aislados de *K. marxianus* y *S. cerevisiae*; de 18 h para *C. lusitaniae* y de 24 h para *C. colliculosa* y *C. guilliermondii* (Tabla 3.1). En este tiempo las células están en intensa actividad metabólica, necesaria para iniciar una fermentación activa. Estos valores se considerarán característicos de cada aislado para los posteriores experimentos.

Tabla 3.1. Determinación de la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$) y del tiempo de duplicación (td), de aislados de *K. marxianus*, *C. lusitaniae*, *C. colliculosa*, *C. guilliermondii* y *S. cerevisiae*, crecidas en GELP incubado en oscuridad a 37 °C, y agitación constante (80 rpm).

Aislado	Especie	Repetición 1		Repetición 2		Tiempo de crecimiento del inóculo (h)
		$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	td (h)	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	td (h)	
Exo C1	<i>K. marxianus</i>	0.237	2.97	0.246	2.81	9
CICY KI	<i>K. marxianus</i>	0.213	3.25	0.214	3.23	9
SCP	<i>S. cerevisiae</i>	0.165	4.2	0.181	3.82	9
Exo C7	<i>C. lusitaniae</i>	0.176	3.93	0.172	4.029	18
Exo C3	<i>C. colliculosa</i>	0.194	3.57	0.180	3.85	24
Exo C54	<i>C. guilliermondii</i>	0.161	4.30	0.177	3.91	24

3.2. TOLERANCIA A DIVERSAS CONCENTRACIONES DE ETANOL

Un factor importante en la predominancia de algunas especies de levaduras sobre otras, en un proceso de fermentación, está parcialmente determinado por su grado de tolerancia al etanol. Este alcohol es altamente tóxico, inhibe el crecimiento y el metabolismo, y la membrana celular es su principal blanco de acción (Lachance, 1995; Man You, *et al.*, 2003).

Los aislados de levaduras estudiados presentaron un grado de tolerancia distinto, a las diferentes concentraciones de etanol (Tabla 3.2). El aislado alóctono de *S. cerevisiae* presentó la mayor tolerancia, ya que creció en el medio de YM con 11% de etanol. Esta especie es utilizada en varios procesos industriales cuyo objetivo es la producción de etanol, o de bebidas alcohólicas, y una de sus características sobresalientes es su alto poder alcohológeno, y su alta tolerancia al etanol (hasta un 17%), lo que le permite estar presente en la segunda fase de la fermentación (Mesas & Alegre, 1999; Benítez, *et al.*, 1983).

Los aislados de *K. marxianus* toleraron hasta un 7% de etanol sin importar el sustrato del cual se aislaron (Tabla 3.2). Esta especie ha sido registrada como parte de la micobiota natural de diversas bebidas fermentadas de agaves. Durante el proceso de elaboración de tequila, Lachance (1995) obtuvo a partir de las piñas cocidas, y del mosto fermentado (24 y 48 h) varios aislados de *K. marxianus* que toleraron concentraciones de 7% de etanol, valor semejante al que se obtuvo en el presente estudio. Con base a lo anterior se puede inferir que esta especie está presente en fases intermedias y avanzadas de fermentación.

La cepa de *C. guilliermondii* presentó una tolerancia al 6% de etanol. Los demás aislados de *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* y *C. colliculosa* presentaron una menor tolerancia a este alcohol (5%). Estos aislados se caracterizan por estar presentes en la primera etapa de la fermentación alcohólica (Tabla 3.2).

Los resultados obtenidos permiten establecer que el aislado de *S. cerevisiae*, una cepa alóctona, cuenta con una alta tolerancia al etanol, muy por encima a la tolerancia presentada por los aislados autóctonos que mostraron una tolerancia media y media-baja, lo que permite el

establecimiento, el desarrollo y la sobrevivencia de los diferentes aislados durante las diversas etapas de la fermentación del mosto. En pruebas de tolerancia realizadas en aislados obtenidos a partir de agaves y de otros sustratos han registrado valores de 5 y hasta 12 % de tolerancia a etanol (Mesas & Alegre, 1999; Estrada-Godina, *et al.*, 2001; Lachance, 1995).

Tabla 3.2. Determinación de la tolerancia a diversas concentraciones de etanol de los diferentes aislados de levadura.

Aislado	Especie	Tolerancia a EtOH (%) v/v*
SCP**	<i>S. cerevisiae</i>	11
CICY KI	<i>K. marxianus</i>	7
Exo C1	<i>K. marxianus</i>	7
Ex 24C3	<i>K. marxianus</i>	7
Ex 48C4	<i>K. marxianus</i>	7
Exo C54	<i>C. guilliermondii</i>	6
Exo C3	<i>C. colliculosa</i>	5
Exo C7	<i>C. lusitaniae</i>	5
Exo C16	<i>C. parapsilosis</i>	5

* La determinación se realizó en medio de cultivo YM.

** El aislamiento se obtuvo de mosto, elaborado en la planta "Licores de Henequén" en Izamal Yuc. Los demás aislamientos se obtuvieron de una fermentación espontánea realizada en el Centro de Investigación Científica de Yucatán.

La importancia de determinar el grado de tolerancia al etanol de los diferentes aislados, radica en que la conversión óptima de carbohidratos a etanol requiere células tolerantes a este alcohol, para que al ser utilizadas en una fermentación del mosto de henequén, el etanol producido no inhiba su crecimiento y se obtenga una alta productividad y rendimiento de etanol (Benítez *et al.*, 1983).

3.3. INCREMENTO DE BIOMASA EN EL MOSTO

En la fermentación del mosto con los diferentes aislados, se observó que las cinéticas de crecimiento tuvieron diferentes comportamientos inclusive para aquellos pertenecientes a la misma especie (Figura 3.2a y 3.2b). El aislado Exo C1 (*K. marxianus*), no mostró un periodo de adaptación al mosto, e inició su crecimiento exponencial desde el tiempo cero, hasta las 30 h, tiempo en que la turbidez del mosto se mantuvo constante (Figura 3.2a).

Los demás aislados de *K. marxianus* (Cicy Ki, Ex 24C3 y Ex 48C4) mostraron una fase de adaptación de 4 h, para adaptarse a las nuevas condiciones de cultivo e iniciando al cabo de este tiempo su crecimiento exponencial, que finalizó a las 24 h para Cicy Ki y a las 30 h para Ex 24C3 y Ex 48C4 (Figura 4a). Es importante mencionar que la especie *K. marxianus* se encuentra asociada a diversas especies de agaves como *A. tequilana* (Lachance, 1995) y *A. fourcroydes* (Lappe *et al.*, 2004) y a varias bebidas fermentadas elaboradas con aguamiel o mostos de agave, lo que explicaría su rápida adaptación al mosto.

El aislado de *C. lusitaniae* (Exo C7) se adaptó de manera inmediata al mosto, iniciando su crecimiento exponencial desde el inicio de la fermentación, la cual finalizó a las 36 h, aunque se continuó observando un incremento en la turbidez del mosto hasta las 48 h (Figura 3.2a). Esta especie, junto con *K. marxianus*, ha sido aislada de hojas de *A. fourcroydes*, del aguamiel y durante la primera fase de fermentación del mosto de henequén (Lappe *et al.*, 2004; Estrada-Godina *et al.*, 2001).

El aislado de *S. cerevisiae*, mostró un período de adaptación de 12 h, para posteriormente comenzar su crecimiento exponencial (Figura 3.2b). Sin embargo, una vez adaptada al sustrato el crecimiento exponencial fue acelerado y finalizó a las 36 h, 6 horas después que la mayoría de los aislados autóctonos.

Con base a estos resultados se puede concluir que los aislados autóctonos poseen una mejor adaptación al mosto, que el aislado alóctono de *S. cerevisiae* que requirió el triple del tiempo para adaptarse a las nuevas condiciones de temperatura, pH y los nutrientes del mosto, e iniciar su crecimiento exponencial a las 12 h (Figura 3.2b).

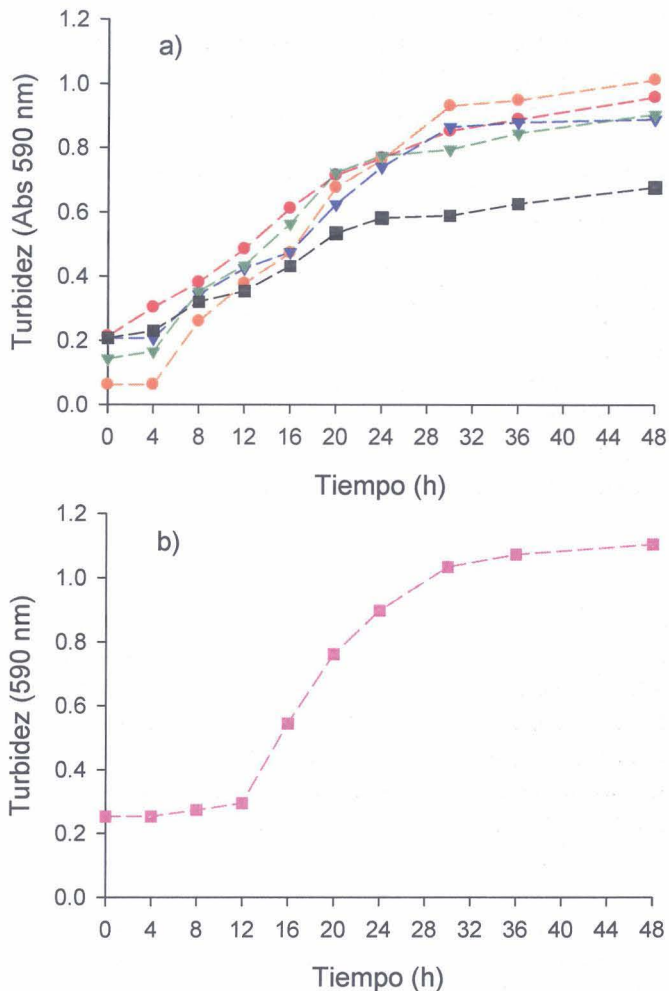


Figura 3.2. Cinética de crecimiento de los diferentes aislados en mosto rectificado e incubado a 37 °C en oscuridad. (a) Mosto inoculado con aislados autóctonos de *K. marxianus* obtenidos de: mosto recién extraído (Exo C1 -●-); mosto fermentado 24h (Ex 24C3 -●-); mosto fermentado 48 h (EX 48C4 -▼-); de las hojas de henequén (Cicy Ki -▼-) y *C. lusitaniae* aislada de mosto recién extraído (Exo C7 -■-). (b) Con un aislado alóctono de *S. cerevisiae* (SCP -■-). Los resultados son el promedio de tres repeticiones $\pm$ EE.

A pesar que los aislados de *C. guilliermondii* (Exo C54), *C. colliculosa* (Exo C3) y *C. parapsilosis* (Exo C16) se obtuvieron de mosto fermentado espontáneamente, y que presentaron un crecimiento activo en medio GELP, y después de las 48h de incubación, no se detectaron variaciones en la turbidez ni en la concentración de °Bx del sustrato.

Por lo anterior, se procedió a realizar una adaptación previa de los aislados al sustrato, en una proporción 1:1 de mosto y medio de cultivo de GELP, pero tampoco se observó una variación en los sólidos solubles ni crecimiento (datos no mostrados). Una posible explicación de la incapacidad de los aislados para crecer y fermentar el mosto, es que dicho sustrato utilizado fue sometido a congelación, y a un segundo proceso de esterilización, lo que pudo alterar su composición química y afectar el crecimiento de los aislados.

3.4. PARÁMETROS CINÉTICOS DE CRECIMIENTO EN EL MOSTO

En la tabla 3.3 se señalan los parámetros cinéticos de crecimiento obtenidos con cada una de las cepas evaluadas durante la fermentación alcohólica del mosto. Se aprecia que los valores de $\mu_{\max}$ fueron inferiores a los obtenidos en el crecimiento del inóculo en medio GELP, ya que debido a las condiciones de aeración, para activar los aislados del cultivo, las células utilizaron los nutrientes para la generación de biomasa por lo que los td son muy cortos (entre 2 y 5 h; Tabla 3.2).

Tabla 3.3. Determinación de la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$) y del tiempo de duplicación (td), de aislados de *K. marxianus*, *S. cerevisiae*, *C. lusitaniae*, durante la fermentación alcohólica de mosto de *A. fourcroydes*, rectificado e incubado a 37 °C, en oscuridad.

Aislado	Especie	$\mu_{\max}$ (h^{-1})	td (h)
Cicy Ki	<i>K. marxianus</i>	0.077	9
Exo C1	<i>K. marxianus</i>	0.046	15.06
Ex 24C3	<i>K. marxianus</i>	0.103	6.72
Ex 48C4	<i>K. marxianus</i>	0.054	12.83
Exo C7	<i>C. lusitaniae</i>	0.031	22.35
SCP.	<i>S. cerevisiae</i>	0.053	13.07

En el mosto se observaron td de 6 hasta 22 h, indicando un crecimiento lento durante la fermentación, durante la cual las células utilizan los nutrientes hacia la producción de etanol.

3.5. CAMBIOS EN EL PH DURANTE LA FERMENTACIÓN

El pH inicial del mosto para todas las fermentaciones fue de 4.5. Durante la fermentación se registró muy poca variación, finalizando con pH 4.0 (Datos no mostrados).

3.6. EVALUACIÓN DEL CONSUMO DE SÓLIDOS SOLUBLES DURANTE LA FERMENTACIÓN

El consumo de azúcares durante la fermentación se determinó como sólidos solubles (°Brix), azúcares reductores directos (ARD) y azúcares reductores totales (ART), y su concentración en el mosto, al final de la fermentación, dependió del aislado utilizado como inóculo en cada fermentación. Los resultados se muestran en las figuras 3.3, 3.4 y 3.5 respectivamente.

Todas las fermentaciones iniciaron con 14 °Brix y la concentración de los sólidos solubles del mosto durante la fermentación con los diferentes aislados, fue disminuyendo muy poco durante las primeras horas, lo que concuerda con lo observado en la formación de biomasa; durante la etapa de adaptación hubo poco consumo de azúcares, pero durante el crecimiento exponencial comenzaron a utilizar los sólidos solubles rápidamente (Figura 3.3).

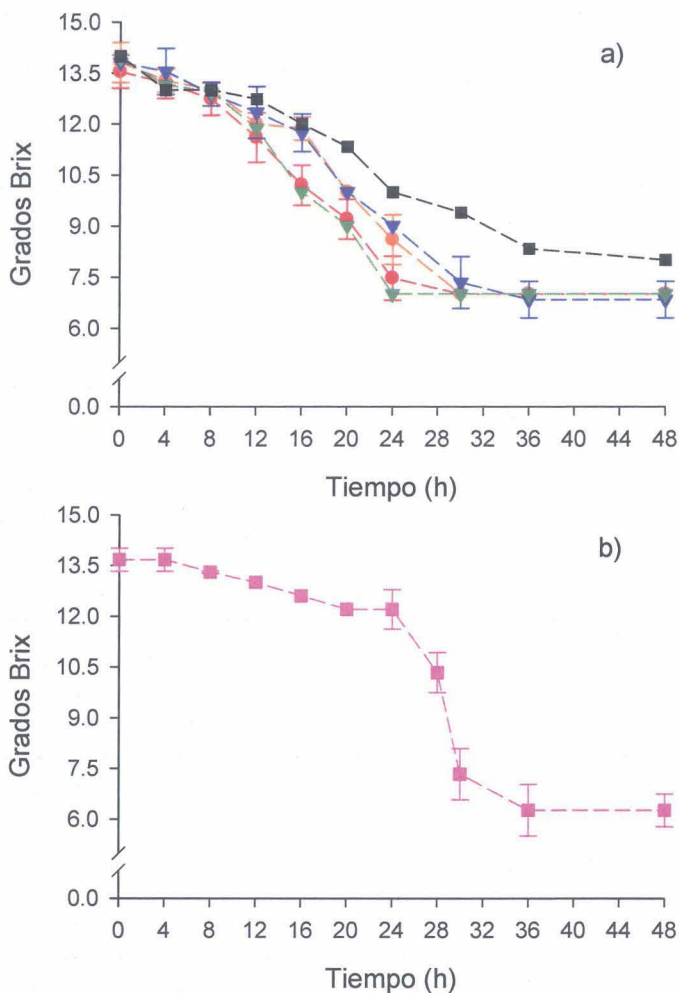


Figura 3.3. Cinética del consumo de sólidos solubles de los diferentes aislados en mosto rectificado e incubado a 37 °C en oscuridad. (a) Mosto inoculado con aislados autóctonos de *K. marxianus* obtenidos de: mosto recién extraído (Exo C1 -●-); mosto fermentado 24h (Ex 24C3 -●-); mosto fermentado 48 h (EX 48C4 -▼-); de las hojas de henequén (Cicy Ki -▼-) y *C. lusitaniae* aislada de mosto recién extraído (Exo C7 -■-). (b) Con un aislado alóctono de *S. cerevisiae* (SCP -■-). Los resultados son el promedio de tres repeticiones $\pm$ EE.

Los aislados de *K. marxianus* redujeron la concentración de los °Brix del mosto de 14-7 °Brix, al final de la fermentación. De ellos la cepa Cicy Ki mostró ser la mas activa, pues consumió los sólidos solubles mas rápidamente, y a las 24 h la concentración de los sólidos solubles, en el mosto, fue de 7 °Brix. Los otros aislados de *K. marxianus* (Exo C1 y Ex 24C3) presentaron un comportamiento similar, también disminuyeron la concentración de los sólidos solubles del mosto a 7 °Brix pero hasta las 30 h de fermentación. El aislado de *K. marxianus* que presentó la actividad fermentadora mas lenta fue Ex 48C4. Probablemente esta diferencia se deba a características intrínsecas de los aislados de *K. marxianus*.

Tabla 3.4. Concentración final de los sólidos solubles (°Brix) durante la fermentación alcohólica de mosto rectificado, incubado a 37 °C en oscuridad e inoculado con diferentes aislados de *K. marxianus*, *C. lusitaniae* y *S. cerevisiae*.

Aislado	Especie	Sol. Solubles iniciales (°Brix)	Sol. Solubles finales (°Brix)	Tiempo de fermentación (h)
Cicy Ki	<i>K. marxianus</i>	14	7	24
Exo C1	<i>K. marxianus</i>	14	7	30
Ex 24C3	<i>K. marxianus</i>	14	7	30
Ex 48C4	<i>K. marxianus</i>	14	7	36
Exo C7	<i>C. lusitaniae</i>	14	8	36
SCP.	<i>S. cerevisiae</i>	14	6	36

El aislado de *S. cerevisiae* mostró una buena capacidad de utilizar los azúcares del mosto, inició el consumo de los sólidos solubles durante las primeras horas de fermentación y finalizó con 6 °Brix a las 36 h, un grado por debajo de la especie *K. marxianus* (Figura 3.3b, Tabla 3.4); por lo que fue más eficiente en la utilización de éstos compuestos.

El aislado de *C. lusitaniae* (Exo C7), fue el aislado que fermentó mas lentamente y finalizó la fermentación en 8 °Brix a las 36 h, y presentó la menor variación en los sólidos solubles, durante la fermentación en mosto (Tabla 3.4).

Con base en los resultados obtenidos, se observó que la concentración de sólidos solubles residuales presentes en el mosto al final de la fermentación fue alta, dado que los diferentes aislados solo utilizaron el 50% del contenido inicial de sólidos solubles, en su mayoría representados por azúcares. Sin embargo estos resultados podrían estar afectados por la presencia de otros productos solubles no fermentables como aminoácidos, proteínas, vitaminas, y ácidos grasos con cadena de 2 a 18 carbonos, entre otros. Por ello, también se determinaron los azúcares reductores totales y reductores directos durante la fermentación y se trató de esclarecer si los sólidos solubles residuales, medidos en °Brix, correspondían a azúcares fermentables (ARD) o no (Téllez, 1998).

3.7. EVALUACIÓN DEL CONSUMO DE ART DURANTE LA FERMENTACIÓN

La concentración inicial de ART en promedio fue de 108.34 ± 3.02 g/L de mosto, y al final de la fermentación, de 16.38 ± 1.84 g/L de mosto (Ver anexo). La dinámica de su consumo por los diversos aislados se presenta en la figura 3.4.

Con el análisis de los ART se obtuvo una concentración más exacta del contenido de azúcares en el mosto. Estos datos indican que los aislados de *K. marxianus* (Exo C1 y Cicy Ki), después de 24 h de fermentación, mostraron poca variación en los ART y ambos aislados finalizaron el consumo de los ART a una concentración de 16.05 y 17.65 g/L, respectivamente. Los demás aislados de *K. marxianus* (Ex 24C3 y Ex 48C4) requirieron más tiempo, para finalizar la fermentación, deteniendo el consumo de los ART a las 30 y 36 h con una concentración residual en el mosto de 20.812 g/L y 15.34 g/L, respectivamente (Figura 3.4; Anexo). Como se mencionó anteriormente, esta diferencia entre aislados de la misma especie, puede ser debido a características intrínsecas de los aislados.

El aislado de *C. lusitaniae* (Exo C7) presentó un consumo importante de los ART hasta las 48 h y la concentración final en el mosto fue de 22.59 g/L; éste fue el aislado autóctono que menor cantidad de ART utilizó (Figura 3.4a; Anexo). Este aislado mostró la menor capacidad de asimilar los azúcares del mosto, con la mayor cantidad residual de ART y mayor tiempo de fermentación, lo que pudiera influir en su productividad.

El aislado *S. cerevisiae* (SCP) tuvo el mayor tiempo de adaptación al mosto (12 h) (Figura 3.2), durante este tiempo consumió lentamente los azúcares presentes en el mosto. Sin embargo, después de las 20 h de fermentación, inició un consumo más rápido de azúcares cuya concentración se estabilizó a las 36 h en 15.55 g/L (Figura 3.4b; Anexo).

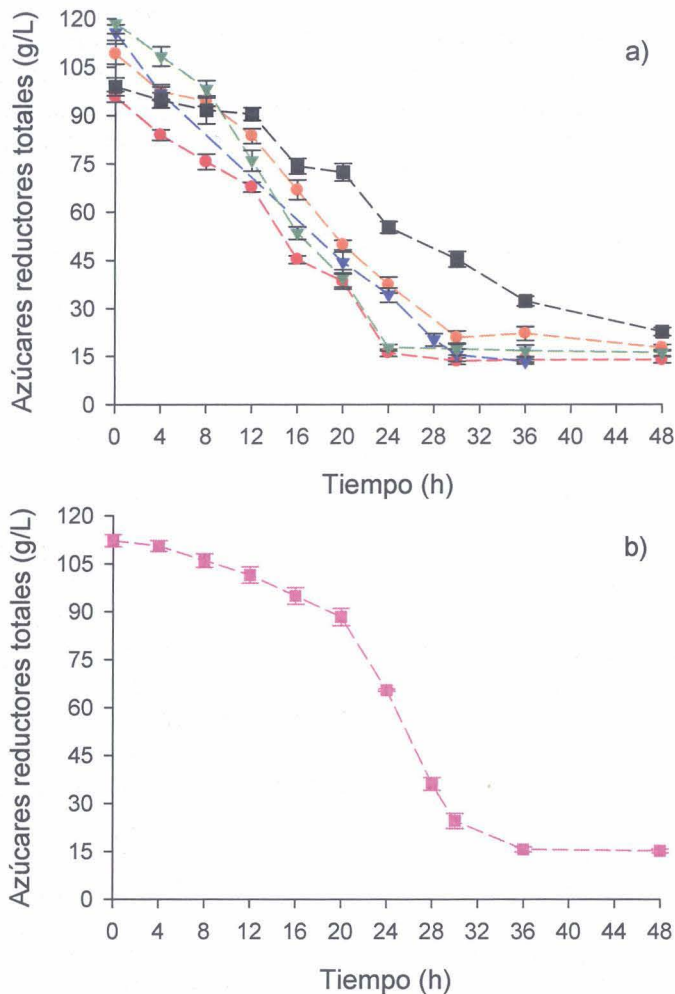


Figura 3.4. Cinética del consumo de azúcares reductores totales de los diferentes aislados en mosto rectificado e incubado a 37 °C en oscuridad. (a) Mosto inoculado con aislados autóctonos de *K. marxianus* obtenidos de: mosto recién extraído (Exo C1 -●-); mosto fermentado 24h (Ex 24C3 -●-); mosto fermentado 48 h (EX 48C4 -▼-); de las hojas de henequén (Cicy Ki -▼-) y *C. lusitaniae* aislada de mosto recién extraído (Exo C7 -■-). (b) Con un aislado alóctono de *S. cerevisiae* (SCP -■-). Los resultados son el promedio de tres repeticiones $\pm$ EE.

En el consumo de azúcares totales se observaron tres perfiles de comportamiento. El primero corresponde a los aislados de *K. marxianus*, que desde el inicio de la fermentación, consumieron los azúcares presentes en el mosto hasta finalizar la fermentación. El segundo perfil corresponde al aislado *C. lusitaniae*, que consumió lentamente los azúcares durante la fermentación, finalizando con la mayor cantidad residual de ART; y por último, el aislado *S. cerevisiae* durante las primeras horas de fermentación consumió muy lentamente los ART, pero después de este período de tiempo, inició un consumo acelerado finalizando con la menor cantidad de azúcares residuales.

La dinámica del consumo de los ART durante la fermentación, fue la misma observada en el consumo de los sólidos solubles (°Brix), por lo que se puede establecer una relación entre ellas.

3.8. EVALUACIÓN DEL CONSUMO DE ARD DURANTE LA FERMENTACIÓN

La determinación de la concentración de los azúcares reductores directos (ARD) se realizó posteriormente para poder relacionar el consumo de ARD hacia la producción de etanol, debido a que la concentración de ART incluye tanto a los azúcares reductores directos como azúcares reductores indirectos (ARI). La concentración inicial de ARD, en promedio, fue de 88.66 ± 1.90 g/L de mosto, y al final de la fermentación fue de 4.93 ± 0.728 (Ver anexo). La dinámica de su consumo por los diversos aislados se muestra en la figura 3.5.

Los aislados Exo C1 y Cicy Ki de *K. marxianus* presentaron una dinámica de consumo de ARD muy semejante. Durante las primeras 4 h, tiempo que duró su fase de adaptación al mosto, el consumo de ARD fue limitado (Figura 3.2a y 3.5a), pero al iniciarse la fase exponencial se incrementó el consumo, por lo que la concentración de azúcares disminuyó rápidamente hasta las 24 h de fermentación, quedando una concentración residual de 8.02 y 6.66 g/L de mosto, respectivamente. La velocidad en el consumo de los ARD fue de 3.15 g/h (Exo C1) y 3.5 g/h (Cicy Ki).

Los aislados Ex 24C3 y Ex 48C4 (*K. marxianus*) presentaron un comportamiento similar; durante la fase de adaptación (4h) consumieron muy pocos azúcares reductores, pero después incrementaron su consumo hasta finalizar la de fermentación. El

aislado EX 24C3 finalizó su fase exponencial a las 30 h con una concentración de ARD de 9.34 g/L y el aislado Ex 48C4 a las 36 h con 6.4 g/L (Figura 3.5a; Anexo). La velocidad en el consumo de ARD fue de 2.73 g/h para Ex 24C3 y de 2.33 g/h para Ex 48C4.

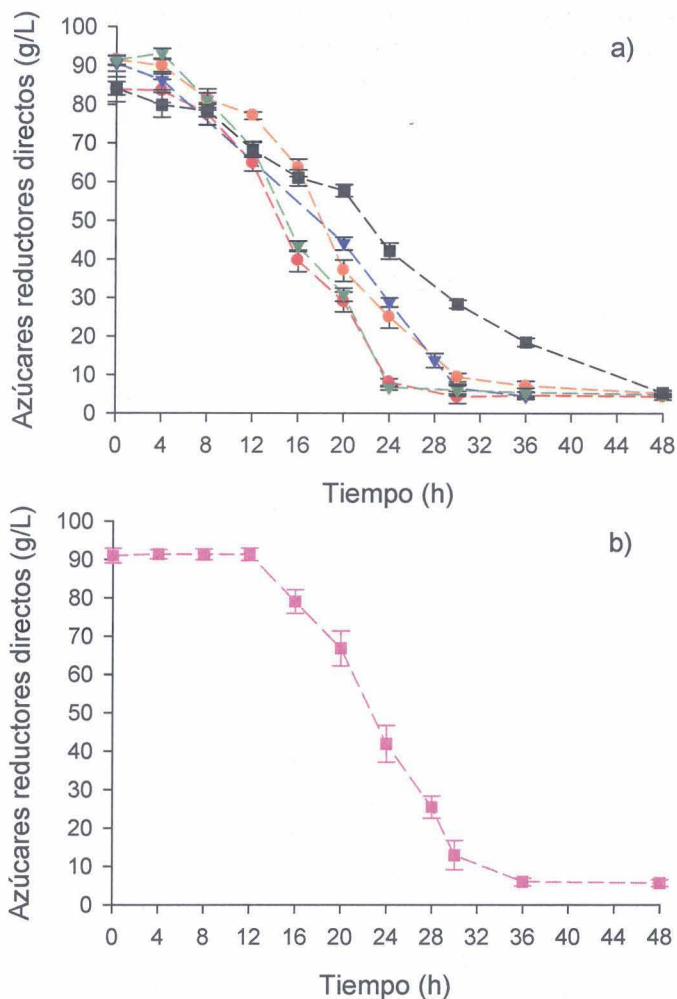


Figura 3.5. Cinética del consumo de azúcares reductores directos de los diferentes aislados en mosto rectificado e incubado a 37 °C en oscuridad. (a) Mosto inoculado con aislados autóctonos de *K. marxianus* obtenidos de: mosto recién extraído (Exo C1 -●-); mosto fermentado 24h (Ex 24C3 -●-); mosto fermentado 48 h (EX 48C4 -▼-); de las hojas de henequén (Cicy Ki -▼-) y *C. lusitaniae* aislada de mosto recién extraído (Exo C7 -■-). (b) Con un aislado alóctono de *S. cerevisiae* (SCP -■-). Los resultados son el promedio de tres repeticiones $\pm$ EE.

El aislado de *C. lusitaniae* (Exo C7), utilizó lentamente los ARD durante las primeras 8 h de fermentación, tiempo que duró su tiempo de adaptación al mosto. Posteriormente utilizó lentamente los ARD y posteriormente su consumo se incrementó de manera gradual hasta las 48 h, para finalizar su crecimiento exponencial con una concentración de 5.38 g/L y una velocidad de consumo de 1.64 g/h.

El aislado de *S. cerevisiae* consumió pocos ARD del mosto durante las primeras 12 h de fermentación que correspondieron a su fase de adaptación. Posteriormente, al iniciarse la fase exponencial de crecimiento, se aceleró la utilización de los ARD, la que finalizó a las 36 h de fermentación con una concentración de 5.61 g/L de ARD; la velocidad de consumo de éstos azúcares fue de 2.35 g/h, (Figura 3.5b).

La cuantificación del consumo de los azúcares durante la fermentación es importante ya que refleja la capacidad de los aislados de levaduras de utilizar los azúcares presentes en el mosto. Mediante la fermentación de los ARD las levaduras liberan la energía necesaria para sus actividades metabólicas y colateralmente generan productos secundarios como etanol, CO₂ y agua (Bautista-Justo *et al.*, 2001).

Los aislados Exo C1 y Cicy Ki de *K. marxianus* presentaron la mayor velocidad de consumo de ARD al finalizar su crecimiento exponencial (3.15 y 3.5 g/h respectivamente). Seguido de los aislados EX 24C3 y Ex 48C4 con 2.73 y 2.33 g/h. El aislado *C. lusitaniae* (Exo C7) presentó la menor velocidad de consumo (1.64 g/h), debido a que su crecimiento exponencial en el mosto fue muy lento (48 h).

El aislado de *S. cerevisiae*, a pesar que tuvo el mayor tiempo de adaptación, su crecimiento exponencial fue corto (24 h), por lo que presentó una velocidad de consumo semejante a los aislados de *K. marxianus* (Ex 24C3 y Ex 48C4) de 2.35 g/h.

Los azúcares reductores directos presentes en el mosto, como glucosa y principalmente fructosa, son producto de la hidrólisis ácida de la inulina, un polisacárido que se encuentra en mayor proporción en el jugo de diversos agaves (Arrizon & Gschaedler, 2002; Barahona, 1987; Bautista-Justo *et al.*, 2001; Sánchez-Marroquín & Hope, 1953).

Durante la cocción de piñas de *A. tequilana*, la inulina, genera un 20% de sacarosa, el trisacárido 1- β -fructosil inulobiosa, y compuestos que no son utilizados para producir etanol. Esto explica que la concentración de ART residuales en el mosto de *A. fourcroydes* probablemente corresponde a azúcares no fermentables (ARI), que junto con otros sólidos solubles están presentes al final de la fermentación y son los que se determinan en °Brix (Bautista-Justo *et al.*, 2001).

A cada uno de los aislados de levaduras, Lappe (comunicación personal), les determinó la capacidad para fermentar azúcares simples y complejos que se muestra en la tabla 3.5.

Tabla 3.5. Resultados de las pruebas de fermentación de nueve carbohidratos realizadas a los aislados de levaduras obtenidas de hojas y mosto de henequén.

Carbohidratos	<i>K. marxianus</i>				<i>C. colliculosa</i> Exo C3	<i>C. lusitanae</i> Exo C7	<i>C. praptilosis</i> Exo C16	<i>C. guilliermondii</i> Exo C54	<i>S. cerevisiae</i> SCP
	Exo C1	CICY KI	Ex 24C3	Ex 48C4					
Glucosa	+a	+a	+a	+a	+a	+a	+a	+	+a
Galactosa	+a	+a	+a	+a	-	+t	+lt	+lt	+a
Sacarosa	+a	+a	+a	+a	+a	+	-	+	+a
Maltosa	-	-	+t	-	+lt	-	+lt	-	+a
Lactosa	+a	+	+	+	-	-	-	-	-
Rafinosa	-	+a	+	+	+t	-	-	-	-
Trehalosa	-	-	-	-	+t	+t	+lt	+t	-
Fructosa	+a	+	+	+a	+	+	-	+a	+
Inulina	+lt	+a	+a	+lt	+lt	-	-	-	-

+a= Fermentación activa
 + = Fermentación positiva
 +t= Fermentación tardía
 +lt= Fermentación lenta y tardía
 - = Negativa después de 15 días
 ND= No determinada

Todos los aislados de *K. marxianus* (Cicy Ki, Exo C1, Ex 24 C3 y Ex 48C4) fermentaron activamente, es decir en menos de tres días, la glucosa, la galactosa y la sacarosa, continuando con la lactosa, la fructosa y la inulina. El aislado Exo C1 fue el único que no fermentó la rafinosa y el aislado Ex 24C3, después de siete días de incubación, fue el único que fermentó la maltosa.

Arrizon *et al.* (2005), en un estudio realizado en la fermentación del mosto de *A. tequilana* con cepas de *S. cerevisiae*, aisladas de diversos sustratos, determinaron diferentes comportamientos durante la fermentación y concluyeron que esta capacidad selectiva de fermentar determinados azúcares, se encuentra relacionado con el sustrato del cual fueron obtenidos.

En *A. fourcroydes*, los aislados de *K. marxianus* evaluados, durante la fermentación, mostraron diferencias en los carbohidratos que fermentaron (Tabla 3.5). Esta capacidad de fermentar determinados azúcares puede estar influenciada por la disponibilidad de éstos en el medio ambiente del cual fue aislado; lo que pudiera explicar los diferentes comportamientos observados durante la fermentación alcohólica como se determinó en *A. tequilana*.

El aislado autóctono de *C. colliculosa* (Exo C3) fermentó activamente la glucosa, la sacarosa y la fructosa, seguido de otros carbohidratos como la inulina, con una fermentación lenta y tardía que ocurrió después de 10 días de fermentación, en comparación con los aislados de *K. marxianus* que la fermentaron en forma activa.

El aislado de *C. lusitaniae* (Exo C7) fermentó activamente la glucosa, la sacarosa y la fructosa y en forma tardía, la trehalosa. El aislado de *C. parapsilosis* (Exo C16) solamente mostró fermentación positiva para la glucosa, la galactosa, la maltosa y la trehalosa. El aislado de *C. guilliermondii* (Exo C54) fermentó activamente la fructosa, continuando con la glucosa y la sacarosa, y fermentó lenta y tardíamente la galactosa y la trehalosa.

De acuerdo con la capacidad fermentadora determinada, las levaduras *C. lusitaniae* (Exo C7), *C. parapsilosis* (Exo C16) y *C. guilliermondii* (Exo C54), tienen la capacidad de desarrollarse en el mosto de *A. fourcroydes*; sin embargo solo el aislado de *C. lusitaniae* fermentó el mosto de *A. fourcroydes*, lo que pudo deberse a la composición

química del mosto y a la presencia de los compuestos generados después de la hidrólisis de los polisacáridos del mosto durante el cocimiento, incluyendo compuestos de Maillard, furfural y vainillina. Como el furfural y la vainillina son tóxicos para las levaduras, es probable que el mosto de agave contenga estos compuestos en cantidades que afecten el crecimiento y la actividad de las levaduras. Otro factor que pudo influir en la inhibición del crecimiento, pudo ser el requerimiento nutricional de cada especie, como es la asimilación de nitrógeno (Bautista-Justo *et al.*, 2001; Arrizon *et al.*, 2006; Arrizon & Gschaedler, 2002).

El aislado de *S. cerevisiae*, al igual que los aislados de *K. marxianus*, fermentó activamente la glucosa, la galactosa, la sacarosa y la maltosa, y después de 10 días de incubación la fructosa. En comparación con los aislados de *K. marxianus*, que además de estos carbohidratos fermentaron fructosa e inulina, principales carbohidratos presentes en el mosto de agaves (Bautista-Justo *et al.*, 2001; Sánchez-Marroquín & Hope, 1953) y en *A. fourcroydes* además de estos compuestos, se han detectado la rafinosa y trazas de xilosa y arabinosa (Barahona, 1987).

3.9. PRODUCCIÓN DE ETANOL

En la figura 3.6 se muestra la dinámica de producción de etanol por los diversos aislados durante las 48 h de fermentación. Los aislados de *K. marxianus* que produjeron la mayor cantidad de etanol fueron en orden decreciente, Cicy Ki que produjo 3.5% (35g/L) en 24 h; Exo C1 con 3.3% (33 g/L) en 36 h; Ex 48C4 y Ex 24C3 que produjeron un 3.1 % (31 g/L) en 30 y 36 h respectivamente (Figura 3.6a).

El aislado de *C. lusitaniae* (Exo C7) produjo la menor cantidad de etanol, con respecto a los demás aislados, pues solo alcanzó un 2.5% (25 g/L) a las 30 h. El aislado de *S. cerevisiae* (SCP) produjo un 3.2% (32 g/L) en 30 h, cantidad similar a la producida por el aislado Cicy Ki en 24 h, por lo que la actividad fermentadora de *S. cerevisiae* fue más lenta (Figura 3.6b).

Sin embargo, es importante señalar que en la fermentación de tequila, la producción de etanol junto con los alcoholes superiores comienza en las primeras horas, es decir, cuando los niveles de azúcares bajan y se obtienen los mayores valores de etanol y otros productos secundarios

al finalizar el crecimiento exponencial. Por lo tanto, el tequila producido en una fermentación lenta (mas de 24 h) es rico en sabor y aroma, en comparación con el producido en una fermentación rápida (18 a 20 h), debido a una clara diferencia en la producción de alcoholes superiores, aldehídos, ésteres y ácidos orgánicos, entre otros compuestos generados durante la fermentación por las levaduras. Con base a estos estudios, es importante tomar en cuenta además de una alta productividad, una buena producción de productos secundarios (Pinal *et al.*, 1997; Cedeño, 1995).

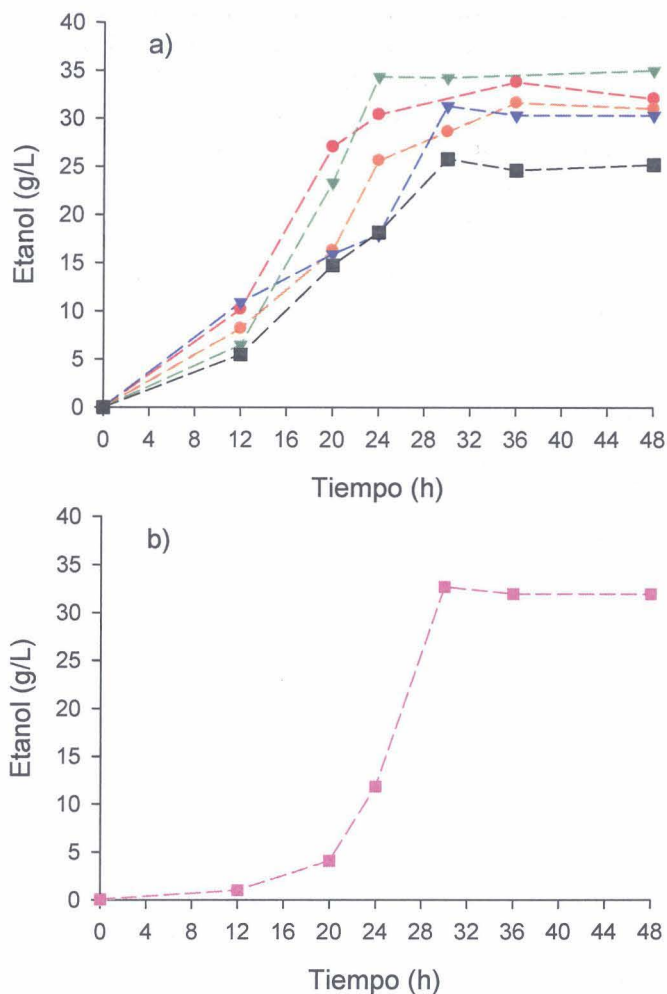


Figura 3.6. Cinética de producción de etanol de los diferentes aislados en mosto rectificado e incubado a 37 °C en oscuridad. (a) Mosto inoculado con aislados autóctonos de *K. marxianus* obtenidos de: mosto recién extraído (Exo C1 -●-); mosto fermentado 24h (Ex 24C3 -●-); mosto fermentado 48 h (EX 48C4 -▼-); de las hojas de henequén (Cicy Ki -▼-) y *C. lusitaniae* aislada de mosto recién extraído (Exo C7 -■-). (b) Con un aislado alóctono de *S. cerevisiae* (SCP -■-). Los resultados son valores absolutos.

En el proceso de fermentación realizada con cada uno de los aislados se determinó que la producción de etanol comenzó durante las primeras horas y que la cantidad máxima de etanol producido en el mosto por los aislados de *K. marxianus* (Ex 48C4), *C. lusitaniae* (Exo C7) y *S. cerevisiae*, se obtuvo entre las 30 y 36 h junto con el crecimiento exponencial y la estabilización de la concentración de azúcares. El mismo comportamiento se registró con el aislado Cicy Ki de *K. marxianus*, que produjo la mayor cantidad de etanol (3.5 %), al finalizar el crecimiento exponencial y la estabilización de azúcares, pero en menor tiempo de fermentación (24).

La producción máxima de etanol para los aislados Exo C1 y Ex 24C3 de *K. marxianus* fue a las 36 h, y el final de su crecimiento exponencial junto con la estabilización de los azúcares se determinó a las 30 h; en este lapso de tiempo hubo una variación de 0.3% de la producción de etanol, la cual puede atribuirse a un error en la determinación de etanol debido a falta de muestra. La producción de etanol se determinó como valor absoluto.

La productividad de los distintos aislados se calculó a partir de la ecuación 2.4 (Capítulo 2). El aislado de Cicy Ki (*K. marxianus*) tuvo la mayor producción de etanol, 1.45 g.L de mosto / h (g/L/h), seguido de SCP y Ex 48C4 con 1 g/L/h, y Exo C1 y Ex 24C3 con 0.937 y 0.877 g/L/h respectivamente, y finalmente el aislado Exo C7 que tuvo la menor producción con 0.833 g/L/h (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Productividad de los diversos aislados evaluados en la producción de etanol durante la fermentación en mosto.

Aislado	Especie	Etanol (g/L)	Tiempo (h)	Productividad (g/L/h)
Cicy Ki	<i>K. marxianus</i>	35	24	1.45
SCP	<i>S. cerevisiae</i>	32.6	30	1.0
Ex 48C4	<i>K. marxianus</i>	31.2	30	1.0
Exo C1	<i>K. marxianus</i>	33.7	36	0.93
Ex 24C3	<i>K. marxianus</i>	31.5	36	0.87
Exo C7	<i>C. lusitaniae</i>	25	30	0.83

Es importante analizar, con los resultados obtenidos, las posibles causas por las que la producción de etanol se detuvo, pues al final de todas las fermentaciones se determinaron en el mosto cantidades residuales, en promedio, de 4.93 ± 0.728 g/L de ARD y los resultados de la tolerancia al etanol de todas las cepas evaluadas mostraron que la menor tolerancia a este alcohol fue de 5-7% y la mayor concentración alcanzada durante la fermentación fue de 3.5 %, por lo que el cese de la fermentación no puede ser atribuida a ninguno de estos factores.

Así puede inferirse que probablemente la fermentación finalizó debido a que los sólidos solubles residuales contenidos en el mosto no son asimilables por estas cepas o atribuirse a otros factores entre ellos, productos tóxicos como el furfural y la vainillina derivados de la preparación del mosto, que fue sometido a congelación, y a un segundo proceso de esterilización, lo que pudo alterar su composición química y afectar el crecimiento de los aislados, por lo que es necesario realizar una caracterización de los azúcares presentes en el mosto para poder establecer las causas de que la fermentación haya finalizado.

En la industria tequilera se obtienen valores entre 4 y 9% v/v de contenido de alcohol, que depende de la concentración inicial de sólidos solubles en el mosto (8-16%), del tipo de nutrientes empleados para la suplementación del mosto (urea, sulfato de amonio, fosfato de amonio o sulfato de magnesio) y de la utilización de un cultivo iniciador (cultivos puros o mixtos). La fermentación finaliza en 24 h cuando se añade un cultivo iniciador, de lo contrario, finaliza en tres días (Cedeño, 1995).

Arrizon y Gschaedler (2002) determinaron que la adición de la fuente de nitrógeno en concentraciones altas de azúcares, durante el crecimiento exponencial, incrementa la eficiencia de la fermentación.

Tomando en consideración estos antecedentes, y que en la fermentación del mosto de *A. fourcroydes* se obtuvieron valores entre 2.5 y 3.5% de etanol al utilizar cepas puras como inóculo, y emplear como fuente de nitrógeno sulfato de amonio, dan resultados alentadores para incrementar la producción de etanol.

3.10. PARÁMETROS CINÉTICOS

En la tabla 3.7 se muestran los parámetros cinéticos que son necesarios evaluarse durante el desarrollo de la fermentación alcohólica y así obtener los rendimientos de los metabolitos producidos durante la misma. Entre estos parámetros se encuentran el rendimiento del producto (etanol) derivado de la cantidad de sustrato ($Y_{p/s}$), y la eficiencia del proceso de fermentación (E%), que se calcularon a partir de la ecuación 2.3.

$$Y_{p/s} = (Pf - Pi) / (Sf - Si)$$

La fermentación del mosto de henequén resultó ser muy buena; y los aislados Exo C1 y Cicy Ki de *K. marxianus* alcanzaron el mayor rendimiento en producción de etanol, de 0.425 y 0.415 g de etanol producido /g de ARD consumidos respectivamente. Si consideramos teóricamente que el rendimiento máximo es de 0.511 en condiciones óptimas de fermentación, entonces tenemos una eficiencia de la fermentación de 83.17 y 81.21%, respectivamente, lo que nos indica una eficiencia alta. Los aislados Ex 48C4 y Ex 24C3 de *K. marxianus*, tuvieron rendimientos de etanol de 0.407 y 0.359 g de etanol /g de ARD consumidos, por lo que su eficiencia fue de 79.64 y 70% respectivamente (Tabla 3.7).

El aislado menos eficiente fue Exo C7 de *C. lusitaniae* con un rendimiento de 0.320 g de etanol /g de ARD consumidos, y eficiencia de 62.60%. Es importante mencionar que en los procesos de fermentación una eficiencia por debajo del 70% se considera baja. El aislado SCP de *S. cerevisiae*, presentó un rendimiento de 0.410 y tuvo una buena eficiencia en la fermentación con 80.23%. Éste aislado, junto con los aislados Exo C1 y Cicy Ki fueron las más eficientes (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Principales parámetros cinéticos registrados durante la fermentación del mosto rectificado de henequén a 37 °C, en oscuridad, con los diferentes aislados de levaduras.

Aislado	Especie	Sustrato	Y _{p/s}	E (%)
Exo C1	<i>K. marxianus</i>	mosto recién extraído	0.425	83.17
Cicy Ki	<i>K. marxianus</i>	hojas de henequén	0.415	81.21
Ex 48C4	<i>K. marxianus</i>	mosto fermentado 48h	0.407	79.64
Ex 24C3	<i>K. marxianus</i>	mosto fermentado 24h	0.359	70.00
Exo C7	<i>C. lusitaniae</i>	mosto recién extraído	0.320	62.60
SCP	<i>S. cerevisiae</i>	mosto	0.410	80.234

En la determinación de la eficiencia de la fermentación solamente se tomó en cuenta la cantidad de sustrato requerida para alcanzar la máxima concentración de etanol, si se toma en consideración el tiempo requerido por cada aislado para alcanzar esta concentración de etanol, se deduce que el aislado mas eficiente fue Cicy Ki (*K. marxianus*).

Con base en los resultados obtenidos, la cepa Cicy Ki es la más adecuada para ser utilizada en la fermentación alcohólica del mosto de *A. fourcroydes*, ya que este aislado posee características deseables de un cultivo iniciador como: capacidad de iniciar su fase exponencial en el menor tiempo y sin necesidad de una fase de adaptación previa a este sustrato, lo que se traduce en una disminución en el tiempo de fermentación. En la industria esto implica un ahorro en los costos de producción (Mesas & Alegre, 1999). Por ello que se propone utilizar la cepa Cicy Ki en la fermentación del mosto de henequén para la obtención de etanol, pues el utilizar el microorganismo seleccionado y adaptado al sustrato ofrece ventajas para alcanzar el objetivo deseado.

El aislado Exo C7 de *C. lusitaniae*, fue el menos eficiente, ya que produjo la menor cantidad de etanol al final de la fermentación se tardaron en producir la máxima cantidad de etanol (25 g/L). Por ello no se recomienda utilizarlos como inóculo para llevar a cabo una fermentación controlada.

3.11. LITERATURA CITADA

- Arrizon, J., Concetta, F., Acosta, G., Romano, P. y Gschaedler, A. 2006.** Fermentation behaviour and volatile compound production by agave and grape must yeasts in high sugar Agave tequilana and grape must fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek*. **89**(1): 181-189.
- Arrizon, J. y Gschaedler, A. 2002.** Increasing fermentation efficiency at high sugar concentrations by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of the tequila fermentation process. *Can. J. Microbiol.* **48**: 965-970.
- Barahona, P. F. 1987.** Determinación de los azúcares presentes en el jugo de henequén (*Agave fourcroydes*) y su variación en el proceso de fermentación. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Mérida. Mérida, Yucatán.
- Bautista-Justo, M., García-Oropeza, L., Salcedo-Hernández, R. y Parra-Negrete, L. 2001.** Azúcares en agaves (*Agave tequilana* Weber) cultivados en el Estado de Guanajuato. *Acta Universitaria*. **11**(1): 33-38.
- Benítez, T., Castillo, L., Aguilera, A., Conde, J., Cerdá-Olmedo, E. 1983.** Selection of wine yeasts for growth and fermentation in the presence of ethanol and sucrose. *Appl. Environ. Microbiol.* **45** (5): 1429-1436
- Cedeño, C. M. 1995.** Tequila Production. *Critic. Rev. Biotech.* **15**: 1-11.
- Estrada-Godina, A. R., Cruz-Guerrero, A. E., Lappe, P., Ulloa, M., García-Garibay, M. y Gómez-Ruiz L. 2001.** Isolation and identification of Killer yeasts from *Agave* sap (aguamiel) and pulque. *W. J. Microbiol. & Biotechnol.* **17**: 557-560.
- Lachance, M. A. 1995.** Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*. **68**: 151-160.
- Lappe, P., Ulloa, M., Arce-Rocha, G., Cáceres-Farfán, M., Tapia-Tussell, R., Pérez-Brito, D. y Larqué, A. 2004.** Isolation and identification of the mycobiota present in *Agave fourcroydes*. Proceeding of XI International congress on yeast. Yeast in science and technology the quest for sustainable development. 15-20 Agosto, Rio de Janeiro, Brazil.
- Man You, K., Rosenfield, C. y Knipple, D. 2003.** Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl. Environ. Microbiol.* (69) **3**: 1499-1503.

- Mesas, J. M. y Alegre, M. T. 1999.** El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. *Ciencia y Tecnol. Aliment.* **2**(4): 174-183.
- Pinal, L., Cedeño, M., Gutiérrez, H. y Álvarez Jacobs. 1997.** Fermentation parameters influencing higher alcohol production in the tequila process. *Biotechnol. Lett.* **19**(1): 45-47.
- Sánchez-Marroquín, y. Hope, P. H. 1953.** Fermentation and Chemical Composition Studies of Some Species. *Agric. & Food Chem.* **1**(3): 246-249.
- Téllez, M. P. 1998.** El cocimiento, una etapa importante en la producción de tequila. *Bebidas Mexicanas.* **7** (1): 19-20.

Conclusiones

Los resultados obtenidos durante la fermentación arrojaron las siguientes conclusiones:

Cinética de crecimiento:

- Los aislados autóctonos Exo C1, Cicy Ki, Ex 24C3 y Ex 48C4 de *K. marxianus* y Exo C7 de *C. lusitaniae*, mostraron estar adaptadas al mosto de *A. fourcroydes*, ya que iniciaron su fase de crecimiento exponencial en las primeras horas (0-4 h) de fermentación. El aislado alóctono de *S. cerevisiae*, requirió 12 h para adaptarse al sustrato, y posteriormente iniciar su crecimiento exponencial.
- Los aislados autóctonos Exo C3 de *C. colliculosa*, Exo C 16 de *C. parapsilosis* y Exo C54 de *C. guilliermondii*, no fueron capaces de crecer en el mosto y fermentarlo, a pesar de que en las pruebas de fermentación fueron capaces de fermentar ciertos azúcares presentes en el mosto. Estas especies no mostraron crecimiento y tampoco variación en la concentración de los sólidos solubles.

Consumo de azúcares:

- La determinación de los sólidos solubles (°Brix), mostró ser una herramienta útil como indicador fácil y rápido de la dinámica de la fermentación.
- Entre los aislados evaluados, los de *K. marxianus* tuvieron la mayor velocidad de consumo de azúcares durante el crecimiento exponencial. El aislado SCP de *S. cerevisiae* a pesar que tuvo un periodo de adaptación al mosto superior a los de *K. marxianus*, la velocidad en el consumo de azúcares durante su crecimiento exponencial fue muy similar a estos.

Tolerancia y producción de etanol:

- *Saccharomyces. cerevisiae* presento la mayor tolerancia a etanol, de un 11%, seguida de los aislados Exo C1, Cicy Ki, Ex24C3 y EX48C4 de *K. marxianus* que toleraron un 7%. El aislado Exo C54 de *C. guilliermondii* toleró el 6% y la menor tolerancia de 5%, la presentaron *C. colliculosa* (Exo C3), *C. lusitaniae* (Exo C7) y *C. parapsilosis* (Exo C16).

Cambios en el pH

- Durante la fermentación hubo una ligera variación del pH; al final de la fermentación se observó un ligero descenso del pH (4.5-4).

Producción de etanol

- El aislado Cicy Ki de *K. marxianus*, obtenido de la base de las hojas, fue el más productivo, ya que produjo 35 g/L de mosto en el menor tiempo (24 h), por lo que se propone como inóculo para la producción de etanol.

Eficiencia

- Los aislados más eficientes en orden descendiente fueron Exo C1 y Cicy Ki de *K. marxianus* con 83.17 y 81.21 % respectivamente, *S. cerevisiae* con un 80.234 % y Ex 48C4 y 24 C3 de *K. marxianus* con 79.64 y 70 % respectivamente, y por último el aislado Exo C7 de *C. lusitaniae* con un 62.60%.

La fermentación finalizó debido a varios factores, a continuación se señalan algunas de las posibles causas:

- Presencia de productos tóxicos, que inhiben el crecimiento microbiano, pues al finalizar la fermentación, el mosto todavía contenía sólidos solubles, y la cantidad de etanol producida, fue inferior a la tolerancia de cada cepa evaluada.
- La fuente de nitrógeno o la concentración utilizada en este proceso no fue la adecuada.

Perspectivas

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, se propone las siguientes acciones:

- El uso de aislados de levaduras autóctonas, para ser utilizadas en un proceso fermentativo, pues, al estar adaptadas al sustrato ofrecen ventajas como acortar los tiempos de fermentación, y una fermentación más eficiente.
- Realizar el estudio químico de la composición del mosto de *A. fourcroydes*, congelado y esterilizado. Ello con el fin de esclarecer el porque algunas cepas aisladas del mosto recién extraído y potencialmente productoras de compuestos volátiles, no fueron capaces de crecer en el mosto congelado y esterilizado.
- Realizar la caracterización de compuestos volátiles del producto de la fermentación con cada uno de los aislamientos evaluados.
- Utilizar un inóculo mixto en la fermentación alcohólica de mosto de *A. fourcroydes*, con levaduras que sean buenas productoras de etanol y levaduras que sinteticen compuestos volátiles, el cual podría incrementar la eficiencia de la fermentación y la producción de productos secundarios.

Anexo

Contenido de azúcares (g/L) en el mosto de *A. fourcroydes* durante la fermentación con los diferentes aislados.

Kluyveromyces marxianus (Exo C1).

Tiempo (h)	AD	ARI	AT
0	83.85±3.20	11.97±2.86	95.82±1.64
4	83.41±3.02	0.52±2.55	83.93±1.63
8	ND	ND	ND
12	64.75±2.04	2.91±1.62	67.66±1.52
16	39.57±2.78	5.63±2.70	45.20±1.22
20	28.94±2.60	9.47±3.27	38.40±2.38
24	8.02±1.03	8.03±1.08	16.05±1.13
30	4.16±1.56	9.27±1.22	13.44±0.99
36	4.61±0.90	9.30±1.17	13.92±0.74
48	4.33±0.76	9.51±0.92	13.83±0.99

Kluyveromyces marxianus (Cicy Ki).

Tiempo (h)	AD	ARI	AT
0	91.31±1.24	27.13±3.35	118.4±3.10
4	93.00±1.42	15.23±3.09	108.2±2.98
8	81.05±1.90	17.08±1.92	98.12±2.66
12	68.62±1.76	7.30±3.25	75.92±3.22
16	43.39±1.35	10.04±1.50	53.43±1.96
20	30.79±1.73	8.56±2.89	39.36±2.70
24	6.66±0.57	10.99±1.12	17.65±1.03
30	5.97±1.31	11.21±1.50	17.18±1.83
36	5.31±1.26	11.29±1.29	16.60±1.79
48	4.76±0.45	11.22±0.89	15.98±0.99

ND= No determinados

Kluyveromyces marxianus (Cicy Ki).

Tiempo (h)	AD	ARI	AT
0	91.31±1.24	27.13±3.35	118.4±3.10
4	93.00±1.42	15.23±3.09	108.2±2.98
8	81.05±1.90	17.08±1.92	98.12±2.66
12	68.62±1.76	7.30±3.25	75.92±3.22
16	43.39±1.35	10.04±1.50	53.43±1.96
20	30.79±1.73	8.56±2.89	39.36±2.70
24	6.66±0.57	10.99±1.12	17.65±1.03
30	5.97±1.31	11.21±1.50	17.18±1.83
36	5.31±1.26	11.29±1.29	16.60±1.79
48	4.76±0.45	11.22±0.89	15.98±0.99

Kluyveromyces marxianus (Ex 24C3).

Tiempo (h)	AD	ARI	AT
0	91.40±1.13	17.63±3.31	109.0±3.11
4	89.86±1.97	7.44±2.99	97.29±2.26
8	81.29±2.72	13.20±2.26	94.48±1.58
12	77.09±0.95	6.49±2.09	83.57±2.29
16	63.59±2.25	3.21±2.04	66.79±3.02
20	37.05±2.77	12.64±5.51	49.70±1.49
24	24.94±2.78	12.33±2.73	37.27±2.50
30	9.34±1.09	11.47±3.73	20.81±2.02
36	7.051.37±	15.01±6.08	22.06±2.15
48	5.13±0.73	12.43±1.0	17.56±1.02

Kluyveromyces marxianus (Ex 48C4).

Tiempo (h)	AD	ARI	AT
0	90.46±1.96	25.25±1.61	115.7±2.39
4	86.09±2.35	10.72±2.18	96.81±2.08
8	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND
16	ND	ND	ND
20	44.08±1.64	0.19±3.01	44.27±3.27
24	28.82±1.18	5.28±1.82	34.10±2.23
30	13.80±1.82	6.30±0.87	20.10±1.92
36	6.40±1.28	8.94±1.49	15.34±1.94
48	4.38±0.18	8.88±0.72	13.26±0.71

ND= No determinados

Candida lusitanae (Exo C7).

Tiempo (h)	AD	ARI	AT
0	84.12±1.66	14.80±2.93	98.92±2.76
4	79.87±3.22	14.87±3.90	94.74±2.38
8	78.40±1.56	13.24±3.20	91.65±4.24
12	68.24±1.87	22.16±2.51	90.40±1.98
16	61.01±2.06	13.12±2.92	74.13±2.38
20	57.75±1.52	14.50±2.43	72.25±2.71
24	42.17±2.07	12.97±1.21	55.14±1.82
30	28.37±1.03	16.86±2.43	45.23±2.39
36	18.53±1.06	13.72±1.23	32.25±1.51
48	5.39±0.67	17.21±1.22	22.60±1.26

Saccharomyces cerevisiae (SCP).

Tiempo (h)	AD	ARI	AT
0	90.86±1.91	21.36±1.59	112.2±1.91
4	91.24±1.19	19.26±1.61	110.5±1.68
8	91.24±1.41	14.73±1.97	105.9±2.13
12	91.24±1.63	10.21±2.22	101.4±2.58
16	78.98±3.09	15.92±2.84	94.90±2.63
20	66.73±4.54	21.61±3.23	88.34±2.69
24	41.87±4.80	23.55±2.92	65.42±0.36
30	12.84±3.80	11.66±2.43	24.50±2.37
36	5.95±0.99	9.61±1.40	15.56±0.75
48	5.61±0.90	9.49±1.17	15.10±0.58