

AISLAMIENTO, SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA CINETICA FERMENTATIVA DE SACCHAROMYCES (ITOYISV001) OBTENIDA DE MOSTOS DE FERMENTACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE MEZCAL ARTESANAL DE OAXACA.

Emilene Reyes Rodríguez^a, Melissa Martínez Arias^b, Claudia López Sánchez^b, Felipe de Jesús Palma
Cruza

^aDivisión de Estudios de Posgrado e Investigación, Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Oaxaca, Av. Ing. Víctor Bravo Ahuja No. 125, esquina Calzada Tecnológico, C.P. 68030.

^bDepartamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Oaxaca. Avenida Ing. Víctor Bravo Ahuja No. 125, esquina Calzada Tecnológico, C.P. 68030.

[✉]corresponding autor. E-mail: claudia.ls@oaxaca.tecnm.mx

RESUMEN

Una estrategia para mejorar la calidad del mezcal consiste en seleccionar cepas de levadura presentes en la fermentación espontánea de esta bebida tradicional. El género *Saccharomyces* es la levadura utilizada por excelencia para la fermentación alcohólica, debido a su alto rendimiento y tolerancia a altas concentraciones de etanol. En este trabajo de investigación, a partir del aislamiento y selección de cepas de levaduras nativas de mostos de fermentación del proceso de Mezcal artesanal, se encontró en medio selectivo rosa de bengala con cloranfenicol, una cepa del género *Saccharomyces* (ITOYSV001) prometedora a nivel industrial. El objetivo del estudio fue la caracterización de la cepa bajo condiciones controladas a nivel laboratorio, estudiándola en dos niveles de pH, concentración de fuente de carbono (g/L) y etanol (% v/v). La caracterización cinética de esta cepa mostró su máxima velocidad de crecimiento a pH 5, 70 g/L de dextrosa como fuente de carbono y etanol al 14% v/v. Generalmente los mostos de fermentación se encuentran en pH 4 a 5, la concentración de azúcares iniciales es variable dependiendo de la madurez o la especie de agave empleado, sin embargo en este estudio se determinó que a mayor concentración (g/L) menor velocidad de crecimiento al igual que al aumentar la concentración (v/v) de etanol se observa inhibición del crecimiento, esto debido a la cantidad de cel/mL inoculadas (preinóculo), se observa un tiempo de latencia superior a las 24 h, el cual podría disminuirse aumentando la concentración inicial de cel/mL.

Palabras claves: *Saccharomyces*, Aislamiento, Caracterización, Tolerancia, Modelo de Gompertz.

Abstract

One strategy to improve the quality of mezcal consists of selecting yeast strains present in the spontaneous fermentation of this traditional drink. The genus *Saccharomyces* is the yeast used par excellence for alcoholic fermentation, due to its high yield and tolerance to high concentrations of ethanol. In this research work, from the isolation and selection of native yeast strains from fermentation musts of the artisanal Mezcal process, rose bengal with chloramphenicol was found in selective medium, a strain of the genus *Saccharomyces* (ITOYSV001) that was promising at an industrial level. The objective of the study was the characterization of the strain under controlled conditions at the laboratory level, studying it at two pH levels, carbon source concentration (g/L) and ethanol (% v/v). The kinetic characterization of this strain showed its maximum growth rate at pH 5, 70 g/L of dextrose as a carbon source and ethanol at 14% v/v. Fermentation musts are generally found at pH 4 to 5, the initial sugar concentration is variable depending on the maturity or the species of agave used, however in this study it was determined that the higher

the concentration (g/L) the lower the speed of growth as well as increasing the concentration (v/v) of ethanol growth inhibition is observed, this due to the amount of cells/mL inoculated (preinoculum), a latency time greater than 24h is observed, which could be decreased by increasing the initial concentration of cells/mL.

Keywords: *Saccharomyces*, Isolation, Characterization, Tolerance, Gompertz model.

1. INTRODUCCIÓN

El mezcal es una bebida alcohólica tradicional de México, en el Estado de Oaxaca se produce en su mayoría de forma artesanal. Entre las especies más utilizadas como materia prima destacan *A. angustifolia* por su alto volumen de producción, y *A. potatorum* (especie silvestre) por generar un mezcal de alta demanda en el mercado internacional (Molina-Guerrero et al. 2007; Vera et al. 2009; Escalante-Minakata et al. 2008). El proceso comienza con la recolección del agave; en esta etapa las plantas se cortan a partir de la base y la mayoría de sus hojas se eliminan, obteniendo el tallo de la planta llamada piña de agave, que se cuece en hornos cónicos bajo tierra. En esta etapa, los polisacáridos (fructanos), son hidrolizados térmicamente a jarabe de fructosa (González-Hernández et al. 2012) que luego se somete a fermentación alcohólica con levaduras autóctonas habitualmente mediante levaduras del género *Saccharomyces*, especialmente *Saccharomyces cerevisiae* (Martell et al. 2012; Pérez et al. 2013); etapa del proceso que es crítica, ya que en este paso los microorganismos transforman los azúcares en etanol y otros metabolitos secundarios que contribuyen a la composición química del mezcal (Arrizon et al. 2005; Martell et al. 2011).

Debido al uso de levaduras autóctonas para la fermentación de mezcal artesanal, el proceso tiene bajos rendimientos y un mayor tiempo de fermentación. Los parámetros de interés tecnológico para uso y empleo de cepas de levaduras a nivel industrial y/o artesanal son el alto rendimiento en la producción de etanol relacionado con la unidad de sustrato, gran capacidad de fermentación, tolerancia a altas concentraciones de etanol, tolerancia a bajos valores de pH, requerimientos mínimos de oxígeno, alta estabilidad bajo diferentes condiciones de fermentación, la utilización de una amplia gama de sustratos fermentables, entre otros (Concetta et al. 2005).

En este estudio se seleccionó e identificó una cepa de levadura del género *Saccharomyces* probando su capacidad de crecimiento en medio modificado en pH, concentración de fuente de carbono y porcentaje de etanol, con el fin de determinar la potencialidad del uso de esta cepa a nivel artesanal disminuyendo los tiempos de fermentación, logrando menores tiempos de latencia.

2. METODOLOGÍA.

2.1 Muestreo en palenque artesanal

La toma de muestra se realizó en un palenque artesanal ubicado en San Pedro Teozacoalco, Nochixtlán, Oaxaca en la tina de fermentación de mostos de maguey de horno (*Agave americana* L.). La muestra presentó un pH 4.5, 20 °Brix y una temperatura de 25°C. El transporte de la muestra se realizó en condiciones ideales para su mantenimiento.

2.2 Aislamiento de cepas de levaduras

A partir de la muestra tomada se realizaron diluciones seriadas en caldo peptonado al 1%, sembrando una alícuota de 50 µL de las diluciones 1x10³, 1x10⁴ y 1x10⁵ por extensión en placa con asa de Digrafsky, en agar rosa de bengala adicionado con cloranfenicol 100 mg/100 mL; se incubaron a 30°C en incubadora (marca ECOSHEL, modelo 9052L) por 72 horas, subsecuentemente se caracterizaron por su morfología macroscópica, de las cepas que presentaran diferencias se hizo la caracterización microscópica mediante la tinción con azul de metileno y observación en microscopio óptico marca VELAN™, modelo VE-B10.

2.3 Pruebas bioquímicas

Para las pruebas bioquímicas las cepas de levaduras se sometieron a las siguientes pruebas: Asimilación/Fermentación de fuente de carbono (12 azúcares) en solución al 4% (v/v): sacarosa (Sac), maltosa (Mal), lactosa (Lac), sorbitol (Sor), inulina (Inu), D-xylosa (D-Xyl), manitol (Mnt), galactosa (Gal), manosa (Man), fructosa (Fru), dextrosa (Dex), agarosa (Aga); empleando como medio base caldo rojo de fenol. La cepa que cumplió con las pruebas bioquímicas para el género *Saccharomyces* fue codificada como ITOYSIV001.

2.4 Formulación del inóculo

Se tomó una colonia de la cepa ITOYSIV001, y se colocó en 150 mL de medio YPD (extracto de levadura 10 g/L, peptona de caseína 20 g/L, dextrosa 20 g/L) y se incubó a 30 °C por 48 h. Pasado ese tiempo se llevó a cabo el conteo de células en cámara de Neubauer y se calculó la concentración (células/mL) utilizando la ecuación 1 donde FD es el factor de dilución.

$$\frac{Cel}{mL} = \frac{No. \text{ células contadas} \cdot 10\,000}{No. \text{ de cuadrantes}} \cdot FD \quad (1)$$

Posteriormente para establecer los experimentos se inoculó utilizando una concentración de 1x10⁶ células/mL en los matraces de fermentación.

2.5 Formulación de los medios de cultivo con respecto a los diferentes tratamientos

Se utilizó el medio YPD, la primer cinética se realizó a dos niveles de pH (3 y 5) ajustándolo con H²SO⁴ y NaOH; la segunda cinética se desarrolló modificando la concentración

dextrosa normal del medio de crecimiento a 30 g/L y 70 g/L; por último la tercer cinética se adicionó un porcentaje de etanol del 4% y 6% en el medio con alcohol etílico después de la esterilización. Se esterilizó a 12 lb por 20 minutos para evitar la caramelización de la glucosa.

2.6 Modelo de crecimiento microbiológico

Se analizaron los resultados obtenidos con respecto al Modelo de Gompertz (Ecuación 2) en el Software MatLab.

$$x(t) = x_0 + (x_{max} - x_0)e^{-e^{-\left[1 + \mu_{max} e^{\left(\frac{\lambda - t}{x_{max} - x_0}\right)}\right]}} \quad (2)$$

x(t) = ln N(t), siendo N(t) la densidad microbiana (Cel.mL⁻¹) en el tiempo t.

x₀ = ln N₀, siendo N₀ el valor asintótico inferior y aproximadamente igual a la densidad microbiana (Cel.mL⁻¹)

x_{max} = ln N_{max}, siendo N_{max} el valor asintótico superior y aproximadamente igual a la densidad microbiana (Cel.mL⁻¹)

μ_{max} = máxima velocidad específica de crecimiento (tiempo⁻¹)

λ = fase lag o de adaptación.

3. RESULTADOS

3.1 Cepas aisladas

Se aislaron un total de 5 cepas con diferencia morfológica a nivel microscópico que fueron codificadas como MOS2M1 a MOS2M5.

3.2 Pruebas bioquímicas

Las pruebas de 12 azúcares fueron comparados con respecto a lo reportado por Kurtzman y Lodder (2011) y Fundadora et al. (2005). En base a los criterios reportados por los autores la cepa codificada como MOS2M7 cumple con las pruebas bioquímicas para el género *Saccharomyces*, posteriormente fue modificado su código para continuar con la colección de cepas de la institución como ITOYSIV001.

3.3 Cinética de crecimiento con variación de pH, concentración de fuente de carbono y %etanol.

Los mostos de fermentación a nivel artesanal se encuentran en rangos de pH de 3 a 5 por tal motivo se probó su crecimiento celular en estos dos niveles; los resultados mostraron un decrecimiento progresivo a pH 3. A pesar de la inoculación a pH 3 tiene una fase de adaptación en las primeras 24 horas, no se observa presencia de fase exponencial (Figura 1a). Al igual que en la gráfica que muestra el crecimiento a pH 5 en la cinética con variación de concentración de fuente de carbono se observó que en las primeras 24 h se presenta la fase exponencial; teniendo que a mayor disponibilidad de fuente de carbono mayor biomasa (Cel.mL⁻¹) o crecimiento celular, sin embargo, la velocidad de crecimiento sufre una inhibición por sustrato (Figura 1b).

Una vez que es adicionado al medio etanol (% v/v) no se ve afectada su velocidad de crecimiento comenzando la fase exponencial, si comparamos el comportamiento cinético se obtuvo mayor crecimiento celular a 14% v/v de etanol, y se observó crecimiento con una tasa menor a una concentración de 9% v/v de etanol (Figura 1c), sin embargo en 14% v/v no se tiene una fase estacionaria por lo que a partir de las 48h comienza la fase de muerte, debido a este comportamiento no fue posible ajustarlo al modelo de Gompertz debido a que no presenta fase estacionaria aparente; debido a su crecimiento acelerado la cepa consume en su totalidad el sustrato por lo tanto no hay una fuente de carbono para mantener la fase estacionaria de crecimiento, otra circunstancia de la falta de fase estacionaria podría ser la inhibición por etanol viéndose afectada su velocidad de crecimiento y por lo tanto llegar a la fase de muerte; concordando con los estudios reportados por Ghareib et al. 1998 quienes estudiaron cepas de *Saccharomyces cerevisiae* determinando su alta tolerancia a etanol de 14% v/v, ellos registraron una disminución gradual del contenido de lípidos a medida que aumentaba la concentración de etanol suplementado al medio afectando la velocidad de crecimiento progresivamente. De la misma forma Chi y Arneborg (1999) encontraron que al trabajar con dos cepas de levaduras *Saccharomyces*, existe diferencia significativa en la tolerancia a etanol con pruebas a 18 % v/v con respecto a células viables. Por su parte Riles y Fay (2019) realizaron estudios con cepas de *Saccharomyces* para análisis de cepas termotolerantes a 30 y 37°C con variaciones de etanol del 2 al 10%, la velocidad de crecimiento de las levaduras se ve afectada por la temperatura y la concentración de etanol en el medio.

La comparación de las velocidades de crecimiento (μ_{max}) se presenta en la Tabla I donde podemos comparar y determinar que la cepa *Saccharomyces* (ITOYSIV001) presenta mayor velocidad de crecimiento celular a pH 5, 30 g/L de dextrosa y 14% v/v de etanol.

Parámetros	Factores de análisis					
	pH		Dextrosa (g.L ⁻¹)		Etanol (%v/v)	
	3	5	30	70	9	14
X_{max}	5.26E+06	1.16E+08	5.20E+07	9.12E+07	9.66E+06	-
μ_{max}	0.315125	0.89615	0.923374	0.7652003	0.1764	-
R ²	0.9743	0.988	0.992	0.9928	0.9998	-

Tabla I. Parámetros cinéticos calculados por el modelo de Gompertz.

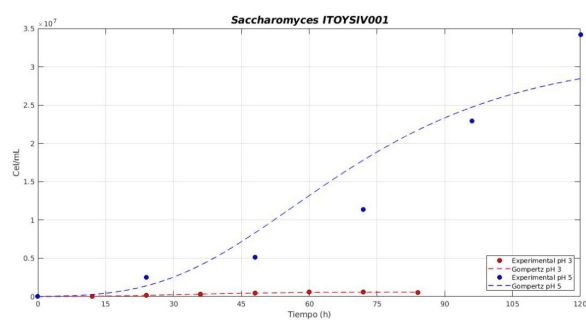


Fig. 1a.

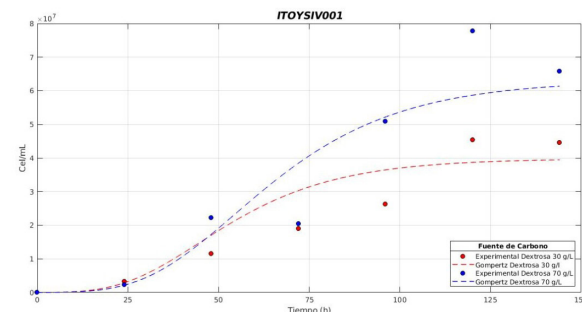


Fig. 1b.

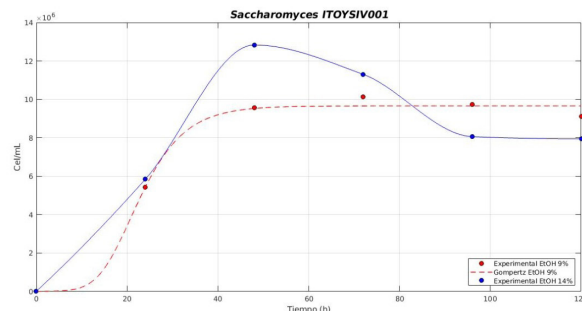


Fig. 1c.

Figura 1. Cinética de crecimiento de la cepa ITOYSIV001 con variación de: (a) pH, (b) concentración de fuente de carbono (dextrosa) y (c) %etanol.

Conclusiones

En base a los resultados obtenidos en esta investigación fue posible determinar las condiciones de cultivo y crecimiento de la cepa *Saccharomyces* (ITOYSIV001), los valores de R² obtenidos en base al modelo de Gompertz nos indican un alto grado de aproximación al crecimiento experimental, lográndose el modelamiento de esta cepa a las diferentes condiciones de estudio. La eficiencia de este tipo de cepa de levadura determina su robustez y, en gran medida, su capacidad para un buen desempeño en procesos industriales.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Álvarez-Ainza ML, Zamora-Quñonez KA, Acedo-Félix E (2009) Perspectivas para el uso de levaduras nativas durante la elaboración de bacanora. *Revista Latinoamericana de microbiología*. 52: 58-63.
- Arrizon J, Fiore C, Acosta G, Romano P, Gschaedler A (2005) 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: 181-189.
- Casas AA, Aguilar GCN, De la Garza TH, Morlett CJA, Montet D, Rodríguez HR (2015) Importancia de las levaduras no-*Saccharomyces* durante la fermentación de bebidas alcohólicas. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 65: 73-79.
- Chi Z, Arneborg N (1999) Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*. 86: 1047-1052.
- Concetta FJA, Anne GJF, Patrizia R (2005) Comparison between yeasts from grape and agave musts for traits of technological interest. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 21: 1141-1147.
- Escalante-Minakata P, Blaschek HP, Barba de la Rosa AP, Santos L, De León-Rodríguez A (2008) Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of *Agave salmiana*. *Letters in Applied Microbiology*. 46: 626-630.
- Fundadora N, García R, Álvarez I, Hernández L, Torres E (2005) Identificación y caracterización fermentativa de cepas de levaduras aisladas en la destilaría "A. Guiteras".
- Ghareib M, Youssef KA, Khalil AA (1989) Tolerance to ethanol of *Saccharomyces cerevisiae* and its relationship with the content and composition of lipids. *Folia Microbiol (Praha)*. 33: 447-52.
- González-Hernández JC, Pérez E, Damián RM, Chávez-Parga MC (2012) Isolation, molecular and fermentative characterization of a yeast used in ethanol production during mezcal elaboration. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 11: 389-400.
- Kurtzman C, Lodder J (2011) *The Yeast. A Taxonomic Study*. North Holland Publishing, Co. Amsterdam. 1385 pp.
- Martell NMA, Cordov, GEE, López MJ, Soto CNO, López PMG, Rutiaga QOM (2011) Effect of fermentation temperature on chemical composition of mescals made from *Agave duranguensis* juice with different native yeast genera. *African Journal of Microbiology Research*. 4: 3669-3676.
- Martell NMA, Córdova GEE, López MJ, Soto CNO, López PMG, Rutiaga Q, Olga M (2012) Effect of fermentation temperature on chemical composition of mescals made from *Agave duranguensis* juice with different native yeast genera. *African Journal of Microbiology Research*. 4: 3669-3676.
- Molina-Guerrero JA, Botello-Álvarez JE, Estrada-Baltazar A, Navarrete-Bolaños JL, Jiménez-Islas H, Cárdenas-Manríquez M, Rico-Martínez R (2007) Compuestos volátiles en el mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 6: 41-50.
- Pérez E, González-Hernández JC, Chávez-Parga MC, Cortés-Penagos C (2013) Caracterización fermentativa de levaduras productoras de etanol a partir de jugo de *Agave cupreata* en la elaboración de mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 12: 451-461.
- Riles L, Fay JC (2019) Genetic Basis of Variation in Heat and Ethanol Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes, Genomes, Genetics*. 9: 179-188.
- Vera GAM, Santiago GPA, López MG (2009) Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de Mezcal de *Agave angustifolia* y *Agave potatorum*. *Rev. Fitotec. Mex*. 32 4: 273 - 279.