



**HAL**  
open science

# Caracterización de levaduras nosaccharomyces para la producción de tequila con un perfil aromático específico

Luis Eduardo Segura García

## ► To cite this version:

Luis Eduardo Segura García. Caracterización de levaduras nosaccharomyces para la producción de tequila con un perfil aromático específico. Chemical and Process Engineering. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT; Centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño (Estado de Jalisco, Mexico), 2016. Español. NNT : 2016INPT0053 . tel-04246757

**HAL Id: tel-04246757**

**<https://theses.hal.science/tel-04246757v1>**

Submitted on 17 Oct 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Génie des Procédés et de l'Environnement

---

Présentée et soutenue par :

M. LUIS EDUARDO SEGURA GARCIA

le mercredi 29 juin 2016

Titre :

CARACTERISATION DES LEVURES NON-SACCHAROMYCES POUR  
LA PRODUCTION DE LA TEQUILA AVEC UN PROFIL DE SAVEUR  
SPECIFIQUE

---

Ecole doctorale :

Mécanique, Energétique, Génie civil, Procédés (MEGeP)

Unité de recherche :

Laboratoire de Génie Chimique (L.G.C.)

Directeur(s) de Thèse :

MME PATRICIA TAILLANDIER

MME ANNE GSCHAEDLER MATHIS

Rapporteurs :

M. CHARLES GHOMMIDH, UNIVERSITE MONTPELLIER 2

Mme PATRICIA LARRALDE, INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL MEXICO

Membre(s) du jury :

M. CHARLES GHOMMIDH, UNIVERSITE MONTPELLIER 2, Président

M. CEDRIC BRANDAM, INP TOULOUSE, Membre

Mme ANNE GSCHAEDLER MATHIS, CIATEJ JALISCO MEXIQUE, Membre

Mme PATRICIA TAILLANDIER, INP TOULOUSE, Membre

M. OSCAR SOTO, INSTITUTO TECNOLOGICO DE DURANGO, Membre

# TESIS

---

## CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS NO-SACCHAROMYCES PARA LA PRODUCCIÓN DE TEQUILA CON UN PERFIL AROMÁTICO ESPECÍFICO

---

Presenta: M en CyT SEGURA GARCÍA Luis Eduardo

**DIRECTOR:** Dra. GSCHAEDLER Anne

**CO-DIRECTOR:** Dra. TAILLANDIER Patricia

**ASESOR:** Dr. BRANDAM Cedric

**ASESOR:** Dra. AMAYA DELGADO Lorena



## RESUMEN

El presente trabajo de tesis trata del estudio de levaduras no-*Saccharomyces* (en particular *Kluyveromyces marxianus* y *Pichia kluyveri*) desde el punto de vista fisiológico en la fermentación de mostos a base de jugo de agave para la elaboración de tequila. Se estudiaron la influencia de diversos factores, como la fuente de carbono, el nitrógeno, la concentraciones de minerales (calcio y magnesio presentes en el medio), la aireación y la temperatura los cuales afectan el metabolismo de las levaduras, provocando cambios en la producción de compuestos volátiles durante la fermentación, que contribuyen positivamente a la bebida alcohólica.

Las levaduras que se utilizaron fueron obtenidas de la colección de cepas de CIATEJ, las cuales se aislaron de procesos de fermentación artesanal de mezcal de los estados de Oaxaca, Guerrero y San Luis Potosí en México. En base a los conocimientos previos disponibles en la literatura que demuestran que las levaduras no-*Saccharomyces* son buenas productoras de compuestos volátiles así como de los resultados obtenidos se considera que estas cepas de levaduras se podrían utilizar en la fermentación alcohólica del proceso de elaboración del tequila.

Los resultados ponen en evidencia que las levaduras no-*Saccharomyces* estudiadas, son afectadas por todos los factores estudiados, por lo que deben de controlarse durante el proceso de fermentación para de esta manera obtener un producto con los compuestos volátiles deseados. El potencial que mostraron estas cepas de levaduras, las califica como candidatas para poder llegar a realizar la fermentación de manera independiente, sin la necesidad de la presencia de *Saccharomyces cerevisiae*, o bien, en co-cultivo con *S. cerevisiae* llegando a obtener en ambos casos una bebida más aromática en comparación con los productos que se tienen actualmente en el mercado.

El conocimiento sobre las necesidades fisiológicas de las levaduras, nos da la oportunidad de poder modificar los compuestos presentes en la bebida alcohólica final, solo con el hecho de controlar los parámetros durante el proceso de fermentación.

**Palabras clave:** tequila, fermentación, levadura, no-*Saccharomyces*, inmovilización, compuestos volátiles, bebidas alcohólicas, cinéticas.

## RÉSUMÉ

Ce travail de thèse traite de l'étude de levures non-*Saccharomyces* (*Kluyveromyces marxianus* et *Pichia kluyveri*) du point de vue physiologique lors de la fermentation de moût à base de jus d'agave pour l'obtention de tequila. Il consiste à déterminer comment différents facteurs tels que la source de carbone, d'azote, les concentrations de minéraux (calcium et magnésium) présent dans le milieu, l'aération et la température affectent le métabolisme de la levure et provoque des changements dans la production de composés volatiles durant la fermentation qui peuvent contribuer positivement à la boisson alcoolisée.

Les levures utilisées au cours de cette étude ont été obtenues à partir de la collection de microorganismes du CIATEJ, qui ont été isolées à partir de différents procédés de fermentation artisanale de mezcal des états de Oaxaca, Guerrero et San Luis Potosi au Mexique. Sur la base de connaissances préalables disponibles dans la littérature qui démontrent que ces levures non-*Saccharomyces* sont de bonnes productrices de composés volatiles ainsi que des résultats obtenus, une utilisation de ces levures dans le procédé de fermentation alcoolique pour la production de tequila est considérée.

Les résultats montrent que les levures non-*Saccharomyces* étudiés sont affectées par tous les facteurs étudiés, ils doivent donc être considérés et contrôlés durant le procédé de fermentation pour obtenir la production des composés volatiles recherchés. Les souches étudiées présentent un certain potentiel qui leur permet de se positionner comme possible candidat pour réaliser une fermentation de manière indépendante sans avoir besoin de la présence de *Saccharomyces cerevisiae*, ou en co-culture avec *S. cerevisiae* pour obtenir dans les deux cas une tequila plus aromatique par rapport aux produits qui sont actuellement disponibles sur le marché.

La connaissance détaillée des besoins physiologiques de la levure, nous donne la possibilité de modifier les composés volatiles présents dans la boisson alcoolisée, en contrôlant les paramètres au cours du procédé de fermentation.

**Mots-clés:** tequila, fermentation, levures, non-*Saccharomyces*, immobilisation, composés volatils, boisson alcoolique, cinétique.

## ABSTRACT

The present work aimed to study how factors such as carbon and nitrogen source, calcium and magnesium concentration (in the medium), aeration or temperature disturb the metabolism of non-*Saccharomyces* yeasts (*Kluyveromyces marxianus* and *Pichia kluyveri*), specifically their impact on the production of volatile compounds during alcoholic fermentation of agave must employed in Tequila elaboration process.

The used yeasts were obtained from the collection of CIATEJ strains, which were isolated from artisanal mezcal fermentation processes from the states of Oaxaca, Guerrero and San Luis Potosi in Mexico. It is intended to use the information generated and then using these yeasts in alcoholic fermentation processes for the production of tequila. Based on prior knowledge that non-*Saccharomyces* yeasts are good producers of volatile compounds desired in alcoholic beverages requested by consumers and the results of this study, the use of these strains is considered for tequila production.

The results obtained in the present study revealed that all tested factors disturbed volatile compound production in these non-*Saccharomyces* yeasts and therefore need to be considered to drive fermentation processes aiming the production of a more aromatic beverage. Some yeast strains showed good potential to perform fermentation without or in co-culture with *S. cerevisiae* obtaining in both cases a product with more desired flavors compared to products currently on the market.

The knowledge about the physiological needs of these yeasts gives the opportunity to modify the composition of the alcoholic beverage, only by controlling the parameters during the fermentation process.

**Keywords:** tequila, fermentation, yeasts, non-*Saccharomyces*, immobilization, volatile compounds, alcoholic beverage, kinetics.

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mi familia por apoyarme, estando a mi lado siempre y en cada paso que decido hacer.*

*A la Dra Anne Gschaedler quien durante estos 9 años me ha brindado su amistad y se ha convertido no solo en una tutora, si no, en una amiga. Quien siempre ha confiado en mí brindándome todo su apoyo, permitiéndome ser parte de su proyecto de investigación y darme la oportunidad para desarrollarme en el ámbito de la investigación a su lado. Por compartirme todo sus conocimientos para mi desarrollo personal y profesional.*

*A la Dra Patricia Taillandier por aceptarme sin conocerme y brindarme todo su apoyo en Francia, confiando en mi y ofrecirme su ayuda para la realización de este trabajo, así como haber compartido sus conocimiento conmigo y resolverme todas mis dudas. Agradezco toda la ayuda recibida por ella y su familia en Francia cuando llegue y no conocía nada. Además le agradezco por obligarme a aprender el idioma Francés y motivarme para mejorarlo cada vez.*

*A mis asesores el Dr. Cedric Brandam y la Dra. Lorena Amaya, por compartirme sus conocimientos a lo largo de este trabajo y ayudarme en los momentos de dudas.*

*A mis amigos quienes siempre me estuvieron alentando para seguir adelante y terminar este trabajo. Al Dr. Manuel Kirchmayr con quien comencé este camino de formación convirtiéndose en un gran amigo. A Montse que siempre me apoyo, estando en todo momento preocupada por los reactores y que las levaduras no murieran, además de escucharme y entender mi frustración con las levaduras. A Zazil , Jorge, Lore, Evelyn, Xochitl, Patsy, David, Martha Fabiola, Memo, Paty Ramirez, Josué, Diana, Dania, Ivanna y todos los que siempre pusieron un toque de alegría y amistad en el laboratorio, haciendo más agradable la estancia en Ciatej.*

A todas las personas que me brindaron su ayuda y amistad en Francia durante las estancias que realice, Omar, Xochitl, Noura, Joyce, Claudia, Aldo, Lorena, Magali Fiot. Y a la comunidad latina que hace más llevadera y alegre la estadía en Francia. Adevid, Sabina, Heetor, Mariana, Isaura, Raul, Sofia, Abril, Igor, Laszlo, Cesar Aceves y Véronique.

A los estudiantes Luis Vera García, Vidal Cuevas, Gema Núñez, Laura Iñiguez, quienes contribuyeron de manera practica en la realización de este trabajo, aportando más que solo horas de trabajo, amistad y enseñanzas. A quienes más que enseñarles y ayudarles en sus tesis yo aprendí muchas cosas de ellos.

A todas las personas que estuvieron por poco o mucho tiempo durante la realización de este trabajo ya sea en Ciatej o algún otro lugar y convivieron conmigo.

A Conacyt por la Beca de doctorado y el financiamiento para la realización del trabajo por el Fomix-Jalisco 123157.

Al gobierno Francés y Conacyt-México por la beca para las estancias en Francia mediante la aprobación del proyecto PCP.

Al Químico Salvador Duran de la tequilera “La madrileña” por el apoyo y donación de materia prima para la realización de este trabajo.

Y finalmente pero el más importante a Dios, por darme salud y ponerme en este camino donde solo me han sucedido cosas buenas al realizar este proyecto, recibiendo enseñanzas, aprendizaje, bendiciones y muchas amistades.

## **DEDICATORIA**

*Este trabajo se lo dedico a la memoria de mi mamá Marta García González, quien partió al inicio de este trabajo pero nunca me dejó solo, pues desde el cielo siempre me acompañó, estando a mi lado, en mi mente y en mi corazón a cada momento.*

## **1. ÍNDICE...1**

1.1 Índice de tablas ... 6

1.1 Índice de figuras... 8

## **2. INTRODUCCIÓN... 16**

2.1 El tequila... 18

2.1.1 Norma y denominación de origen... 20

2.1.2 Importancia económica... 21

2.1.3 Proceso de elaboración... 21

2.2 Fermentación... 25

2.2.1 Fermentación por lotes... 26

2.2.2 Fermentación en continuo... 26

2.3 Levaduras... 27

2.3.1 *Saccharomyces*... 28

2.3.2 No-*Saccharomyces*...29

2.3.3 Cultivos mixtos... 30

2.4 Inmovilización de levaduras... 30

2.5 Producción de ésteres... 32

2.5.1 Síntesis por vía metabólica...33

2.5.2 Enzimas y genes involucrados en la producción de ésteres... 34

2.5.2.1 Medición de la expresión de genes... 34

2.5.2.2 RT-qPCR... 35

2.5.2.3 Genes de referencia... 36

2.5.3 Síntesis por vía química... 36

2.6 Factores involucrados en la producción de esteres... 38

2.6.1 Inmovilización... 38

2.6.2 Aireación... 39

2.6.3 Temperatura... 39

2.6.4 Fuente de carbono... 39

2.6.5 Nitrógeno... 40

2.6.6 Minerales... 41

2.6.7 Otros factores... 41

## **3. JUSTIFICACIÓN... 42**

## **4. HIPÓTESIS... 43**

## **5. OBJETIVOS... 44**

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS... 45**

6.1. Cepas de levaduras... 46

6.2. Medios de cultivo... 46

6.2.1. Medios sólidos... 46

6.2.2. Medios líquidos... 47

6.3. Conteo... 48

6.3.1. Directo al microscopio... 48

6.3.2. Conteo en caja... 50

6.3.2.1. Medio YPD... 50

6.3.2.2. Medio WL... 50

6.4. Inmovilización de levaduras... 51

6.5. Técnicas analíticas... 51

6.5.1. Azúcares (DNS)... 51

6.5.2. Nitrógeno amoniacal... 52

6.5.3. Nitrógeno asimilable... 53

6.5.4. Cromatografía de gases HS-GC... 53

6.5.5. Cromatografía de líquidos... 53

6.6. Condiciones de fermentación... 54

6.6.1. Nivel matraz... 54

6.6.2. Reactor en lotes... 54

6.6.3. Reactor continuo... 55

6.6.4. Escala piloto... 57

6.7. Medición de la expresión de genes *atf1*, *atf2*, *eht1*, *act1*, *qcr9* y *tfc1*... 57

6.7.1. Extracción de ácidos nucleicos totales... 57

6.7.2. Extracción de mRNA... 58

6.7.3. Síntesis de cDNA... 59

6.7.4. Medición de la expresión de los genes por RT-qPCR... 60

6.8. Análisis estadístico... 62

## **7. RESULTADOS... 63**

### **7.1. CAPITULO 1. Potencial de cepas no-Saccharomyces para su uso en fermentación alcohólica de jugo de *Agave* para la producción de tequila 100% y tequila... 64**

- 7.1.1 Introducción... 64
- 7.1.2 Metodología... 65
- 7.1.3 Resultados... 66
  - 7.1.3.1 Producción de etanol... 67
  - 7.1.3.2 Producción de compuestos volátiles... 70
  - 7.1.3.3 Análisis estadístico... 74
- 7.1.4 Conclusión... 77

### **7.2. CAPITULO 2. Influencia de la temperatura y la agitación durante la fermentación de jugo de *Agave* y medio semi-sintético con levaduras no-*Saccharomyces* para la producción de etanol y compuestos volátiles...79**

- 7.2.1. Introducción... 79
- 7.2.2. Materiales y métodos... 80
- 7.2.3. Resultados... 82
  - 7.2.3.1. Población de levaduras, cinéticas y velocidades máximas de crecimiento... 82
  - 7.2.3.2. Consumo de azúcar, cinéticas y velocidades de consumo de azúcar... 86
  - 7.2.3.3. Concentración final de etanol producido y rendimiento de etanol respecto al consumo de azúcar... 93
  - 7.2.3.4. Concentración de la producción de esterés... 97
  - 7.2.3.5. Concentración de la producción de alcoholes superiores... 100
- 7.2.4. Conclusión... 106

### **7.3. CAPITULO 3. Influencia de la concentración de Ca y Mg en el medio de fermentación sobre la capacidad de producción de etanol en levaduras no-*Saccharomyces* aisladas de procesos de fermentación de *Agave*... 107**

- 7.3.1. Introducción... 107
- 7.3.2. Materiales y Métodos... 108
- 7.3.3. Resultados... 111
  - 7.3.3.1. Estudio de las capacidades fermentativas de las cepas de levaduras en jugo de *Agave* y medio M11 enriquecido con jugo de *Agave*... 111

7.3.3.2. Evaluación del efecto de la concentración de Ca y Mg en las capacidades fermentativas de las levaduras... 114

7.3.3.3. Balance de carbono en medio JA y medio M11 modificando las concentraciones de Ca y Mg... 119

7.3.4. Conclusión... 120

#### **7.4. CAPITULO 4. Caracterización de cultivos puros libres e inmovilizados en jugo de *Agave* y medio semi-sintético, (artículo 1)... 122**

#### **7.5. CAPITULO 5. Efecto de la concentración de nitrógeno, aireación y temperatura en cultivo continuo en reactor con jugo de *Agave*, sobre la producción de etanol y compuestos volátiles con *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* y *Pichia kluyveri*... 131**

7.5.1. Introducción... 131

7.5.2. Metodología... 131

7.5.3. Resultados de las fermentaciones en continuo... 132

7.5.3.1. Fermentación en continuo AR5... 132

7.5.3.2. Fermentación en continuo DU3... 146

7.5.3.3. Fermentación en continuo GRO3... 156

7.5.4. Conclusión... 166

#### **7.6. CAPITULO 6. Relación entre la producción de esteres y la expresión de genes ATF1 y ATF2 en *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación en continuo en jugo de *Agave*... 167**

7.6.1. Introducción... 167

7.6.2. Metodología... 167

7.6.3. Resultados... 168

7.6.3.1. Correlación entre el nivel de la expresión de genes ATF1, ATF2, EHT1 y la concentración de etanol y ésteres de la cepa AR5 (*S. cerevisiae*)... 168

7.6.3.2. Correlación entre el nivel de la expresión del gen ATF1 y la concentración de etanol y ésteres de la cepa DU3 (*K. marxianus*)... 171

7.6.4. Conclusión... 175

#### **7.7. CAPITULO 7. Comparación de capacidades fermentativas de las cepas AR5, DU3 y GRO3 entre nivel reactor y nivel matraz, en condiciones controladas en el laboratorio... 176**

7.7.1. Introducción... 176

7.7.2. Metodología... 176

7.7.3. Resultados... 177

7.7.3.1. Fermentación del cultivo puro de AR5...	177
7.7.3.2. Fermentación del cultivo puro de DU3...	178
7.7.3.4. Fermentación del cultivo puro de GRO3...	180
7.7.3.5. Comparación de las capacidades fermentativas de las cepas en cultivo mixto entre el nivel matraz y el nivel biorreactor...	182
7.7.3.5.1. Fermentación AR5/DU3...	183
7.7.3.5.2. Fermentación AR5/GRO3...	185
7.7.3.6. Análisis estadístico...	187
7.7.3.7. Medición de $K_{la}$ ...	189
7.7.3.7.1. Introducción...	189
7.7.3.7.2. Metodología...	189
7.7.3.7.3. Resultados...	190
7.7.4. Conclusión...	191

## **7.8. CAPITULO 8. Caracterización de levaduras no-*Saccharomyces* en cultivo puro para la producción de tequila a nivel piloto... 192**

7.8.1. Introducción...	192
7.8.2. Metodología...	193
7.8.3. Resultados...	193
7.8.4. Conclusión...	197

## **7.9. CAPITULO 9. Caracterización de cultivos mixtos *Saccharomyces* /no-*Saccharomyces* y comparación contra *Saccharomyces* en cultivo puro. (Artículo 2)... 197**

## **7.10. CAPITULO 10. Modelo matemático de las cinéticas de crecimiento y consumo de azúcar de los cultivos puros y mixtos a nivel laboratorio en matraz... 218**

7.10.1. Introducción...	218
7.10.2. Metodología...	218
7.10.3. Resultados...	220
7.10.3.1. Cultivos puros...	220
7.10.3.2. Cultivos mixtos...	223
7.10.4. Conclusión...	229

## **8. CONCLUSIONES GENERALES... 230**

## **9. PERSPECTIVAS... 232**

## **10. BIBLIOGRAFÍA... 234**

## 1.1. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 6.1.</b> Descripción de las cepas	46
<b>Tabla 6.2.</b> Fermentaciones realizadas a nivel reactor	55
<b>Tabla 6.3.</b> Parámetros de fermentación utilizados en el reactor en continuo con cada una de las cepas de levaduras.	56
<b>Tabla 6.4.</b> Preparación de las reacciones de qPCR con SYBR Green Master.	61
<b>Tabla 6.5.</b> Programación de corrida para qPCR.	61
<b>Tabla 7.2.1.</b> Superficie de respuesta.	80
<b>Tabla 7.2.2.</b> Modelos matemáticos que se utilizaron con el programa <i>curve fit expert</i> para modelar los resultados de las fermentaciones.	81
<b>Tabla 7.2.3.</b> Velocidades máximas de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) de las cepas AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ), DU3 ( <i>K. marxianus</i> ), GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ) y DI ( <i>T. delbrueckii</i> ) en medio M11 y JA.	85
<b>Tabla 7.2.4.</b> Velocidades de consumo de azúcar de las cepas AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ), DU3 ( <i>K. marxianus</i> ), GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ) y DI ( <i>T. delbrueckii</i> ) en medio M11 y JA.	88
<b>Tabla 7.3.1.</b> Porcentaje de azúcar de los medios de fermentación	109
<b>Tabla 7.3.2.</b> Concentración de Ca y Mg de los medios de fermentación utilizados en el estudio del efecto de estos minerales.	109
<b>Tabla 7.3.3.</b> Concentraciones de fuente de carbono y principales productos de carbono, para la realización del balance de carbono.	119
<b>Tabla 7.6.1.</b> Valor del coeficiente de correlación que existe entre cada uno de los genes de interés y la concentración de ésteres producida.	168
<b>Tabla 7.6.2.</b> Valor del coeficiente de correlación que existe entre cada uno de los genes de interés y la concentración de ésteres producida.	172
<b>Tabla 7.7.1.</b> Valores de <i>p-value</i> obtenidos del análisis de ANOVA y grupos estadísticos que se formaron a partir del mismo análisis estadístico.	189
<b>Tabla 7.7.2.</b> Resultados de <i>Kla</i> y condiciones a las que se realizó cada una de las	190

mediciones.	
<b>Tabla 7.8.1.</b> Fermentación del cultivo mixto AR5/GRO3.	194
<b>Tabla. 7.8.2.</b> Concentración de los compuestos volátiles mayoritarios de la fermentación mixta AR5/GRO3. Concentración en mg/L, excepto el alcohol que es en g/L.	195
<b>Tabla 7.8.3.</b> Resultados de las concentraciones expresados de acuerdo a la NOM-006-SCFI-2012.	196
<b>Tabla. 7.10.1.</b> Parámetros cinéticos del crecimiento de las levaduras a partir del modelo MMF.	221
<b>Tabla. 7.10.2.</b> Parámetros cinéticos del consumo de azúcar a partir del modelo SL&P.	222
<b>Tabla. 7.10.3.</b> Parámetros cinéticos del crecimiento de las levaduras en cultivo mixto a partir del modelo MMF.	225
<b>Tabla. 7.10.4.</b> Parámetros cinéticos del crecimiento de cada una de las cepas de levadura en cultivo mixto a partir del modelo MMF.	225
<b>Tabla. 7.10.5.</b> Parámetros cinéticos del consumo de azúcar de los cultivos mixtos a partir del modelo SL&P.	227
<b>Tabla. 7.10.6.</b> Parámetros cinético del consumo de azúcar en los cultivos mixtos obtenidos a partir del modelo Sf.	229

## 1.2. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Pagina</b>
<b>Figura 2.1.</b> Mapa de México donde se aprecia la zona de denominación de origen para la producción de tequila.	20
<b>Figura 2.2.</b> Proceso de jima de las plantas de <i>Agave</i> .	22
<b>Figura 2.3.</b> Autoclaves y hornos comúnmente utilizados en la industria tequilera para realizar el proceso de cocimiento del <i>Agave</i> .	22
<b>Figura 2.4.</b> Fotografías de los molinos utilizados en la industria tequilera para la obtención del jugo de <i>Agave</i> .	23
<b>Figura 2.5.</b> Tinajas de fermentación.	23
<b>Figura 2.6.</b> Alambiques donde realiza la destilación de los mostos para obtener el tequila.	24
<b>Figura 2.7.</b> Cava donde se aprecian las barricas en las cuales se realiza el proceso de reposo o añejamiento del tequila.	24
<b>Figura 2.8.</b> Curva de crecimiento microbiano.	26
<b>Figura 2.9.</b> Morfología de una levadura.	28
<b>Figura 2.10.</b> Microfotografía de las levaduras inmovilizadas en diferentes soportes.	32
<b>Figura 2.11.</b> Esquema de las rutas metabólicas involucradas en el metabolismo de la producción de compuestos volátiles.	33
<b>Figura. 6.1.</b> Cámara de conteo Thoma.	49
<b>Figura 6.2.</b> Cámara de conteo Neubauer.	49
<b>Figura 6.3.</b> Esquema de las perturbaciones realizadas en el reactor en continuo.	57
<b>Figura 7.1.1.</b> Gráfica de la concentración de etanol producida a las 72 h por las 12 cepas de levaduras en los diferentes medios de fermentación.	69

<b>Figura 7.1.2.</b> Gráfica de la concentración de azúcar residual de las 12 cepas de levaduras a las 72h de fermentación, en los diferentes medios.	69
<b>Figura 7.1.3.</b> Gráfica del rendimiento de conversión del azúcar a etanol de las 12 cepas de levaduras a las 72h en los diferentes medios de fermentación.	70
<b>Figura 7.1.4.</b> Gráfica de la concentración de acetaldehído producido a las 72h por las 12 cepas de levaduras en los diferentes medios de fermentación.	70
<b>Figura 7.1.5.</b> Gráfica de la concentración de acetato de etilo producido a las 72h por las 12 cepas de levaduras en los diferentes medios de fermentación.	71
<b>Figura 7.1.6.</b> Gráfica de la concentración de 1-propanol producido a las 72h por las 12 cepas de levaduras en los diferentes medios de fermentación.	72
<b>Figura 7.1.7.</b> Gráfica de la concentración de isobutanol producido a las 72h por las 12 cepas de levaduras en los diferentes medios de fermentación.	73
<b>Figura 7.1.8.</b> Gráfica de la concentración de 1-butanol producido a las 72h por las 12 cepas de levaduras en los diferentes medios de fermentación.	73
<b>Figura 7.1.9.</b> Gráfica de la concentración de alcoholes amílicos producidos a las 72h por las 12 cepas de levaduras en los diferentes medios de fermentación.	74
<b>Figura 7.1.10.</b> Gráfica de funciones discriminantes de las fuentes de carbono.	75
<b>Figura 7.1.11.</b> Gráfica de correlación entre el acetato de etilo y el rendimiento de etanol, del análisis discriminante de las 12 cepas de levaduras.	76
<b>Figura 7.1.12.</b> Gráfica de la correlación del análisis discriminante de los 3 principales alcoholes superiores producidos por las 12 cepas de levaduras.	76
<b>Figura 7.2.1.</b> Cinéticas de crecimiento de las cepas AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ), DU3 ( <i>K. marxianus</i> ), GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ), DI ( <i>T. delbrueckii</i> ) en medio M11 y JA.	83
<b>Figura 7.2.2.</b> Cinéticas de consumo de azúcar de las cepas de levaduras AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ), DU3 ( <i>K. marxianus</i> ), GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ) y DI ( <i>T. delbrueckii</i> ) en medio M11 y JA.	87

<b>Figura 7.2.3.</b> Gráficos de superficie de respuesta de las concentraciones de población de levaduras a las 72 horas de incubación con las cepas AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ), DU3 ( <i>K. marxianus</i> ), GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ) y DI ( <i>T. delbrueckii</i> ) en medio M11 y JA.	90
<b>Figura 7.2.4.</b> Concentración de azúcar residual (g/L) a las 72h de incubación con las cepas AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ), DU3 ( <i>K. marxianus</i> ), GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ) y DI ( <i>T. delbrueckii</i> ) en medio M11 y JA.	92
<b>Figura 7.2.5.</b> Concentración final de etanol producida (g/L) a las 72h de incubación con las cepas AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ), DU3 ( <i>K. marxianus</i> ), GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ) y DI ( <i>T. delbrueckii</i> ) en medio M11 y JA.	94
<b>Figura 7.2.6.</b> Rendimiento de la producción de etanol respecto al consumo de azúcar ( $Y_{p/s}$ ) a las 72h de incubación con las cepas AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ), DU3 ( <i>K. marxianus</i> ), GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ) y DI ( <i>T. delbrueckii</i> ) en medio M11 y JA.	96
<b>Figura 7.2.7.</b> Concentración final de acetato de etilo producida (mg/L) a las 72h de incubación con las cepas AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ), DU3 ( <i>K. marxianus</i> ), GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ) y DI ( <i>T. delbrueckii</i> ) en medio M11 y JA.	98
<b>Figura 7.2.8.</b> Concentración final de acetato de isoamilo producida (mg/L) a las 72h de incubación con la cepa GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ) en medio M11 y JA.	100
<b>Figura 7.2.9.</b> Concentración final de 1-propanol producida (mg/L) a las 72h de incubación con las cepas AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ), DU3 ( <i>K. marxianus</i> ), GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ) y DI ( <i>T. delbrueckii</i> ) en medio M11 y JA.	101
<b>Figura 7.2.10.</b> Concentración final de isobutanol producida (mg/L) a las 72h de incubación con las cepas AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ), DU3 ( <i>K. marxianus</i> ), GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ) y DI ( <i>T. delbrueckii</i> ) en medio M11 y JA.	103
<b>Figura 7.2.11.</b> Concentración final de alcoholes amílicos producidos (mg/L) a las 72h de incubación con las cepas AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ), DU3 ( <i>K. marxianus</i> ), GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ) y DI ( <i>T. delbrueckii</i> ) en medio M11 y JA.	105
<b>Figura 7.3.1.</b> Cinéticas de crecimiento (a, c, e, f) y consumo de azúcar (b, d, f, h) de las levaduras AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ), DU3 ( <i>K. marxianus</i> ), GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ) y DI ( <i>T. delbrueckii</i> ) en	113

los medios de fermentación JA, M11, M11 sin Ca y los medios M11 enriquecidos con diferentes porcentajes de JA.	
<b>Figura 7.3.2.</b> Crecimiento de las levaduras al final de las 72 horas de fermentación con las diferentes concentraciones de Ca y Mg.	114
<b>Figura 7.3.3.</b> Concentración de azúcar residual de las 4 cepas de levaduras después de las 72 horas de fermentación.	115
<b>Figura 7.3.4.</b> Producción de etanol a las 72 horas de fermentación en las distintas concentraciones de Ca y Mg.	116
<b>Figura 7.3.5.</b> Producción de acetato de etilo de las 4 cepas de levaduras a las 72 horas de fermentación.	118
<b>Figura 7.5.1.</b> Cinética de la concentración de células y biomasa en la fermentación en continuo con la cepa AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).	133
<b>Figura 7.5.2.</b> Cinética de la concentración de gases exhaustos y oxígeno disuelto en el reactor de la fermentación en continuo con la cepa AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).	134
<b>Figura 7.5.3.</b> Evolución del pH a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).	136
<b>Figura 7.5.4.</b> Evolución de la concentración de azúcar y nitrógeno a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).	137
<b>Figura 7.5.5.</b> Evolución de la concentración producida de etanol a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).	139
<b>Figura 7.5.6.</b> Evolución de la concentración producida de acetaldehído a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).	140

<b>Figura 7.5.7.</b> Evolución de la concentración producida de ésteres (acetato, caprato y caprilato de etilo) a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).	142
<b>Figura 7.5.8.</b> Evolución de la concentración producida de alcoholes superiores (1-propanol, isobutanol y alcoholes amilicos) a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).	143
<b>Figura 7.5.9.</b> Cinética de la concentración de células y biomasa en la fermentación en continuo con la cepa DU3 ( <i>K.marxianus</i> ). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).	146
<b>Figura 7.5.10.</b> Cinética de la concentración de gases exhaustos y oxígeno disuelto en el reactor de la fermentación en continuo con la cepa DU3 ( <i>K. marxianus</i> ). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).	147
<b>Figura 7.5.11.</b> Evolución del pH a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa DU3 ( <i>K. marxianus</i> ). AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).	148
<b>Figura 7.5.12.</b> Evolución de la concentración de azúcar y nitrógeno a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa DU3 ( <i>K. marxianus</i> ). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).	149
<b>Figura 7.5.13.</b> Evolución de la concentración producida de etanol a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa DU3 ( <i>K. marxianus</i> ). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).	150
<b>Figura 7.5.14.</b> Evolución de la concentración producida de acetaldehído a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa DU3 ( <i>K. marxianus</i> ). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).	151
<b>Figura 7.5.15.</b> Evolución de la concentración producida de ésteres (acetato de etilo y acetato de isoamilo) a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa DU3 ( <i>K. marxianus</i> ). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).	152
<b>Figura 7.5.16.</b> Evolución de la concentración producida de alcoholes superiores (1-propanol, isobutanol y alcoholes amilicos) a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa DU3 ( <i>K. marxianus</i> ). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).	154
<b>Figura 7.5.17.</b> Cinética de la concentración de células y biomasa en la fermentación en continuo con la cepa GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).	157

<b>Figura 7.5.18.</b> Cinética de la concentración de gases exhaustos y oxígeno disuelto en el reactor de la fermentación en continuo con la cepa GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).	158
<b>Figura 7.5.19.</b> Evolución del pH a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).	159
<b>Figura 7.5.20.</b> Evolución de la concentración de azúcar y nitrógeno a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).	160
<b>Figura 7.5.21.</b> Evolución de la concentración producida de etanol a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).	161
<b>Figura 7.5.22.</b> Evolución de la concentración producida de acetaldehído a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).	162
<b>Figura 7.5.23.</b> Evolución de la concentración producida de ésteres (acetato de etilo y acetato de isoamilo) a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).	163
<b>Figura 7.5.24.</b> Evolución de la concentración producida de alcoholes superiores (1-propanol, isobutanol y alcoholes amilicos) a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).	164
<b>Figura 7.6.1.</b> Comparación entre la cinética de concentración de etanol y ésteres (acetato de etilo, caprato de etilo y caprilato de etilo) con el nivel de expresión del gen EHT1 con respecto al gen ACT1 de la cepa AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ).	168
<b>Figura 7.6.2.</b> Comparación entre la cinética de concentración de etanol y ésteres (acetato de etilo, caprato de etilo y caprilato de etilo) con el nivel de expresión del gen ATF1 con respecto al gen ACT1 de la cepa AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ).	162
<b>Figura 7.6.3.</b> Comparación entre la cinética de concentración de etanol y ésteres (acetato de etilo, caprato de etilo y caprilato de etilo) con el nivel de expresión del gen ATF2 con respecto al gen ACT1 de la cepa AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ).	171
<b>Figura 7.6.4.</b> Comparación entre la cinética de concentración de etanol y ésteres (acetato de etilo, acetato de isoamilo y caprato de etilo) con el nivel de expresión del gen ATF1 con respecto al gen ACT1 de la cepa GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ).	172

<b>Figura 7.7.1.</b> Evolución de la población de levaduras y concentración de azúcar a lo largo de la fermentación con la cepa AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ) en cultivo puro a nivel matraz y nivel biorreactor de 3L.	177
<b>Figura 7.7.2.</b> Concentración de los principales compuestos volátiles y rendimiento de alcohol respecto al sustrato ( $Y_{p/s}$ ) producidos por la cepa AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ) en cultivo puro a nivel matraz y nivel biorreactor de 3L.	178
<b>Figura 7.7.3.</b> Evolución de la población de levaduras y concentración de azúcar a lo largo de la fermentación con la cepa DU3 ( <i>K. marxianus</i> ) en cultivo puro a nivel matraz y nivel biorreactor de 3L.	179
<b>Figura 7.7.4.</b> Concentración de los principales compuestos volátiles y rendimiento de alcohol respecto al sustrato ( $Y_{p/s}$ ) producidos por la cepa DU3 ( <i>K. marxianus</i> ) en cultivo puro a nivel matraz y nivel biorreactor de 3L.	180
<b>Figura 7.7.5.</b> Evolución de la población de levaduras y concentración de azúcar a lo largo de la fermentación con la cepa GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ) en cultivo puro a nivel matraz y nivel biorreactor de 3L.	181
<b>Figura 7.7.6.</b> Concentración de los principales compuestos volátiles y rendimiento de alcohol respecto al sustrato ( $Y_{p/s}$ ) producidos por la cepa GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ) en cultivo puro a nivel matraz y nivel biorreactor de 3L.	182
<b>Figura 7.7.7.</b> Evolución de la población de levaduras y concentración de azúcar a lo largo de la fermentación en cultivo mixto con las cepas AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ) y DU3 ( <i>K. marxianus</i> ) a nivel matraz y nivel biorreactor de 3L.	183
<b>Figura 7.7.8.</b> Concentración de los principales compuestos volátiles y rendimiento de alcohol respecto al sustrato ( $Y_{p/s}$ ) producidos por las cepas AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ) y DU3 ( <i>K. marxianus</i> ) en cultivo mixto a nivel matraz y nivel biorreactor de 3L.	184
<b>Figura 7.7.9.</b> Evolución de la población de levaduras y concentración de azúcar a lo largo de la fermentación en cultivo mixto con las cepas AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ) y GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ) a nivel matraz y nivel biorreactor de 3L.	185
<b>Figura 7.7.10.</b> Concentración de los principales compuestos volátiles y rendimiento de alcohol respecto al sustrato ( $Y_{p/s}$ ) producidos por las cepas AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> ) y GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> ) en cultivo mixto a nivel matraz y nivel biorreactor de 3L.	187
<b>Figura 7.7.11.</b> Gráfica de componentes principales de los compuestos volátiles mayoritarios producidos, así como del etanol y rendimiento de etanol, en relación a las fermentaciones realizadas en matraz y biorreactor en cultivo puro y cultivo mixto.	188
<b>Figura 7.10.1.</b> Cinéticas de crecimiento de los cultivos puros en medio M11.	220

<b>Figura 7.10.2.</b> Cinéticas de crecimiento de los cultivos puros en medio JA.	220
<b>Figura 7.10.3.</b> Cinéticas de consumo de azúcar de los cultivos puros en medio M11.	221
<b>Figura 7.10.4.</b> Cinéticas de consumo de azúcar de los cultivos puros en medio JA.	222
<b>Figura 7.10.5.</b> Cinéticas de crecimiento del cultivo mixto AR5/DU3 en medio M11.	223
<b>Figura 7.10.6.</b> Cinéticas de crecimiento del cultivo mixto AR5/DU3 en medio JA.	223
<b>Figura 7.10.7.</b> Cinéticas de crecimiento del cultivo mixto AR5/GRO3 en medio M11.	224
<b>Figura 7.10.8.</b> Cinéticas de crecimiento del cultivo mixto AR5/GRO3 en medio JA.	224
<b>Figura 7.10.9.</b> Cinéticas de consumo de azúcar del cultivo mixto AR5/DU3 en medio M11.	226
<b>Figura 7.10.10.</b> Cinéticas de consumo de azúcar del cultivo mixto AR5/DU3 en medio JA.	226
<b>Figura 7.10.11.</b> Cinéticas de consumo de azúcar del cultivo mixto AR5/GRO3 en medio M11.	227
<b>Figura 7.10.12.</b> Cinéticas de consumo de azúcar del cultivo mixto AR5/GRO3 en medio JA.	227
<b>Figura 7.10.13.</b> Comparación de las cinéticas de consumo de azúcar de los cultivos mixtos modelados con el modelo MMF y el modelo Sf.	228

## 2. INTRODUCCIÓN

Recientemente el estudio de las levaduras no-*Saccharomyces* ha permitido su aplicación y utilización en diversos procesos. En bebidas alcohólicas contribuyen de manera positiva al perfil aromático de la bebida. Para la elaboración de tequila, se tiene industrializado el proceso, lo cual permite controlar diversos factores durante el proceso de fermentación, por lo que el estudio de factores nutrimentales y ambientales, puede ayudar a mejorar el producto en cuanto a la concentración de aromas, sin necesidad de llegar a cambiar el tipo de levadura utilizado.

Los factores nutrimentales como la fuente de carbono y nitrógeno afectan el metabolismo de la levadura, y por tanto la producción de compuestos, los cuales estarán presentes en la bebida alcohólica, y llegan a contribuir positiva o negativamente al sabor y aroma. La aireación durante el proceso de fermentación contribuye positivamente, favoreciendo la producción de esteroides. Los esteroides son los compuestos químicos que están relacionados a los aromas frutales de las bebidas, los cuales son deseados por el consumidor, por lo que la concentración de esteroides en la bebida es un indicativo del perfil aromático.

Para el estudio de las condiciones ambientales se puede utilizar la fermentación en lote, en la cual deben de realizarse diversas fermentaciones cambiando un factor a la vez en los diferentes niveles que se deseen estudiar, otra opción es la realización de fermentación en continuo, donde en una misma fermentación se logra un estado fisiológico dinámico en equilibrio, pudiendo realizar disturbios de manera controlada y evaluando el efecto sobre el metabolismo, lo cual permite hacer el estudio sobre el mismo cultivo, teniendo resultados más certeros.

Con el fin de poder llegar a hacer estimaciones, acerca de cómo cada uno de los factores pueden llegar a afectar a la fermentación, la herramienta más adecuada es el modelar los procesos fermentativos matemáticamente, obteniendo ecuaciones que nos permiten llegar a hacer predicciones de manera teórica, o bien, nos permiten explicar el comportamiento fisiológico de forma matemática, pudiendo hacer comparaciones más certeras, que nos permitan tomar decisiones sobre cambios en el proceso.

Todos los estudios que se realizan a nivel laboratorio deben de llegar a escalarse y comprobarse industrialmente, debido a que la dinámica de los tanques de fermentación así como la presión ejercida por los grandes volúmenes de líquido, provocan cambios que deben de considerarse para llegar a obtener el producto deseado que se formuló en el laboratorio. Para esto deben de tomarse en consideración factores como geometría de los reactores, control de flujo de aire, volumen de líquido en el reactor, entre otras cosas.

Pero finalmente quien determina si todos estos cambios realizados durante el proceso, son favorable o no, será el consumidor, quien realiza la evaluación final, para

dar su visto bueno y aprobar que los cambios en la composición química de la bebida sean deseados.

## 2.1. EL TEQUILA.

El tequila es una bebida alcohólica destilada de *Agave* que se ha convertido en emblema de México en el mundo entero.

De acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-006-SCFI-2012, Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones. El Tequila es una bebida alcohólica regional obtenida por destilación de mostos, preparados directa y originalmente del material extraído, en las instalaciones de la fábrica de un Productor Autorizado la cual debe estar ubicada en el territorio comprendido en la Declaración, derivados de las cabezas de *Agave* de la especie *tequilana* Weber variedad azul, previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas, y sometidos a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, siendo susceptibles los mostos de ser enriquecidos y mezclados conjuntamente en la formulación con otros azúcares hasta en una proporción no mayor de 49% de azúcares reductores totales expresados en unidades de masa, en los términos establecidos en la norma y en la inteligencia que no están permitidas las mezclas en frío. El Tequila es un líquido que puede tener color, cuando sea madurado, abocado, o añadido de un color específico.

El Tequila puede ser añadido de edulcorantes, colorantes, aromatizantes y/o saborizantes permitidos por la Secretaría de Salud, con objeto de proporcionar o intensificar su color, aroma y/o sabor.

De acuerdo al porcentaje de los azúcares provenientes del *Agave* que se utilice en la elaboración del Tequila, éste se puede clasificar en una de las dos siguientes categorías:

### **"100% de agave"**

No es enriquecido con otros azúcares distintos a los obtenidos del *Agave* de la especie *tequilana* weber variedad azul cultivado en el territorio comprendido en la Declaración.

Para que este producto sea considerado como "Tequila 100% de agave" debe ser envasado en la planta que controle el propio Productor Autorizado, misma que debe estar ubicada dentro del territorio comprendido en la Declaración.

Este producto debe ser denominado únicamente a través de alguna de las siguientes leyendas: "100% de agave", "100% puro de agave", "100% agave", o "100% puro agave", al final de las cuales se puede añadir la palabra "azul".

### **"Tequila"**

Los mostos son susceptibles de ser enriquecidos y mezclados conjuntamente en la formulación con otros azúcares hasta en una proporción no mayor de 49% de azúcares reductores totales expresados en unidades de masa. Este enriquecimiento máximo de hasta 49% de azúcares reductores totales expresados en unidades de masa, no se debe realizar con azúcares provenientes de cualquier especie de *Agave*. Sólo se podrá incrementar el 51% de azúcares reductores totales expresados en unidades de masa con azúcares reductores

totales provenientes de *Agave* de la especie *tequilana* weber variedad azul cultivado en el territorio comprendido en la Declaración.

Este producto puede ser envasado en plantas ajenas a un Productor Autorizado, siempre y cuando los envasadores cumplan con las condiciones establecidas en la norma.

El Tequila también se clasifica de acuerdo al tiempo de reposos en barricas tendiendo 5 categorías:

#### Tequila blanco o plata

Producto transparente no necesariamente incoloro, sin abocante, obtenido de la destilación añadiendo únicamente agua de dilución y en los casos que proceda para ajustar la graduación comercial requerida, pudiendo tener una maduración menor de dos meses en recipientes de roble o encino.

#### Tequila joven u oro

Producto resultante de la mezcla de Tequila blanco con Tequilas reposados y/o añejos y/o extra añejo.

También se denomina Tequila joven u oro al producto resultante de la mezcla de tequila blanco con alguno de los ingredientes previstos, lo que se conoce como abocamiento.

#### Tequila reposado

Producto susceptible de ser abocado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos dos meses en contacto directo con la madera de recipientes de roble o encino. Su contenido alcohólico comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución. El resultado de las mezclas de Tequila reposado con Tequilas añejos o extra añejos, se considera como Tequila reposado.

#### Tequila añejo

Producto susceptible de ser abocado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos un año en contacto directo con la madera de recipientes de roble o encino, cuya capacidad máxima sea de 600 litros, su contenido alcohólico comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución.

El resultado de las mezclas de Tequila añejo con Tequila extra añejo se considera como Tequila añejo.

#### Tequila extra añejo

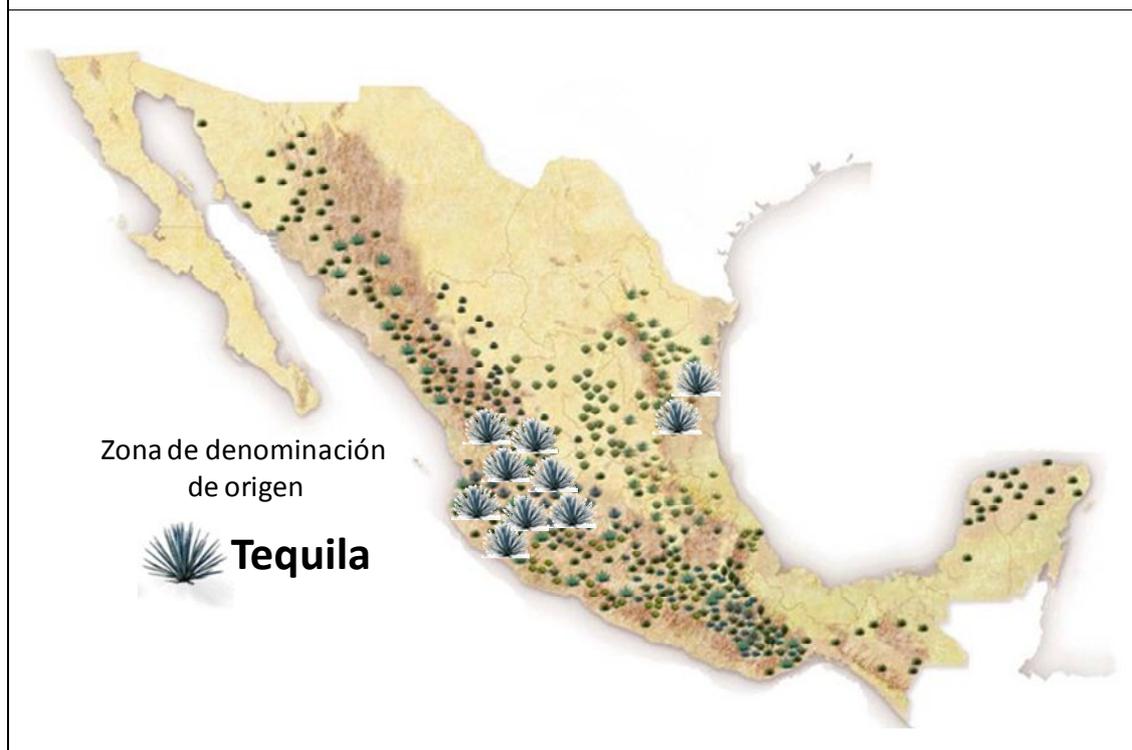
Producto susceptible de ser abocado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos tres años, en contacto directo con la madera de recipientes de roble o encino, cuya capacidad máxima sea de 600 litros, su contenido alcohólico comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución.

### 2.1.1. NORMA Y DENOMINACIÓN DE ORIGEN

La producción de tequila está regulada por la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012, y el organismo que cuida y vigila que se cumpla es el Consejo Regulador del Tequila (CRT), además de la Cámara Nacional de la Industria Tequilera, la cual es una organización de Tequileros. La norma además de regular la producción de tequila delimita la especie de *Agave* que es utilizada para la elaboración del mismo, siendo el *Agave tequilana* Weber var. azul la única especie de *Agave* permitida.

La denominación de origen se otorga a los productos para delimitar la zona donde puede ser elaborado, debido a que la zona geográfica (**Figura 2.1.**) delimitada reúne las características climáticas especiales para su elaboración. Por eso el Tequila cuenta con la denominación de origen para el estado de Jalisco y algunos municipios de los estados colindantes además de algunos municipios del estado de Tamaulipas.

**Figura 2.1.** Mapa de México donde se aprecia la zona de denominación de origen para la producción de tequila.



### 2.1.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA

El tequila es una de las 8 bebidas alcohólicas de mayor consumo a nivel mundial y su industria, una de las más importantes del estado de Jalisco. Actualmente una de las estrategias de las empresas líderes es la generación de nuevos productos con un valor agregado para nichos de mercado específicos, ofreciendo productos con triple destilación, productos con un grado alcohólico más bajo, tequilas con sabores añadidos.

El comportamiento del mercado de las bebidas alcohólicas en México en el año 2012 presento un volumen de consumo de 219 millones de litros, donde el tequila representa un 36% del consumo de bebidas alcohólicas en el país, ocupando el primer lugar dentro de las bebidas alcohólicas, teniendo el aguardiente en segundo lugar con un 19%, seguido del brandy con un 14% y el ron con un 11%, whisky con un 10% y el vodka con un 7%. Respecto al derrame económico esto representó 35 mil millones MXP, donde el tequila apporto un 36%.

La producción anual ha ido aumentando al pasar de los años registrando en 2013 una producción de 229.7 millones de litros de tequila a 40% Alc. Vol., con una exportación total de 170.8 millones de litros, de los cuales 83.2 millones de litros fueron exportados a granel mientras que 87.6 millones de litros fueron exportados envasados y 58.9 millones de litros para consumo interno en el país.

Dentro de los países a los que se exporta el tequila, destaca Estados Unidos, siendo el principal país a donde se exporta esta bebida con un 77.5% del total de la exportación, seguido de Alemania con un 3.4%, España con un 3.3% y Francia con un 2.1%. Después del año 2009 y hasta la fecha se observa una tendencia de producción total de tequila estable cada año, mientras que el consumo nacional tiende a tener una disminución mientras que la exportación aumenta (Reporte anual de la cámara nacional de la industria tequilera)

### 2.1.3. PROCESO DE ELABORACIÓN

El tequila se elabora a partir de *Agave tequilana* Weber var. azul, el cual fue cultivado dentro de la zona de denominación de origen de tequila. Una vez maduro al cabo de 6 a 10 años, se procede a su cosecha. El proceso de cosecha se denomina jima (**Figura 2.2.**) y consiste en cortar las hojas del *Agave* para quedarse solo con la cabeza o piña.

**Figura 2.2.** Proceso de jima de las plantas de *Agave*.



Las piñas son transportadas hasta las fábricas donde se cortan en mitades o cuartos para ser cocinadas, el proceso de cocción tiene el objetivo de ablandar las fibras y principalmente hidrolizar los azúcares presentes en el *Agave*, esta cocción puede ser realizada en hornos de mampostería o autoclaves (Figura 2.3.).

**Figura 2.3.** Autoclaves y hornos comúnmente utilizados en la industria tequilera para realizar el proceso de cocimiento del *Agave*.



Posteriormente se realiza una molienda en molinos mecánicos o bien con tahonas (Figura 2.4.) para la extracción del jugo rico en azúcares fermentables.

**Figura 2.4.** Fotografías de los molinos utilizados en la industria tequilera para la obtención del jugo de *Agave*.



El jugo obtenido es llevado a tinas de acero inoxidable (**Figura 2.5.**) que comúnmente es inoculado con *S. cerevisiae* para que sea fermentado.

**Figura 2.5.** Tinas de fermentación



Una vez terminada la fermentación se destila en alambiques de cobre (**Figura 2.6.**) o acero inoxidable donde se separan las colas y cabezas, quedándose con lo que es el cuerpo, de esta manera después de una doble destilación se obtiene el tequila blanco.

**Figura 2.6.** Alambiques donde realiza la destilación de los mostos para obtener el tequila.



Para la elaboración de tequila reposado o añejo, se coloca el tequila blanco en barricas de roble blanco (**Figura 2.7.**) para ser almacenado por lo menos 3 meses para generar el tequila reposado y por lo menos 1 año para generar el tequila añejo.

**Figura 2.7.** Cava donde se aprecian las barricas en las cuales se realiza el proceso de reposo o añejamiento del tequila.



Finalmente cada uno de los tequilas se diluye con agua destilada para ser ajustado el grado alcohólico y se embasa para su venta y distribución.

## 2.2. FERMENTACIÓN

Una fermentación se define como un proceso mediante el cual las sustancias orgánicas conocidas como sustrato, son transformadas por microorganismos y sufren una serie de cambios químicos que bien pueden ser reducciones y/o oxidaciones, para producir energía; al finalizar la fermentación, se encuentran en él medio una acumulación de varios productos, unos más oxidados (aceptaron electrones) y otros más reducidos (donaron electrones) que el sustrato, con un balance total de energía positivo. Esta energía es utilizada en el metabolismo de los microorganismos.

Desde el punto de vista bioquímico, no se considera como fermentación a los procesos en los que participa el oxígeno. Cuando el aceptor final de electrones es el oxígeno molecular y no una sustancia orgánica, el proceso se conoce como respiración. El aceptor bioquímico de fermentación es equivalente al de respiración celular anaerobia que utiliza.

En la fermentación alcohólica se produce etanol, dióxido de carbono y agua a partir de glucosa mediante la siguiente reacción.



Microbiológicamente hablando, una fermentación se define como un proceso en el que los microorganismos producen metabolitos y/o biomasa, a partir de la utilización de sustancias orgánicas, en ausencia o presencia de oxígeno. La descomposición de los sustratos es llevada a cabo por enzimas producidas por los microorganismos para tal finalidad. Por lo tanto no hay diferencia entre fermentación y respiración celular, puesto que en ambos procesos los microorganismos hidrolizan un sustrato orgánico, ya sea en presencia o ausencia de oxígeno.

En la fermentación aerobia el aceptor final de electrones es el oxígeno; es imprescindible su presencia para el desarrollo de microorganismo y la producción del compuesto deseado. En este tipo de procesos, se produce fundamentalmente biomasa, dióxido de carbono y agua.



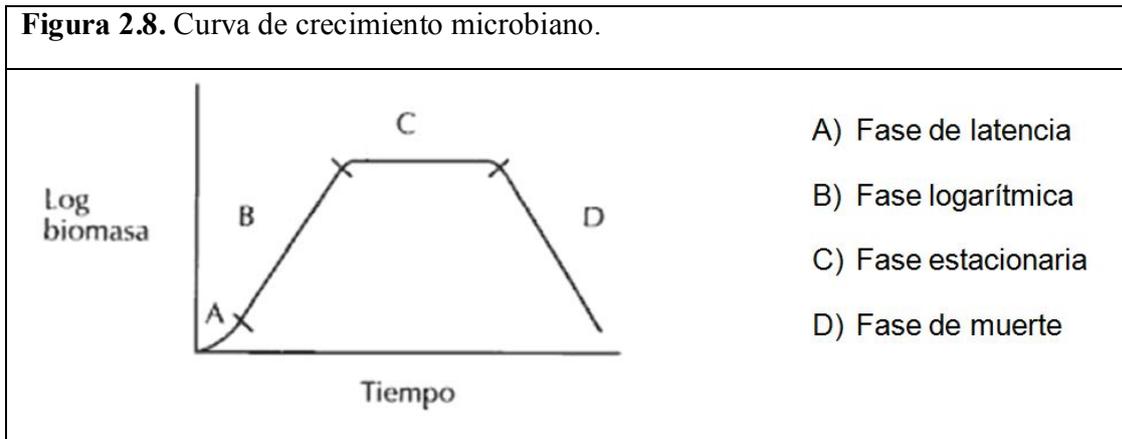
En la fermentación anaerobia, el proceso de producción del metabolito de interés se desarrolla en ausencia de oxígeno; los productos finales son principalmente sustancias orgánicas, por ejemplo, ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético, alcoholes como el etanol o butanol. Sin embargo en la mayoría de las fermentaciones anaeróbicas, se requiere un poco de oxígeno al inicio del proceso para favorecer el crecimiento y la reproducción de microorganismos.

### 2.2.1. FERMENTACIÓN POR LOTES

El cultivo en lote es un sistema cerrado porque, después de inocular el medio de cultivo o bien, iniciado el proceso de fermentación, solo se adiciona oxígeno, antiespumante y ácidos o bases para mantener el pH en caso que así se requiera. La fermentación se lleva a cabo a volumen constante en un periodo definido de tiempo, durante el cual varía la composición del medio de cultivo, pues al tiempo que se consume sustrato, se genera producto y biomasa. Finalmente se detiene el proceso y se obtiene el o los metabolitos deseados.

Para realizar exitosamente una fermentación en lote, es necesario conocer el comportamiento fisiológico del microorganismo, por tanto la curva de crecimiento (**Figura 2.8.**), que ayudará a manipular las condiciones y la manera en que se generará el producto deseado, por ejemplo, si se desean generar metabolitos primarios, se tiene que alargar la fase logarítmica; si en cambio se desean metabolitos secundarios, es la fase estacionaria la que se debe de extender. Por otro lado si se desea una alta producción de biomasa, se tiene que buscar las condiciones ambientales y nutrimentales en donde el microorganismo genere la mayor concentración de células.

**Figura 2.8.** Curva de crecimiento microbiano.



### 2.2.2. FERMENTACIÓN EN CONTINUO

El cultivo continuo se puede describir como un sistema abierto y a diferencia del cultivo por lotes, se adiciona constantemente medio de cultivo fresco a los microorganismos, a una determinada velocidad, y se extrae caldo de fermentación (medio de cultivo con microorganismos y metabolitos, también llamado mosto), a la misma velocidad. Así se logra mantener en el reactor una población estable de microorganismos en condiciones uniformes y un volumen de trabajo en el reactor constante. En muchas

fermentaciones, el compuesto de interés se produce durante la fase exponencial; al respecto, una de las ventajas del sistema continuo es que se puede mantener estable la población en esta fase por periodos prolongados.

Para que el cultivo continuo sea efectivo, es necesario que el proceso se encuentre en estado estacionario. El estado estacionario se define como una condición, en la que varios parámetros permanecen constantes a través del tiempo; entre ellos, el volumen del cultivo, la concentración celular y de metabolitos, y las condiciones fisicoquímicas necesarias para el desarrollo del proceso. Por lo tanto, el estado estacionario se puede mantener por largos periodos, siempre y cuando el sistema se mantenga libre de contaminación.

Durante el cultivo en continuo, una vez que se llega a la fase estacionaria, se logra un equilibrio metabólico de la célula estable, por lo que es ideal para realizar estudios de estabilidad metabólica. Durante esta fase se generan perturbaciones controladas y se pueden observar cambios en el metabolismo provocados por la perturbación hecha en el sistema de fermentación. Una vez realizada la perturbación a estudiar, se recomienda que pasen 5 tiempos de residencia (TR) para garantizar que todas las células que se encontraban presentes al momento de generar la perturbación ya fueron removidas del mismo y se logra nuevamente llegar al mismo estado fisiológico que se tenía en la fase estacionaria.

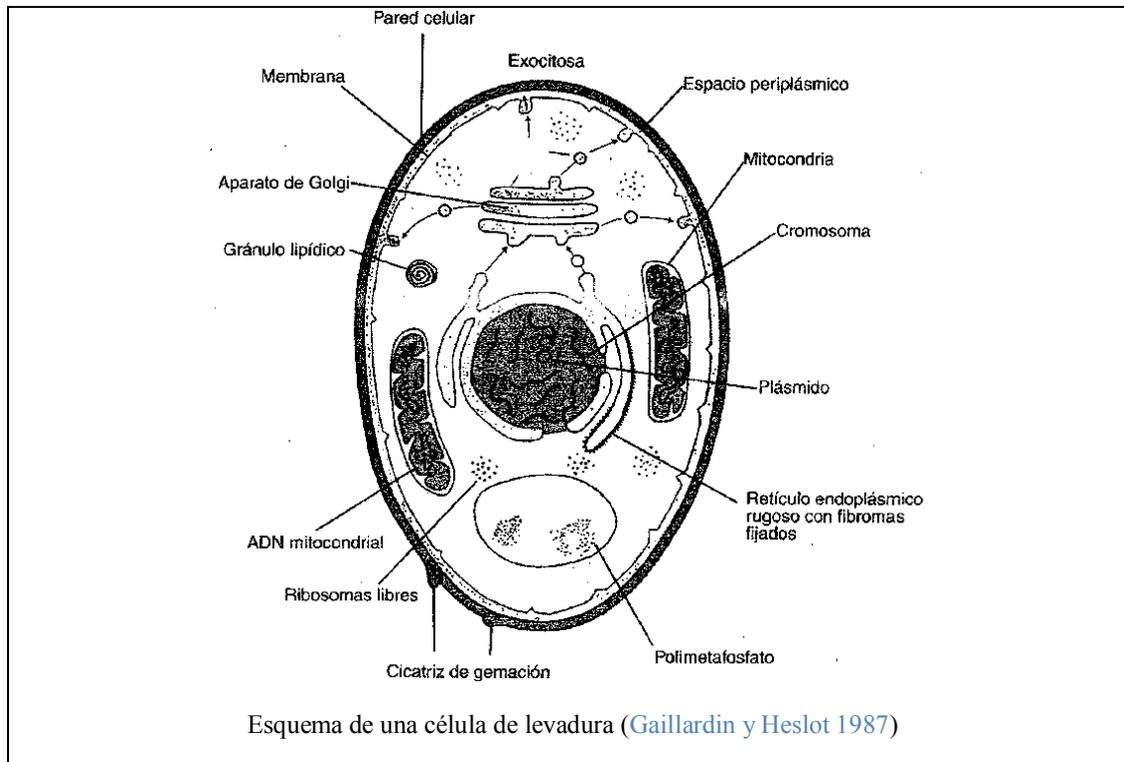
### 2.3. LEVADURAS

Levadura es un nombre genérico que agrupa a una variedad de hongos, incluyendo tanto especies patógenas para plantas y animales, como especies no solamente inocuas sino de gran utilidad. Estos microorganismos constituyen un grupo íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad.

Las levaduras (**Figura 2.9.**) son los microorganismos más importantes en los procesos de fermentación desde el punto de vista industrial, porque muchas de las especies pueden convertir los azúcares en alcohol etílico y dióxido de carbono. Participan en la producción de cerveza, vino, alcohol industrial, glicerol y vinagre. Las células de levaduras se utilizan también en la industria de la panificación y como alimento animal y humano, por su alto contenido de proteínas.

Son organismos unicelulares eucarióticos pertenecientes al reino fungi, también conocidos como hongo imperfectos.

Figura 2.9. Morfología de una levadura.



### 2.3.1. SACCHAROMYCES

La levadura *Saccharomyces* es la más ampliamente estudiada y utilizada industrialmente debido a su capacidad para producir etanol. Esta levadura ha sido encontrada en prácticamente todas las fermentaciones participando activamente en la producción de etanol. Es por eso que *Saccharomyces* está ligada directamente con las fermentaciones alcohólicas.

Algunas especies de levaduras del género *Saccharomyces* son capaces de llevar a cabo el proceso de fermentación, propiedad que se ha explotado desde hace muchos años en la producción de pan y de bebidas alcohólicas. Pero también desde el punto de vista científico, el estudio de las levaduras ha contribuido de manera muy importante a elucidar los procesos básicos de la fisiología celular utilizándolas como modelo biológico.

Dentro del género *Saccharomyces*, la especie *cerevisiae* constituye la levadura más estudiada. Este organismo se conoce también como la levadura de panadería, ya que es necesario agregarla a la masa que se utiliza para preparar el pan para que este esponje o levante; de hecho el término levadura proviene del latín *levare*, que significa levantar.

La levadura del genero *Saccharomyces* de la especie *cerevisiae* es la utilizada industrialmente durante el proceso de elaboración de tequila, la cual proviene de manera natural del mismo proceso o bien, algunas fábricas han optado por la utilización de levadura seca de panificación, aunque más recientemente y sabiendo la importancia que tiene la levadura durante el proceso de producción, con la preocupación por la generación de compuestos durante la fermentación, se han comenzado a utilizar levaduras comerciales provenientes de otros proceso de fermentación alcohólica, principalmente de vino.

Considerando que en una fermentación alcohólica el principal metabolito es el alcohol y, si éste se utiliza para medir la eficiencia de fermentación, la levadura *S. cerevisiae* es la que presenta los mejores rendimientos de conversión de azúcar en etanol. Pero en una fermentación para la producción de bebidas alcohólicas, el etanol es el producto metabólico mayoritario, pero respecto de la calidad sensorial de la bebida, no es el principal metabolito que se busca que esté presente en la bebida. Lo que convierte a *S. cerevisiae* en una levadura con un bajo perfil en la producción de compuestos volátiles aromáticos que contribuyan positivamente el sabor y aroma de la bebida.

### 2.3.2. NO-SACCHAROMYCES

Si bien la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es la principal levadura utilizada en las fermentaciones para la producción de bebidas alcohólicas por su capacidad para producir una alta concentración de etanol, durante la fermentación son las levaduras no-*Saccharomyces* las principales responsables de la producción de compuestos aromáticos como los ésteres. Estas levaduras están presentes en las primeras horas de fermentación debido a su supuesta baja tolerancia al etanol, por lo que al final de la fermentación solo sobreviven las levaduras *Saccharomyces*.

Actualmente existe un gran interés de estudio sobre las cepas de levaduras no-*Saccharomyces* debido a su capacidad de producción de compuestos volátiles responsables de los aromas y sabores en las bebidas alcohólicas fermentadas, por lo que se han comenzado a estudiar consorcios de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* en conjunto, para la producción de vino (Ciani y col., 2010).

En el tequila se han identificado levaduras de diferentes géneros de levaduras no-*Saccharomyces* tales como, *Brettanomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomycoides*, *Zygosaccharomyces*, *Torulasporea* e *Issatchenkia* (Lachance, 1995), los cuales también han sido identificados en otras bebidas alcohólicas como el vino. Se conoce que durante el proceso de elaboración de bebidas de *Agave* en la etapa de fermentación se encuentran consorcios estables de bacterias y levaduras en fermentaciones espontaneas, siendo la levadura *Kluyveromyces marxianus* la que ha sido, común denominador en proceso donde la materia prima es el *Agave* (Lappe-Oliveras y col., 2008).

### 2.3.3. CULTIVOS MIXTOS

En algunos procesos industriales es imprescindible que se encuentre solo un tipo de microorganismos, mientras que en otros es necesaria la presencia de un conglomerado de ellos para alcanzar los objetivos esperados. Por lo tanto, las características específicas de cada proceso industrial van a definir la conveniencia de utilizar un cultivo puro o mixto.

Un cultivo puro es aquella población de microorganismos de un mismo tipo que, generalmente, se producen a partir de una sola célula. Por otro lado, un cultivo mixto está compuesto por varios microorganismos, cuya presencia en conjunto cumple una determinada función. Las poblaciones de microorganismos, cuya presencia en conjunto cumple una determinada función. Las poblaciones de fermentaciones espontáneas son un ejemplo de cultivos mixtos, pues no se inocula una sola cepa del microorganismo de interés y pueden crecer diferentes género y especies de levaduras al mismo tiempo o bien levaduras y bacterias.

El perfil aromático de los vinos fermentados con cultivos seleccionados de *S. cerevisiae* puede tener una diferencia significativa comparado con vinos fermentados de manera espontánea con la microflora nativa (Molina y col., 2009). Por lo que las especies de levaduras presentes durante la fermentación tienen una influencia en el perfil aromático ya que estas son las que producen los compuestos como los ésteres, en cultivos mixtos de *S. cerevisiae* con *H. uvarum* y *H. guilliermondii* incrementa la cantidad de compuestos volátiles producidos al final (Moreira y col., 2005), también se ha visto que *Kluyveromyces marxianus* fermentadora de lactosa llega a producir 138 mg/L de acetato de etilo (Dragone y col., 2009). De manera general, en vinos, la diversidad de levaduras en la fermentación contribuye a la formación de olores y sabores (Garde-Cerdan y col., 2006).

### 2.4. INMOVILIZACIÓN DE LEVADURAS

La inmovilización de levaduras es ahora una alternativa para la producción de vino a nivel industrial, con el objetivo de tener una alta concentración de células durante la etapa de fermentación. Se ha visto que la inmovilización también ayuda en fermentaciones mixtas, ayudando a mantener una concentración alta de no-*Saccharomyces* en co-cultivo con *Saccharomyces*, lo cual permite elevar la concentración de compuestos volátiles en la bebida, debido a que son producidos principalmente por levaduras no-*Saccharomyces*. La inmovilización genera cambios fisiológicos y bioquímicos en la levadura en comparación con fermentaciones donde las levaduras están libres en el medio, en particular estos cambios incrementan el rendimiento de etanol (Ciesarova y col., 1998).

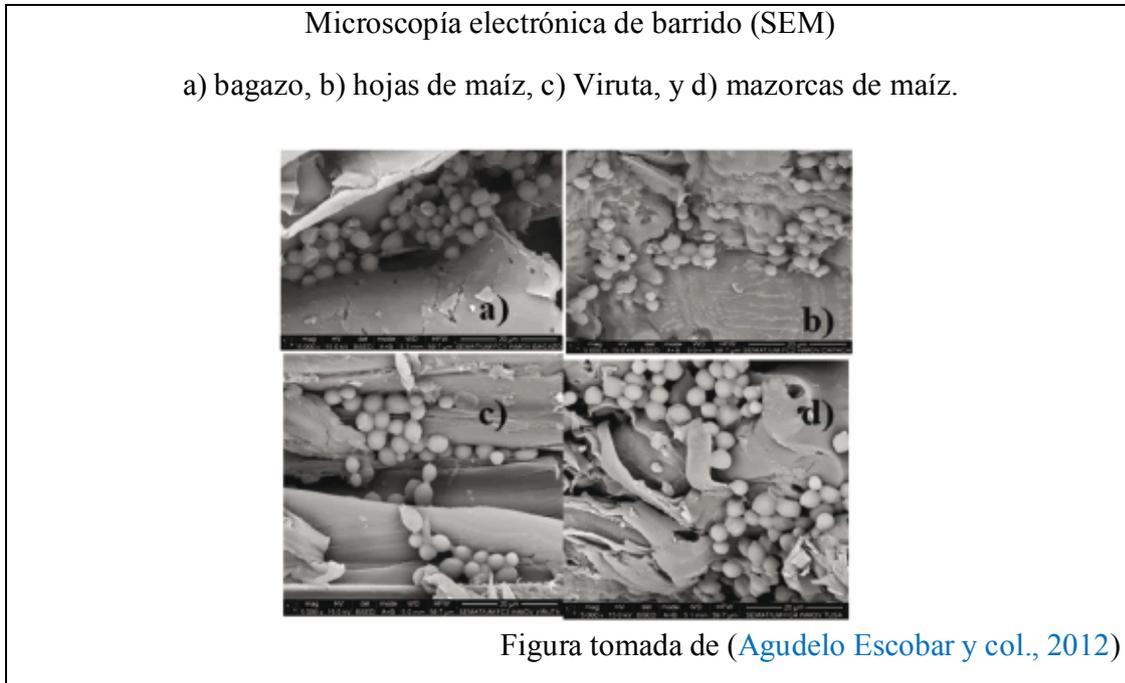
Además, la inmovilización favorece la producción de altas concentraciones de ésteres durante la etapa de fermentación (Kourkoutas y col., 2003) y permite el reciclado de células, permitiendo que sean utilizadas en diferentes fermentaciones en lote, lo cual se

traduce en un ahorro económico durante el proceso (Zhao y Xia, 2010). Por otro lado las desventajas de la inmovilización muestran que la transferencia de nutrientes al interior de las perlas limita la disponibilidad de los mismos para que sean asimilados por las levaduras que se encuentran atrapadas en la matriz que las inmoviliza (Verbelen y col., 2006), un ejemplo de esto es la dificultad que presenta la glucosa, ya que esta difunde lentamente a través de las perlas de alginato y no puede ser consumida por *S. cerevisiae* causando la muerte de las levaduras que se encuentran al interior de las perlas (Converti y col., 1996). Sin embargo el diámetro de las perlas juega un papel muy importante en la transferencia de nutrientes cuando se utilizan levaduras inmovilizadas. Se ha visto que un diámetro de 4 mm es recomendado para la fermentación de medios de cultivo con una concentración de glucosa de 100 g/L (Abraham y Surender 1993) mientras que un diámetro de 1.5 mm es el más recomendado para su utilización en medios de fermentación que presentan una concentración de glucosa de 200 g/L (Shiotani y Yamane 1981), esto debido a que la viscosidad del medio depende directamente de la concentración de azúcares presentes en el mismo, cambiando las propiedades reológicas.

Otra alternativa es la absorción de células en soportes lignocelulosicos (**Figura 2.10.**), la cual no presenta la desventaja de la transferencia de nutrientes al interior del soporte, debido a que las células se localizan solo en el exterior del soporte, permitiendo que las células crezcan sobre la superficie del soporte al mismo tiempo que las células están en contacto con el medio de fermentación. En resumen la inmovilización muestra grandes ventajas tanto técnicas como económicas comparada con los sistemas de fermentación con células libres (Dragone y col., 2005).

La inmovilización en gelatina de levaduras *S. cerevisiae* ayuda a que puedan fermentar en presencia de una concentración de furfural de hasta 2 g/L en el medio de fermentación lo que con levaduras libres inhibe el crecimiento, sin embargo cuando están inmovilizadas el rendimiento es de 48 g·L<sup>-1</sup> de glucosa, en medio formulado con 100 g·L<sup>-1</sup> de glucosa y 3 g·L<sup>-1</sup> de extracto de levadura a pH 4 con HCl (Boyer y col., 1992).

**Figura 2.10.** Microfotografía de las levaduras inmovilizadas en diferentes soportes.



## 2.5. PRODUCCIÓN DE ÉSTERES

Los ésteres en el tequila dan sabores y olores frutales los cuales son deseados por algunos consumidores, estos están presentes en cantidades traza en bebidas fermentadas y presentan umbrales de detección bajos, por lo que una mínima variación en la concentración de estos puede ser detectada por el consumidor, representando un grupo de compuestos importantes para el perfil aromático de la bebida.

Los compuestos producidos por las levaduras que dan el sabor y olor al tequila se pueden dividir en 5 grupos: compuestos con azufre, ácidos orgánicos, alcoholes superiores, compuestos carbonados y ésteres volátiles, siendo estos últimos los que representan el más grande e importante grupo puesto que dan el carácter frutal altamente deseado en las bebidas alcohólicas como el vino (Verstrepen y col., 2003). El sabor del vino que detecta cada individuo varía debido a que este es la respuesta final de un conjunto de una compleja interacción quimiosensorial que es difícil de predecir por que intervienen muchas variables (Fleet, 2003).

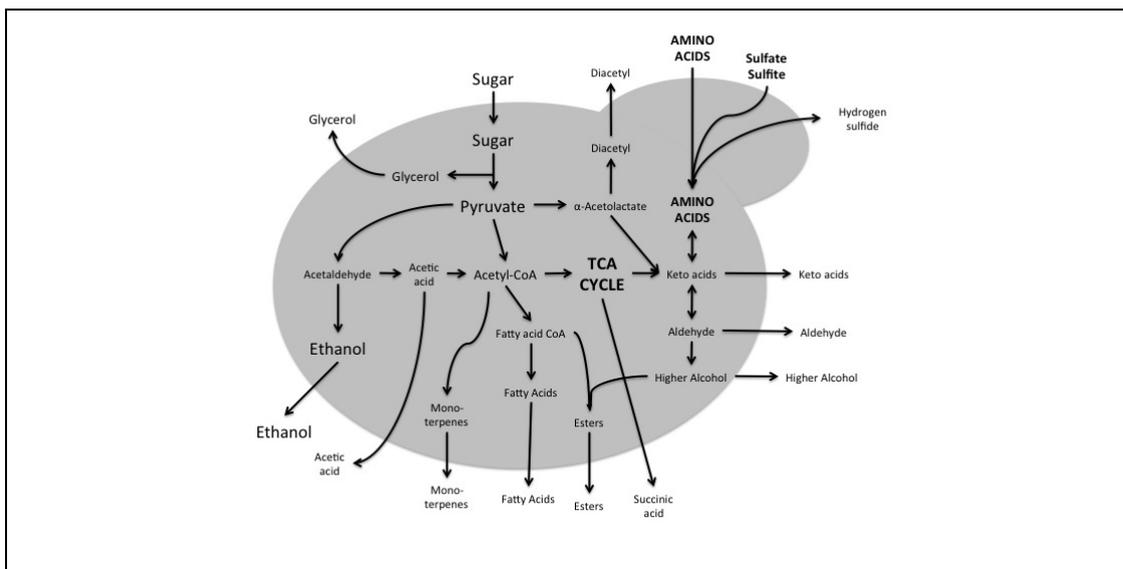
### 2.5.1. SÍNTESIS POR VÍA METABÓLICA

Es de gran importancia conocer las rutas bioquímicas de degradación de los compuestos orgánicos, no solo para determinar cuáles pueden ser los productos que se obtendrán en una fermentación, sino por la posibilidad de manipular el proceso para producir otro tipo de sustancias. Existen varias rutas o secuencias bioquímicas de utilización y conversión de los azúcares; las rutas de mayor relevancia desde el punto de vista industrial son, la glucolisis, el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria.

La glucolisis (vía de Embden-Meyerhof-Parnas, EMP) representa la ruta principal del metabolismo de la molécula de glucosa.

Los ésteres se dividen en dos grandes grupos, los ésteres de acetato y los ésteres de ácidos grasos. La formación de esteres de acetato, es dependiente de la concentración de Acetil-CoA y alcoholes presentes en el medio, siendo el etanol el principal alcohol en el medio de fermentación, pero no es el único alcohol en el medio, pudiendo combinarse con los demás alcoholes superiores, por lo que el acetato de etilo es el éster que se produce en mayor concentración. Por otro lado los esteres de ácidos grasos son producidos por la condensación de los ácidos grasos con un alcohol, siendo el etanol el principal alcohol en el medio, produciendo etil esteres de ácidos grasos. Las vías de síntesis de los ésteres volátiles en las levaduras, son el producto de condensación de la reacción entre un acetil-CoA y un alcohol, la cual es catalizada por las enzimas Atf1 y Atf2 para esteres de acetato y Eht1 (Etanol hexanoil transferasa) y Eeb1 para etil esteres (Athenstaedt y col., 1999; Mason y Dufour 2000).

**Figura 2.11.** Esquema de las rutas metabólicas involucradas en el metabolismo de la producción de compuestos volátiles.



## 2.5.2. ENZIMAS Y GENES INVOLUCRADOS EN LA PRODUCCIÓN DE ÉSTERES

Los niveles de expresión de los genes ATF1 y ATF2 afectan fuertemente la producción de acetato de etilo y acetato isoamílico, además las enzimas Atf1 y Atf2 están relacionadas con las vías de síntesis de un amplio rango de ésteres volátiles, tales como, el acetato de propilo, acetato de isobutilo, acetato de pentilo, hexilo, heptilo, octilo y fenil etil acetato. La enzima Atf2 juega un rol menor en comparación con Atf1, además la sobreexpresión de los alelos de los genes ATF1 y ATF2 conduce a diferentes velocidades de producción de ésteres, indicando que los diferentes perfiles aromáticos de diferentes especies pueden deberse a mutaciones en los genes ATF (Verstrepen y col., 2003). Estos estudios han sido reportados en cepas de *Saccharomyces* pero estudios en cepas de levaduras no-*Saccharomyces* como *Debaryomyces hansenii* y *Kluyveromyces lactis*, demuestran la existencia de genes homólogos a ATF1 y ATF2 de *S. cerevisiae* (Dujon y col., 2004) y también en *Pichia stipitis* se han encontrado estos genes homólogos (Jeffries y col., 2007).

### 2.5.2.1. MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES

Dentro del estudio de la expresión génica por qPCR es indispensable tener una línea basal de la expresión de los genes, comúnmente esto se logra utilizando genes de referencia (GR). Uno de los GR más utilizados en levaduras es el gen constitutivo de la actina (ACT1) (Niewerth y col., 2003, Babiskin y Smolke 2011, Tringe y col., 2006, Molina y col., 2007).

La normalización es una herramienta esencial de un sistema fiable, por lo que consiste en tener genes de referencia con expresión estable y buena correlación con las cantidades totales de ARNm presentes en las muestras. La normalización contra un GR único es inaceptable a menos de que se evidencie que presentan una clara expresión invariable bajo las condiciones experimentales descritas (Bustin y col., 2009).

Uno de los genes más utilizados como GR es el gen ACT1, sin embargo, Teste y col., (2009) sugieren la invalidación de ACT1 como GR para el análisis cuantitativo por expresión de qPCR en *S. cerevisiae* y proponen los genes asparagina-glicosilación 9 (ALG9), ARN polimerasa II (TAF10), subunidad 1 de factor de transcripción C (TFC1) y enzima conjugada de ubiquitina E26 (UBC6) por su condición estable durante el crecimiento en glucosa por largos periodos.

Otro estudio realizado en el 2011 sobre la identificación de genes adecuados para la normalización de datos de expresión de RT-qPCR en *S. cerevisiae* durante la fermentación alcohólica, selecciona diversos GR los cuales fueron evaluados por tres diferentes métodos estadísticos comparándolos con el gen ACT1, encontrando que existe el riesgo de interpretaciones erróneas sobre la base de la normalización de los datos con un GR no válido. Por lo que proponen la evaluación de la estabilidad de expresión de GR bajo ciertas

condiciones experimentales como un requisito previo crucial para obtener información fiable acerca de la expresión génica. Los genes gliceraldehído 3 fosfato-deshidrogenasa 2 (TDH2), fosfoglicerato quinasa 1 (PGK1), TFC1, gen ribosomal (18S) y en especial el gen de la subunidad 9 de complejo II (QCR9) son los que se mantiene más estables durante el crecimiento a diferentes condiciones metabólicas (Vaudano y col., 2011).

Recientemente se publicó un trabajo en el que proponen una estrategia para la selección y validación de GR en levaduras; determinando un conjunto de GR candidatos para la RT-qPCR sobre el análisis de los cambios dinámicos de la transcripción de *S. cerevisiae*, 10 de los 12 candidatos no eran reportados como GR potenciales. Encontrando que los GR más estables del pool utilizado fueron: trisofosfato isomerasa (TPI1), fructosa-bifosfato aldolasa (FBA1), piruvato quinasa 1 (CDC19) y ACT1 en respuesta a una perturbación en la cantidad de glucosa disponible; y FBA1, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 3 (TDH3), proteína celular covalentemente ligada a la pared 12 (CCW12) y ACT1 en respuesta a la cantidad de amoníaco disponible. Por lo tanto se refuerza la utilización del gen ACT1 como un GR válido (Cankorur-Centikaya y col., 2012).

#### 2.5.2.2. RT-qPCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una forma sencilla de replicar rápidamente fragmentos específicos de ADN hasta llegar a alcanzar concentraciones que puedan ser vistas por el ojo humano mediante una gran cantidad de técnicas desarrolladas para su detección. De esta manera se busca en el genoma de microorganismos de interés fragmentos específicos que se deseen amplificar. (Fairchild y col., 2006).

La PCR en tiempo real o PCR cuantitativa es una variación de la técnica PCR estándar que se emplea para la cuantificación tanto de DNA como de mRNA en una muestra (medida de la expresión génica). Utilizando primers específicos puede medirse el número de copias relativo de mRNA que contienen una muestra (RT-PCR para la medida de la expresión génica). Por lo que, la técnica de PCR en tiempo real es aplicada a la medición de la expresión de genes particulares.

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real es más rápida, sensible y precisa para la medición de la expresión génica a diferencia del northern blot, del análisis en serie de la expresión génica (SAGE, por sus siglas en ingles) y de los micro-arreglos.

La simplicidad, especificidad y sensibilidad junto con su alto potencial en rendimiento y la continua introducción de nuevos productos químicos, así como instrumentos más fiables y protocolos mejorados, hizo de la RT-qPCR (transcripción reversa con PCR en tiempo real cuantitativa) la tecnología de referencia para la detección y/o comparación de los niveles de ARNm (Bustin y col., 2005).

### 2.5.2.3. GENES DE REFERENCIA

Además de la normalización por medio de GR, el uso de curvas de dilución para probar las eficiencias de amplificación de ensayos individuales es el método más fácil, transparente e informativo para determinar la eficiencia de la amplificación así como la relativa abundancia de la expresión génica. Además de las curvas de dilución que también proporcionan convenientes controles positivos, y pueden actuar como controles de inhibición por lo que ayudan a definir el rango dinámico y los límites de detección de todos al mismo tiempo. Idealmente la curva de dilución debe procesarse con cada muestra, ya que todos estos parámetros podrían (y probablemente lo hacen) variar entre muestras (Bustin, 2010).

La eficiencia (E) correspondiente de la qPCR en un ciclo en la fase exponencial y es calculada para cada par de iniciadores de acuerdo a la ecuación:

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

Además de optimizar la eficiencia de los iniciadores, es necesario comprobar la especificidad de los iniciadores a utilizar para tener la seguridad de que únicamente se está amplificando el fragmento deseado, la manera de hacerlo mediante la técnica de qPCR es a través de los fragmentos mostrados en la curva melting.

Para la cuantificación relativa ha sido presentado un modelo matemático de un gen de interés en comparación a un GR. La proporción de la expresión relativa o veces de cambio (R) de un gen de interés es calculado basándose en la eficiencia y la desviación del Cq de una muestra no conocida contra un control, y expresado en comparación a un GR

La cuantificación relativa de un gen de interés en comparación a un GR es calculada de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Razón (R)} = \frac{(E_{\text{gen de interés}})^{\Delta Cq_{\text{gen interés (control-muestra)}}}}{(E_{\text{gen de referencia}})^{\Delta Cq_{\text{gen de referencia (control-muestra)}}}}$$

Los valores obtenidos de esta ecuación deben ser sometidos a una normalización de acuerdo al número de células y cantidad de ARN y ADNc en cada muestra.

### 2.5.3. SÍNTESIS POR VÍA QUÍMICA

Los ésteres se obtienen mediante la reacción de alcoholes o fenóles con ácidos o con derivados de éstos, especialmente cloruros de ácido o anhídridos. Cuando la formación de ésteres se lleva a cabo utilizando ácidos carboxílicos o sus derivados, debería de

especificarse que se trata de ésteres carboxílicos o carboxilatos, ya que hay otros tipos de ésteres como sulfatos, fosfatos, sulfonatos, etc. Sin embargo, ya que éste es el tipo de éster más común y el más importante, queda sobreentendido que cuando se dice simplemente "éster" se trata de un éster carboxílico.

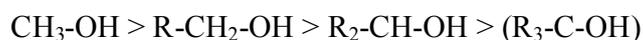
Un ácido carboxílico se puede transformar directamente al éster correspondiente cuando se calienta con un alcohol en presencia de un ácido mineral como catalizador. Este método de síntesis se conoce como reacción de Fischer o esterificación de Fisher. Esta reacción es reversible y, cuando se usan cantidades equivalentes de los reactivos, generalmente alcanza el equilibrio cuando hay una cantidad apreciable tanto de reactivos (alcohol y ácido carboxílico) como de productos (éster y agua). Sin embargo, tiene la ventaja de ser una síntesis de un solo paso y, de acuerdo al principio de Le Châtelier, el equilibrio de la reacción se puede desplazar hacia la formación del producto deseado agregando un exceso de alguno de los reactivos, o eliminando del medio de reacción uno de los productos, ya sea el éster, o más comúnmente el agua. Para esto, puede aprovecharse el hecho de que los alcoholes más pesados que el metanol forman azeótropos binarios con agua o azeótropos ternarios con agua y el éster.

El mecanismo aceptado para la reacción de Fischer es una sustitución nucleofílica de acilos que presenta los siguientes pasos:

- a) La protonación de un oxígeno carboxílico por un catalizador ácido, para hacer más electrófilo al carbono carboxílico.
- b) El ataque nucleofílico al carbono carboxílico por el oxígeno proveniente del alcohol.
- c) La transferencia de protones entre los átomos de oxígeno.
- d) La salida de una molécula de agua.
- e) La desprotonación de un oxígeno para dar el éster y regenerar al catalizador.

En las esterificaciones el orden de reactividad es el siguiente:

- Respecto al alcohol:



- Respecto al ácido:



En general, los alcoholes terciarios no pueden ser esterificados por este método debido a que, en condiciones ácidas, la deshidratación del alcohol terciario conocida como eliminación para formar alquenos es más favorable que la esterificación la cual ocurre mediante sustitución nucleofílica de acilos.

Entre la gran variedad de productos naturales que tienen grupos éster, son particularmente importantes las grasas y aceites, los cuales son tri ésteres del glicerol y de

ácidos grasos (ácidos de cadena larga, predominantemente de 12 a 18 carbonos, y número de carbonos par). En las grasas predominan las cadenas saturadas, mientras que en los aceites las cadenas son predominantemente insaturadas con uno, dos o hasta tres dobles enlaces. Las ceras son ésteres de ácidos carboxílicos de cadena larga y de alcoholes primarios también de cadena larga como el estearato de cetilo (ácido de 18 carbonos y alcohol de 16 carbonos) y el palmitato de triacontilo (ácido de 16 carbonos y alcohol de 30 carbonos). Los ésteres de bajo peso molecular tienen olores muy agradables y de hecho son los principales componentes del sabor y olor de las frutas y de muchos otros alimentos.

Muchos ésteres sencillos, derivados de las diferentes combinaciones de alcoholes y ácidos (lineales o ramificados, generalmente con 5 carbonos o menos) tienen un uso muy importante en la industria alimentaria y en perfumería como aromatizantes y saborizantes artificiales, ya sea solos, o en mezclas con otros compuestos naturales o sintéticos. Esta aplicación se debe al olor agradable de muchos ésteres, frecuentemente de tipo frutal, aunada a su relativamente baja toxicidad.

## 2.6. FACTORES INVOLUCRADOS EN LA PRODUCCIÓN DE ESTERES

Son muchos los factores tanto físicos, químicos, ambientales y bioquímicos los que afectan el metabolismo de las levaduras que son las principales responsables de la producción de estos compuestos durante la etapa de fermentación de bebidas alcohólicas.

### 2.6.1. INMOVILIZACIÓN

La inmovilización genera cambios fisiológicos y bioquímicos en la levadura en comparación con fermentaciones donde las levaduras están libres en el medio, en particular estos cambios incrementan el rendimiento de etanol (Ciesarova y col., 1998). Además, favorece la producción de altas concentraciones de ésteres durante la etapa de fermentación (Kourkoutas y col., 2003). Independientemente del soporte que se utilice para la inmovilización de las levaduras el incremento en la producción de esteroides como acetato de etilo se ve favorecida tanto en cerveza como en vino (Kourkoutas y col., 2004). La utilización de *Candida stellata* inmovilizada en la fermentación para la producción de vino con una consecutiva fermentación con *S. cerevisiae* libre para terminar la fermentación, favorece el consumo de azúcar, acetaldehído y metabolismo de acetoina lo que incrementa la calidad del vino y permite producir vinos especiales con características específicas (Ciani y Ferraro 1998).

## 2.6.2. AIREACIÓN

La producción de ésteres por las levaduras está afectado por diversos factores, Yamada (1927) estudio *Willia anomala* (*Pichia anomala*) aislada de la superficie de la tina de fermentación de Sake observando que la aerobiosis es una de las condiciones de fermentación que más afectan a la producción de ésteres. Este mismo fenómeno lo observó Peel (1951) con *Hansenula anomala* (*Pichia anomala*) ya que en condiciones anaeróbicas no logro producir estos compuestos. La habilidad de algunas levaduras de producir trazas de ésteres es una propiedad de muchas levaduras como *H. anomala* que logra producir 25 mmol de acetato de etilo por cada 100 mmol de glucosa consumida en condiciones aeróbicas, por lo que la formación del acetato de etilo es un proceso aeróbico (Davies y col., 1951), otros estudios demuestran que la producción de acetato de etilo por *Candida pseudotropicalis* fue favorecido en condiciones aeróbicas mientras que en condiciones anaeróbicas solo se produjo etanol, además en un medio deficiente de metales también se favorece la producción de ésteres (Willetts y col., 1989).

## 2.6.3. TEMPERATURA

La temperatura es otro factor que afecta la producción de esterres observando que en fermentaciones con *S. cerevisiae* realizadas a 15°C se producen mayor cantidad de aromas frutales comparado con fermentaciones realizadas a 28°C en vinos (Molina y col., 2007). La fermentación a bajas temperaturas favorece la producción de ésteres y modifica la composición de lípidos celulares en levaduras, en vinos puede atribuirse este fenómeno a la retención de terpenos, a la reducción en alcoholes superiores y de un incremento en la producción de ésteres de etilo y acetato con el total de compuestos volátiles, además de que el medio de cultivo proporciona precursores para la formación de estos (Beltran y col., 2008).

## 2.6.4. FUENTE DE CARBONO

Se ha observado que también la fuente de carbono afecta la producción de ésteres, Yoshioka y Hashimoto (1984) observaron que la fermentación con glucosa aumenta la producción de acetato de isoamilo y acetato de etilo con gran actividad de la enzima alcohol aciltransferasa comparado con fermentaciones donde la fuente de carbono era maltosa y fructosa. En fermentaciones con fructosa la formación de ésteres así como la actividad de la enzima disminuye. La principal fuente de carbono en el jugo de *Agave* para la producción de tequila es la fructosa por lo que este puede ser un punto fundamental en este trabajo.

### 2.6.5. NITRÓGENO

En la fermentación de jugo de *Agave* para la producción de tequila la concentración de nitrógeno es un elemento limitante para el crecimiento y capacidad fermentativa, por lo que se tiene que enriquecer el jugo de *Agave* con una fuente de nitrógeno externa. Dependiendo de la naturaleza del nitrógeno que se adiciona al jugo para la formulación del mosto se tiene un efecto en la producción de compuestos volátiles. La adición de sulfato de amonio al jugo de *Agave* durante la formulación del mosto aumenta la concentración en la producción de propanol y disminuye la concentración de alcoholes amílicos (Arrizon y Gschaedler 2007). En fermentaciones de jugo de uva con altas concentraciones de nitrógeno se producen bajas concentraciones de ácidos volátiles, la mejor concentración de nitrógeno en el medio es de 190 mg/L. Durante la fermentación de jugo de uva el mejor momento para adicionar el nitrógeno es al inicio de la misma (Bely y col., 2003).

La concentración de nitrógeno en el medio afecta la concentración de esteres producidos, en fermentaciones de jugo de uva para la producción de vino con cepas de levaduras *S. cerevisiae* a una concentración de 148 mg/L ese llegan a producir de 1.5 a 3.0 mg/L en comparación con fermentaciones a una concentración de 211 mg/L, la producción de esteres se incrementa de 2.5 a 4 mg/L (Carrau y col., 2010).

La concentración de nitrógeno así como la naturaleza de este y el tiempo en el cual se adicionan al medio tienen un efecto en el metabolismo de la levadura durante la fermentación de jugo de uva, y por consiguiente en la producción de compuestos volátiles durante la fermentación lo que cambia el perfil aromático del producto final (Bell y Henschke 2005; Jiménez-Martí y col., 2007). La concentración de nitrógeno que se necesita para la fermentación depende de la concentración de azúcar teniendo una relación ideal de 0.62 a 0.91 mg N·g<sup>-1</sup> de azúcar, lo que aumenta la capacidad de las levaduras para producir aromas frutales en el vino (Taillandier y col., 2007).

En la producción del vino el enriquecimiento de los mostos con una fuente de nitrógeno inorgánica (sulfato de amonio) en combinación con una fuente de nitrógeno orgánica (aminoácidos) incrementa tanto la producción de esteres de acetato como la de esteres de ácidos grasos de cadena mediana, y disminuye la producción de alcoholes superiores. Mientras que al formular los mostos con solo sulfato de amonio solo incrementa la producción de acetato de etilo y ácido acético. La concentración de aromas deseados en el producto final puede ser controlada antes de la fermentación al colocar la fuente de nitrógeno deseada así como la concentración adecuada del mismo (Torrea y col., 2011).

La adición de amonio como fuente de nitrógeno para el enriquecimiento de los mostos de fermentación afecta la producción de compuestos volátiles y no-volátiles, debido a que pueden llegar a formarse aromas no deseados, bajas concentraciones de nitrógeno en el medio favorecen la producción de ésteres de ácidos grasos de cadena ramificada y altas concentraciones de nitrógeno favorecen la producción de ésteres de ácidos grasos de cadena mediana (Vilanova y col., 2007).

### 2.6.6. MINERALES

Las enzimas piruvato descarboxilasa y etanol deshidrogenasa de *Zymomonas mobilis* se ven afectadas en presencia de metales como mercurio, cobre y zinc ya que inhiben la reducción de acetaldehído, los cloruros de bario, magnesio y molibdeno a una concentración de 5 mM no tienen efecto en la actividad enzimática de las enzimas piruvato descarboxilasa y etanol deshidrogenasa. El cloruro de calcio a una concentración de 0.2 mM no presenta un efecto sobre la etanol deshidrogenasa pero potencializa el efecto de la piruvato descarboxilasa 400%. Sin embargo el cobalto, manganeso y níquel activan la etanol deshidrogenasa y no presentan efecto sobre la piruvato descarboxilasa (Hoppner y Doelle 1983).

La concentración de 0.75 mM de calcio en medio formulado tiene un efecto positivo sobre *S. bayanus* debido a que le ayuda a tolerar altas concentraciones de etanol en el medio, por lo que puede llegar a producir una concentración mayor de etanol al incrementar la viabilidad de las levaduras (Nabais y col., 1988). El aumento en la concentración de calcio en melazas para fermentación afecta la capacidad de crecimiento y fermentación de *S. cerevisiae*, por lo que altas concentraciones de calcio en el medio afectan la producción de etanol y por tanto el rendimiento (Chotineeranat y col., 2010).

La relación entre la concentración de calcio, sodio y magnesio, determina el rendimiento en la producción de etanol, por lo que 1.51 mg·L<sup>-1</sup> de Ca, 930 mg·L<sup>-1</sup> de sodio y 128 mg·L<sup>-1</sup> de magnesio, son las concentraciones en medio sintético donde *S. cerevisiae* presenta el mejor rendimiento de fermentación (Soyuduru y col., 2009).

### 2.6.7. OTROS FACTORES

Una alta cantidad de ácidos grasos insaturados en el medio baja la producción de etil ésteres pero en fermentaciones a altas temperaturas las levaduras producen octanoato y decanoato de etilo. Los ésteres aromáticos son formados intracelularmente por las levaduras, los etil esterres se difunden fácilmente al medio de fermentación, pero para los ésteres de ácidos grasos la difusión se obstaculiza por el tamaño de las cadenas de ácidos grasos (Saerens y col., 2008).

El contenido de ésteres en bebidas alcohólicas destiladas también depende de si la levadura está presente en el momento de la destilación ya que si la destilación de los mostos se realiza con todo y las levaduras, la concentración de etil ésteres como decanoico, dodecanoico y hexadecanoico incrementan (Demyttenaere y col., 2003).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

En la industria tequilera existe un interés de algunas empresas en obtener productos para nichos de consumidores muy específicos con un valor agregado más alto. Una vía para lograrlo es incrementar la cantidad de esteres para obtener un producto más aromático, estos son producidos principalmente por las levaduras no-*Saccharomyces* en la fase de fermentación.

#### **4. HIPÓTESIS**

El aumento de la producción de compuestos volátiles, en particular ésteres, en las fermentaciones de tequila está relacionado con la presencia de levaduras no-*Saccharomyces* en conjunto con los factores nutricionales y ambientales de la fermentación.

## 5. OBJETIVOS

### a. GENERAL

Seleccionar y caracterizar levaduras no-*Saccharomyces* silvestres provenientes de procesos artesanales con capacidad de producción de compuestos volátiles (ésteres) en una mayor concentración para la fermentación del tequila.

### b. ESPECÍFICOS

Seleccionar al menos 2 cepas de levaduras no-*Saccharomyces* para la industria tequilera en base a sus capacidades fermentativas y producción de ésteres.

Estudiar la influencia de factores nutricionales y ambientales sobre la producción de ésteres por las levaduras no-*Saccharomyces* seleccionadas en bioreactor en condiciones controladas, a nivel laboratorio.

Estudiar el comportamiento de las levaduras no-*Saccharomyces* seleccionadas (inmovilizadas o no) en cultivos mixtos con *Saccharomyces cerevisiae* y su efecto en la producción de compuestos volátiles.

Realizar un modelo matemático del comportamiento de los cultivos mixtos.

Realizar fermentaciones a nivel piloto para obtener producto terminado.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 7.1. CEPAS DE LEVADURAS

### 6.9. MEDIOS DE CULTIVO

#### 6.9.1. MEDIOS SÓLIDOS

#### 6.9.2. MEDIOS LÍQUIDOS

### 6.10. CONTEO

#### 6.10.1. DIRECTO AL MICROSCOPIO

#### 6.10.2. CONTEO EN CAJA

##### 6.10.2.1. MEDIO YPD

##### 6.10.2.2. MEDIO WL

### 6.11. INMOVILIZACIÓN DE LEVADURAS

### 6.12. TÉCNICAS ANALÍTICAS

#### 6.12.1. AZUCARES (DNS)

#### 6.12.2. NITRÓGENO AMONIAICAL

#### 6.12.3. NITRÓGENO ASIMILABLE

#### 6.12.4. CROMATOGRAFÍA DE GASES HS-GC

#### 6.12.5. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

### 6.13. CONDICIONES DE FERMENTACIÓN

#### 6.13.1. NIVEL MATRAZ

#### 6.13.2. REACTOR EN LOTES

#### 6.13.3. REACTOR CONTINUO

#### 6.13.4. ESCALA PILOTO

### 6.14. MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES ATF1, ATF2, EHT1, ACT1, QCR9Y TFC1

#### 6.14.1. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTALES

#### 6.14.2. EXTRACCIÓN DE mRNA

#### 6.14.3. SÍNTESIS DE cDNA

#### 6.14.4. MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES POR RT-qPCR

### 6.15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

## 6.1. CEPAS DE LEVADURAS

Se utilizaron 12 cepas de levaduras de la colección de cepas de Ciatej, las cuales se describen en la **tabla 6.1**.

**Tabla 6.1.** Descripción de las cepas

<b>Cepa</b>	<b>Identificación</b>	<b>Lugar de procedencia</b>	<b>Proceso</b>
AR5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Jalisco	Tequila
OFF1	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Guerrero	Mezcal
SLP1	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	San Luis Potosí	Mezcal
DU3	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Oaxaca	Mezcal
GRO6	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Guerrero	Mezcal
DI	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Oaxaca	Mezcal
DII	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Oaxaca	Mezcal
ML2	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	Oaxaca	Mezcal
CF	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Oaxaca	Mezcal
ML3	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Oaxaca	Mezcal
MN	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Oaxaca	Mezcal
GRO3	<i>Pichia kluyveri</i>	Guerrero	Mezcal

## 6.2. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo son utilizados para el crecimiento de los microorganismos en un ambiente simulado en el laboratorio y de esta manera poder estudiarlos.

### 6.2.1. MEDIOS SÓLIDOS

Los medios de cultivo sólidos son utilizados para proporcionar a los microorganismo un soporte donde puedan crecer con todos los nutrimento necesarios para su desarrollo. Uno de los medios de cultivo más utilizados para el crecimiento de levaduras es el medio YPD, que proporciona a las levaduras fuente de carbono en forma de glucosa, nitrógeno y demás nutrimentos necesarios para su crecimiento.

- Medio YPD Agar
  - 10 g/L de extracto de levaduras
  - 20 g/L de bactopectona
  - 20 g/L de glucosa
  - 20 g/L de Agar
  - pH  $4.5 \pm 0.2$  con HCl
- Medio WL Agar (Fluka)
  - 20 g/L de Agar
  - 5 g/L de hidrolizado enzimático de caseína
  - 4 g/L de extracto de levadura
  - 50 g/L de dextrosa
  - 0.55 g/L de fosfato monopotásico
  - 0.425 g/L de cloruro de potasio
  - 0.125 g/L de cloruro de calcio
  - 0.125 g/L de sulfato de magnesio
  - 0.0025 g/L de cloruro férrico
  - 0.0025 g/L de sulfato de manganeso
  - 0.022 g/L de verde de bromocresol

#### 6.2.2. MEDIOS LÍQUIDOS

Los medios de cultivo líquidos proveen a las levaduras los nutrientes necesarios para su desarrollo. En este trabajo se utilizó el medio YPD líquido para la reactivación de las cepas así como para preparación de los inoculos. Los medios de fermentación que se utilizaron fueron el medio M11 y el medio JA.

- Medio YPD
  - 10 g/L de extracto de levadura
  - 20 g/L de bactopectona
  - 20 g/L de glucosa
  - pH  $4.5 \pm 0.2$  con HCl
- Medio M11
  - 1 g/L de extracto de levadura\*
  - 1 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
  - 0.982 g/L de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
  - 1.688 g/L de  $\text{MgSO}_4$ \*\*
  - 2.227 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
  - 100 g/L de Fuente de carbono\*\*\*
  - pH  $4.5 \pm 0.2$  con HCl

\* La concentración de extracto de levadura fue de 0.4 g/L para los medios en la selección de las cepas.

\*\* Se ajustó la concentración a 3.276 g/L cuando era  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

\*\*\* Las fuentes de carbono que se utilizaron fueron: glucosa, fructosa, melaza y piloncillo.

- Medio JA para fermentación  
1 L de jugo de *Agave* diluido a 100 g/L de azúcar  
0.5 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### 6.3. CONTEO

El conteo de células se realiza para conocer la concentración de microorganismo en una muestra así como para monitorear de las poblaciones y de esta manera determinar las cinéticas de crecimiento, para esto se cuenta con varias técnicas entre las que se encuentra el conteo directo al microscopio, o el conteo en medio de cultivo, donde se cuentan unidades formadoras de colonias (UFC). También existe el conteo indirecto por medio de la turbidez del medio o la estimación de la población por la técnica del número más probable.

#### 6.3.1. DIRECTO AL MICROSCOPIO

Cuando se realiza el conteo directo al microscopio se utilizan cámaras de conteo como la cámara de Neubauer o la cámara de Thoma.

Para el conteo de levaduras en cámara Thoma se colocó la muestra diluida y se contaron 5 cuadros medianos compuestos de 25 cuadros chicos.

Para la estimación de células de levaduras se contaron los cuadros de las 4 esquinas y un cuadro central, para calcular la concentración de células por mL se utilizó la siguiente fórmula.

$$\frac{\text{Levaduras contadas en un cuadro mediano}}{25 \text{ cuadros pequeños}} \times \frac{400 \text{ cuadros de la cámara total}}{0.1 \text{ mm}^3 \text{ (volumen de la cámara)}} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ mL}}$$

$$\text{O bien, } \left( \frac{\text{Levaduras contadas en los 5 cuadros medianos}}{5} \right) (0.16) = \text{cel/ml} \times 10^6$$

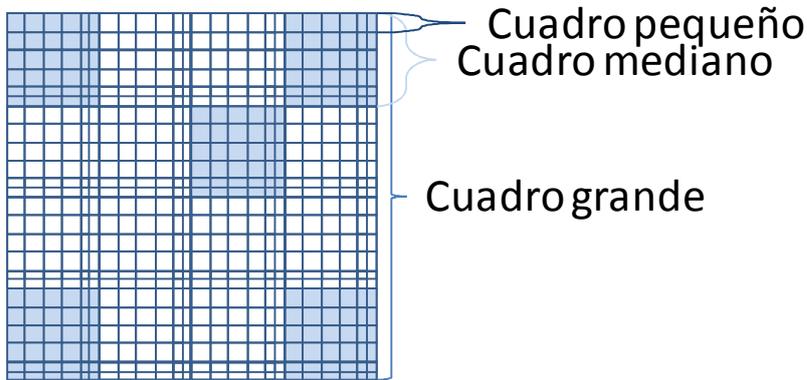


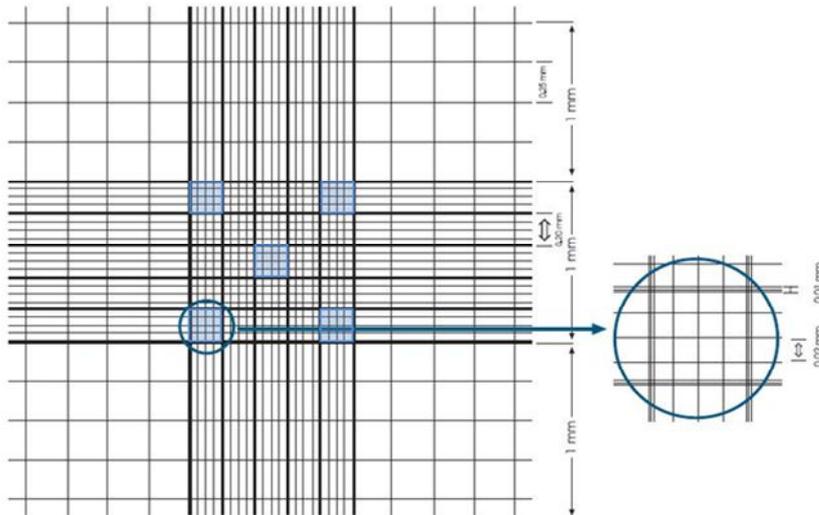
Figura. 6.1. Cámara de conteo Thoma.

Cuando se utilizó la cámara de conteo Neubauer se utilizó la siguiente fórmula

$$\frac{\text{Levaduras contadas en un cuadro mediano}}{16 \text{ cuadros pequeños}} \times \frac{400 \text{ cuadros de la cámara total}}{0.1 \text{ mm}^3 \text{ (volumen de la cámara)}} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ mL}}$$

O bien,  $\left( \frac{\text{Levaduras contadas en los 5 cuadros medianos}}{5} \right) (0.25) = \text{cel}/\text{mL} \times 10^6$

Figura 6.2. Cámara de conteo Neubauer.



### 6.3.2. CONTEO EN CAJA

Los métodos para el recuento de microorganismos en caja ofrecen la ventaja de poder recuperar las cepas y así poder identificarlas y aislarlas. El método de extensión en superficie consiste en inocular 100  $\mu\text{L}$  de muestra o dilución de la misma sobre una caja petri con medio de cultivo, la muestra es extendida sobre la superficie del agar ayudados por una varilla estéril de vidrio acodada.

Para la realización de la técnica primeramente se realizó un conteo al microscopio en cámara de Neubauer para hacer una estimación de la concentración de levaduras presentes en la muestra y realizar las diluciones necesarias para tener entre 50 y 100 levaduras al inocular 100  $\mu\text{L}$  de la dilución y extenderlos con una varilla acodada, puesto que si se llegan a tener más colonias en la caja no se llegan a ver fácilmente las diferencias morfológicas de las colonias (Romancino y col., 2008). A partir del conteo al microscopio se calculó la concentración de células en la muestra y se realizaron las diluciones necesarias de las muestras para inocular 100  $\mu\text{L}$  de la dilución correspondiente en cada caja petri con los medios WL y YPD. Se extendió la muestra con la varilla acodada sobre la superficie de la caja realizando duplicados de cada una. Se incubaron a 37°C y se revisaron a las 24 y 48 horas de incubación para el conteo de levaduras y reportar las UFC/mL. En el caso de los cultivos mixtos se realizó un conteo diferencial en el medio WL, en base a las características morfológicas características de cada una de las cepas de levaduras utilizadas.

#### 6.3.2.1. MEDIO YPD

El medio YPD es un medio ampliamente utilizado para el crecimiento de levaduras, el cual proporciona a la levadura los nutrientes necesarios para su crecimiento. Este medio le confiere a la levadura una fuente de nitrógeno mediante la dextrosa, la fuente de nitrógeno con la bactopectona y finalmente el extracto de levadura aporta aminoácidos, vitaminas y minerales esenciales para el crecimiento.

#### 6.3.2.2. Medio Wallerstein Laboratory (WL)

El medio WL fue desarrollado para el estudio de procesos de fermentación. Este medio puede ser utilizado para el crecimiento tanto de levaduras como de bacterias, pero cuando la concentración de levaduras es mayor que la de bacterias, se pueden agregar inhibidores para levaduras permitiendo el desarrollo de bacterias. El extracto de levadura es una fuente de elementos traza, vitaminas y aminoácidos, la peptona provee de nitrógeno, aminoácidos y carbono. La dextrosa es la fuente de carbohidratos. El fosfato monopotásico es el amortiguador de pH en el medio. Los cloruros de potasio, calcio y hierro, aportan los iones esenciales y ayudan a mantener el balance osmótico. Los sulfatos de magnesio y manganeso son la fuente de cationes divalentes para las reacciones enzimáticas durante el metabolismo de los microorganismos. El verde de bromocresol es un indicador de pH y finalmente el agar es el agente solidificador del medio.

## 6.4. INMOVILIZACIÓN DE LEVADURAS

Soluciones utilizadas para la inmovilización de levaduras

- Alginato de sodio 4% (40 g/L)
- $\text{CaCl}_2$  170 g/L
- Solución salina fisiológica, NaCl 0.9% (9 g/L)
- Solución de glucosa 40% (400 g/L)
- Agua destilada estéril
- Citrato de Sodio 2% (20 g/L)
- Caldo YPD para el crecimiento

NOTA: Todas las soluciones fueron esterilizadas en autoclave a 121°C por 20 min.

Procedimiento para la inmovilización de cada una de las cepas

Se inocularon 250 mL de caldo YPD y se incubó a 30°C y 250 rpm por 20 H, se centrifugó el cultivo a 4000 rpm por 5 min para concentrar la solución de células, una vez centrifugado se realizaron 2 lavados de las células con solución salina estéril y finalmente se resuspendió el botón de células en 25 mL de solución salina estéril. Se realizó un conteo al microscopio en cámara de conteo Thoma para conocer la concentración de células, ya que se requieren  $1 \times 10^9$  cel/mL para posteriormente utilizar como inóculo en la fermentación 10 g de perlas/L de medio y tener una concentración de  $1 \times 10^7$  cel/mL en la fermentación. Los 25 mL de suspensión celular se mezclaron con 25 mL de alginato de sodio 4%, para tener al final una solución de alginato de sodio al 2%. La mezcla se goteó en 500 mL de una solución de  $\text{CaCl}_2$  (170g/L) la cual induce la gelación, esta solución se mantuvo en agitación durante el goteo y se deja 30 min más en agitación después de terminado el goteo, para el goteo de la solución, ésta se bombeó a máxima velocidad de la bomba utilizando una manguera de 2.54 mm de diámetro interno y una aguja de calibre 27 G X 3/4" (0.4 X 20 mm). Una vez terminado el tiempo de agitación las perlas se lavaron 2 veces con agua destilada estéril y finalmente se dejaron en una solución de glucosa 4% para su almacenamiento en refrigeración a 4°C. Para el conteo de la concentración de células por gramo de perlas se pesaron 4 perlas en un tubo eppendorf y se suspendieron en 1 mL de citrato de sodio 2% para liberar las células y disolver el alginato de sodio, se llevaron al vortex por 10 min a máxima velocidad y se realizó un conteo al microscopio en cámara de Thoma.

## 6.5. TÉCNICAS ANALÍTICAS

### 6.5.1. AZUCARES (DNS)

La reacción se basa en la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico en ácido 3-amino-5-nitrosalicílico cuando los grupos aldehídos son oxidados por los grupos carboxilos (Miller, 1959).

La cuantificación de los azúcares reductores directos presentes en una muestra se realizó colocando 100  $\mu\text{L}$  de una dilución de la muestra y 100  $\mu\text{L}$  de reactivo DNS en un tubo, se agitó y se colocó en baño de agua a 95°C por 5 min, transcurrido el tiempo se pasó a enfriar en un baño de hielo, una vez frío se le colocó 1 mL de agua destilada y se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas Bio-Rad 680XR. Debido a que la muestra contenía partículas suspendidas

provenientes del bagazo del jugo de *Agave*, previamente se centrifugo y se recupero el sobrenadante para el análisis.

El reactivo de DNS se preparo en un matraz aforado de 1 L ambar o protegido de la luz disolviendo 10 g de hidróxido de sodio, 200 g de Tartrato de sodio y potasio, 0.5 g de metabisulfito de sodio y 2 g de fenol en 600 mL de agua. Los reactivos se agregaron en el orden mencionado, cada uno de los reactivos hasta su disolución total. Una vez disuelto todo, se agregaron 10 g de acido 3,5-dinitrosalicilico muy lentamente hasta disolver y se aforo a 1 L con agua destilada.

Los valores leídos en el lector de microplacas se convirtieron a valores de concentración en gramos por litro mediante una curva de calibración la cual se obtuvo preparando diferentes concentraciones de azúcar conocido. Esta preparación consistió en agregar en 100mL de agua destilada 0.1g de azúcar (glucosa, fructosa, xilosa, o su mezcla apropiada) para obtener una solución cuya concentración fue 1g/L de azúcar. De esta solución se prepararon distintas concentraciones haciendo diferentes diluciones, que se leen en el lector de microplacas a la longitud de onda anteriormente mencionada. De esta forma se obtuvo una curva que relaciona la absorbancia con la concentración, esta curva presenta la forma lineal, siendo la variable independiente la absorbancia.

#### 6.5.2. NITRÓGENO AMONIACAL

La medición del nitrógeno amoniacal se basa en la reacción del catión amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) con fenol e hipoclorito de sodio en presencia de nitroferricianuro como catalizador. Esta reacción forma compuestos tipo indofenol que brinda un color azul en medio alcalino.

Se preparó una “solución de coloreado de fenol” disolviendo 25 g de fenol en 400 mL de agua destilada, por separado se disolvieron 125 mg de nitroferricianuro de sodio en 50 mL de agua destilada. Se añaden los 50 mL de solución de nitroferricianuro a los 400 mL de solución de fenol y se aforó a 500 mL con agua destilada.

Por otro lado se preparó la “solución de hipoclorito alcalino” disolviendo 12.5 g de hidróxido de sodio en 400 mL de agua destilada y se le añadieron 20 mL de hipoclorito de sodio (Clorox, cloro comercial) y se aforaró a 500 mL con agua destilada.

Las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 min para retirar las células, y de ser necesario se diluyeron para tener una concentración de sulfato de amonio menor a 1 g/L.

La medición del nitrógeno amoniacal se llevó a cabo con 20  $\mu\text{L}$  de muestra a la que se le añadió 1 mL de solución de coloreado de fenol y se agito en vortex. Posteriormente se le añadió 1 mL de solución de hipoclorito alcalino y se agitó en vortex. Se dejó reaccionar por 10 min a temperatura ambiente y se añadieron 8 mL de agua destilada. Se agitó en vortex y se midió la absorbancia a 630 nm.

La curva de sulfato de amonio se preparo entre 0 y 1 g/L de sulfato de amonio con intervalos de 0.2 g/L.

### 6.5.3. NITRÓGENO ASIMILABLE

Para la medición del nitrógeno asimilable se utilizó el método Sörensen que consiste en colocar 100 mL de muestra en un vaso de precipitados de 250 mL ajustando el pH de la muestra a 7.5 con NaOH 1N, después se agregaron 25 mL de formaldehído 37% (previamente neutralizado a pH 7 con NaOH 1N). Se dejó en agitación por 5 min y después se tituló con un bureta NaOH 0.1N hasta un pH de 7.5 y se midió el volumen utilizado.

Después se utilizó la siguiente fórmula para el cálculo del nitrógeno asimilable.

$$N \text{ asimilable} = \frac{(\text{Vol de NaOH utilizado})(N \text{ de NaOH})(\text{Peso atómico N})(1000)}{\text{cantidad de muestra}}$$
$$N \text{ asimilable} = \frac{(X \text{ mL})(0.1 N) \left(14 \frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) (1000)}{100 \text{ mL}}$$

### 6.5.4. CROMATOGRAFÍA DE GASES HS-GC

Los compuestos volátiles mayoritarios se analizaron por la técnica de headspace acoplado a cromatografía de gases. Se utilizó un Headspace Hewlett Packard modelo HP 7694E, y un cromatografo Hewlett Packard modelo HP 6890, con un detector de ionización de flama, para la separación de los compuestos se utilizó un columna Innowax de 60m X 0.32 mm X 0.25 µm con una presión de 15.34 y un flujo de 1.8 mL/min para una velocidad de 26 cm/seg. La rampa de calentamiento del horno inicio a 55°C por 5 min aumentando 5°C/min hasta llegar a 160°C y aumentando 25°C/min hasta llegar a 220°C manteniéndose durante 8 min. La temperatura del detector fue de 250°C, los flujos de los gases fueron: Helio 30 mL/min, aire 300 mL/min y Nitrógeno 30 mL/min.

Se utilizaron viales de 20 mL a los cuales se les colocaron 2 mL de muestra, se colocaron las muestras en el Headspace el cual se programo bajo las siguientes condiciones:

Temperatura del vial de 80°C, temperatura del loop de 110°C, temperatura de la línea de transferencia 115°C, tiempo de vial 5 min, tiempo de presurización 0.2 min, tiempo de llenado del loop 0.2 min, tiempo de equilibrio 0.5 min, tiempo de inyección 1 min, tiempo de agitación 5 min, tipo de agitación 2, tiempo del ciclo 45 min. Se utilizó un liner 4711 split/Splitless con relación 55.617:1 y un flujo del split de 100 mL/min.

Se prepararon 3 curvas de concentraciones de los compuestos estándares para la cuantificación de los compuestos volátiles mayoritarios.

### 6.5.6. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

#### Preparación de muestras

Se centrifuga 1.5 mL de muestra para retirar las células, se coloca 1 mL de muestra centrifugada en un matraz aforado de 20 mL y se llena hasta el aforo con fase móvil. Para la

preparación de fase móvil se colocan 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en 1 L de agua ultra pura para una concentración de 1.87 mM. Una vez aforado el matraz se mezcla, con una jeringa de 3 mL se llena y se desecha 2 veces para lavar la jeringa, la tercera vez se llena y se coloca un filtro de membrana de nylon de 0.2  $\mu\text{m}$  de poro, se desecha la mitad de la muestra para lavar el filtro y la otra mitad se coloca en un vial para HPLC. Las muestras se refrigeran hasta el momento de llevarlas al cromatógrafo.

El cromatógrafo HPLC utilizado (modelo ACCELA, Thermo electron corporation) esta compuesto de 3 partes distintas, una parte que contiene las bombas y un desgasificador (bombas ACCELA), una parte que contiene las muestras y el automuestreador (automuestreador ACCELA) y la tercera parte que contiene el detector UV y visible (detector PDA), estos no se utiliza para la detección de compuestos pero es obligatorio para el funcionamiento del equipo. El detector es un aparato externo (Surveyor IR Plus detector, Finnigan) que mide la diferencia de refracción del líquido que fluye a través el sistema con respecto a la fase móvil. El detector para todos los experimentos se colocó a 40°C a fin de mantener los parámetros de detección constantes. Los resultados se expresan en unidades de RI (índice de refracción). En estas condiciones la respuesta del detector es específica para cada molécula y su concentración. Para la separación de los compuestos se utilizó una columna Rezex ROA-H<sup>+</sup> de 250 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro, con u flujo de 170  $\mu\text{L}/\text{min}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1.87mM, se inyectaron 25  $\mu\text{L}$  de muestra y la temperatura de la columna fue de 30°C. Para mantener la temperatura de la columna se utilizó un horno externo (HPLC Column controller, Therma Sphere TS-130).

## 6.6. CONDICIONES DE FERMENTACIÓN

### 6.6.1. NIVEL MATRAZ

Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 125 mL de volumen con 50 mL de medio y matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio, para las fermentaciones a nivel matraz. La incubadora con agitación se programo bajo las condiciones de 30°C y 100 rpm.

### 6.6.2. REACTOR EN LOTES

Se realizaron fermentaciones por duplicado en reactores Applikon con capacidad de 3 L y con volúmenes de trabajo de 1.5 y 2 L, con una agitación axial de 250 rpm y control de temperatura a 30°C con chaqueta de calentamiento y recirculación de agua. Se monitoreo el pH, temperatura, Oxígeno disuelto ( $\text{dO}_2$ ), y gases exhaustos  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$ . La aireación fue controlada con bombas para pecera con un flujo constante, los flujos de aireación se describirán en la parte de resultados cuando esta se haya utilizado. El jugo de *Agave* se diluyó a una concentración de azúcar de 100 g/L y se enriqueció con 0.5 g/L de sulfato de amonio. El reactor con el jugo se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min. El inóculo se preparó en medio YPD, el cual se incubó a 250 rpm/30°C durante 18 a 20 h. El fermentador se inoculó para comenzar con una concentración de  $1 \times 10^6$  cel/mL.

Las fermentaciones que se realizaron fueron:

**Tabla 6.2.** Fermentaciones realizadas a nivel reactor

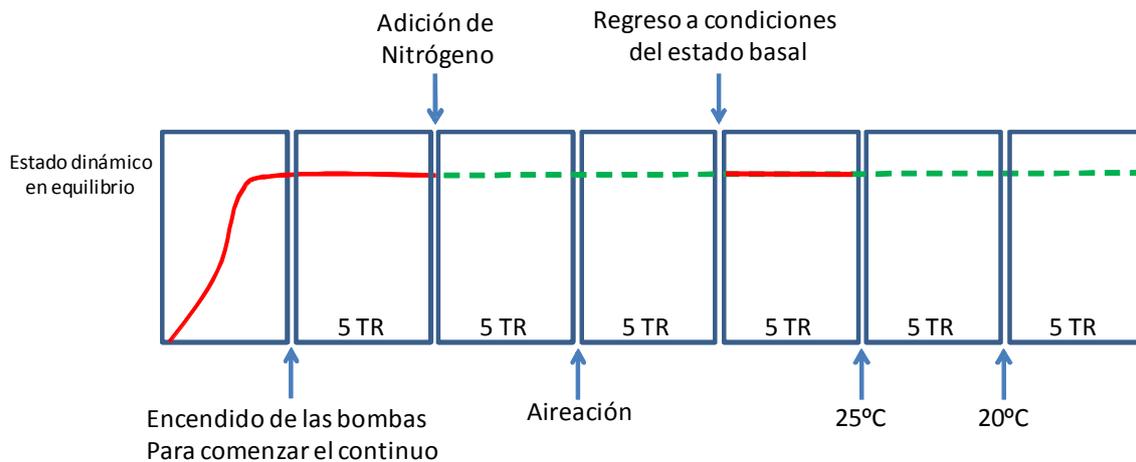
Cepa	Puro/Mixto	Volumen	Aireación	Duplicados
AR5	Puro	2 L	NO	2
DU3	Puro	2 L	NO	2
GRO3	Puro	2 L	NO	4
GRO3	Puro	1.5 L	0.2 vvm	4
AR5/DU3	Mixto	2 L	NO	2
AR5/GRO3	Mixto	2 L	NO	2
AR5/GRO3	Mixto	1.5 L	0.2 vvm	2

### 6.6.3. REACTOR CONTINUO

Los reactores en continuo realizaron en reactores Applikon de 3L con un volumen de trabajo constante de 1.5 L de jugo de *Agave* enriquecido con 0.5 g/L de sulfato de amonio y una concentración de azúcar de 100 g/L. El medio de alimentación se preparó en botellas de 10 L con 8L de JA y las mismas concentraciones de azúcar y sulfato de amonio, se esterilizaron a 121°C por 30 min en autoclave.

El reactor se preparo con 1.7 L de JA y se inoculo con  $1 \times 10^6$  cel/mL preparados en caldo YPD con incubación de 18 a 20 h, incubados a 30°C y 250 rpm en un agitador orbital. Durante las primeras 12h de fermentación se mantuvo el cultivo en modo de lote, hasta que las levaduras llegaron a su máximo de crecimiento, el cual fue determinado previamente en los reactores en lotes. Se tomaron muestras regularmente cada 2 horas para el monitoreo de la cinética de crecimiento.

Una vez que la levadura llegó a su máximo de crecimiento, se activaron las bombas y se comenzó con el cultivo en continuo, manteniendo un volumen constante de trabajo de 1.5 L, de acuerdo a los flujos descritos en la **tabla 6.3**. Los cuales fueron calculados en base a los resultados que se obtuvieron de las fermentaciones en lote de cada una de las cepas en medio de jugo de *Agave*, pues mostraron tener diferentes velocidades de crecimiento. El cultivo continuo se dejo durante 5 tiempos de residencia (TR), para la estabilización fisiológica de la levadura y posteriormente comenzar con las perturbaciones como se muestran en la **figura 6.3**.



**Figura 6.3.** Esquema de las perturbaciones realizadas en el reactor en continuo.

La primera perturbación fue la adición de 0.75 g de sulfato de amonio al inicio, para duplicar la concentración (1g/L) de éste en el medio de fermentación. Se esperaron 5 TR tomando muestras regularmente durante este tiempo y posteriormente se continuó con la aireación del fermentador durante 5 TR. Seguido de 5 TR sin aireación para regresar a la levadura al estado fisiológico inicial.

Para la evaluación del efecto de la temperatura se utilizó un baño recirculador conectado al reactor, para controlar la temperatura a 25 °C durante 5 TR seguido de 5 TR a 20°C, durante los cuales se tomaron muestras regularmente para el monitoreo de las cinéticas.

Las condiciones de agitación se mantuvieron constantes todo el tiempo a 250 rpm.

De las muestras recolectadas se realizó conteo al microscopio al momento de tomar la muestra, posteriormente, las muestras fueron centrifugadas, por un lado se recuperó el sobrenadante y se congeló, realizando al final la medición de azúcares, nitrógeno, etanol y compuestos volátiles. Por otro lado a la biomasa recuperada de la muestra se le realizó un lavado con agua destilada y se secó a 50°C para la determinación de biomasa por peso seco.

**Tabla 6.3.** Parámetros de fermentación utilizados en el reactor en continuo con cada una de las cepas de levaduras.

Cepa	AR5 ( <i>S. cerevisiae</i> )	DU3 ( <i>K. marxianus</i> )	GRO3 ( <i>P. kluyveri</i> )
Flujo (mL/min)	4.46	3.90	5.95
Tasa de dilución ( $\mu$ ) ( $h^{-1}$ )	0.1784	0.1560	0.2380
Aireación (VVM)	0.25	0.25	0.5
Tiempo de fermentación(h)	180	204	148.5

#### 6.6.4. ESCALA PILOTO

Las fermentaciones en la planta piloto se realizaron en una tina de fermentación con un volumen de 240 L de jugo de *Agave* sin esterilizar, enriquecido con 0.5 g/L de sulfato de amonio, la primera fermentación se inoculó con la misma cantidad de AR5 y GRO3. La segunda fermentación se inoculo con un cultivo puro de GRO3. No se controló ningún parámetro, y se realizó como se hace normalmente en la industria tequilera. Una vez terminada la fermentación se paso a destilar, realizando una doble destilación para obtener el producto final.

#### 6.7. MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES ATF1, ATF2, EHT1, ACT1, QCR9 Y TFC1

##### 6.7.1. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCICOS TOTALES

La extracción de ADN genómico para probar iniciadores se realizó de acuerdo a la técnica descrita por [Tapia-Tussell y col., \(2006\)](#).

El siguiente procedimiento se llevó a cabo para la obtención de ARNm y síntesis de ADNc.

La extracción de ácidos nucleicos totales (ANT) de las muestras de la fermentación en continuo, se realizó por duplicado para cada una tomando como base el protocolo estándar del Masterpure™ Yeast Purification kit (Epicentre Biotechnologies, Madison) con algunas variaciones para optimizar la cantidad y calidad de ANT recuperados.

Se partió de las alícuotas de 1 mL de medio de cultivo contenido en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron a 13 000 rpm por 5 min, se retiró el sobrenadante; posteriormente se realizó un lavado, las células fueron resuspendidas en agua grado molecular se centrifugó a 13000 rpm por

5 min y se retiró el sobrenadante. Se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de solución de lisis a cada tubo y las células fueron resuspendidas con pulsos en vortex.

La solución se incubó a  $65^{\circ}\text{C}$  en baño maría por 30 min golpeando con los dedos el tubo cada 10 min para favorecer el lisado de las células. Los tubos se pasaron a hielo por 5 min y se añadieron 150  $\mu\text{L}$  del reactivo para precipitar proteínas y se agitó la mezcla por 10 s por inversión, los tubos se centrifugaron por 10 min a 13 000 rpm. Con pipeta se transfirió el sobrenadante con mucho cuidado de no perturbar el sedimento a otro tubo Eppendorf de 1.5 mL; al sobrenadante se le agregaron 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol previamente enfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se mezcló suavemente por inversión, las muestras se dejaron reposar por 5 min a  $-20^{\circ}\text{C}$  para favorecer la precipitación de los ANT.

El sedimento de ANT se obtuvo centrifugando por 10 min a 13 000 rpm, el sobrenadante se descartó conservando la pastilla de ANT la cuál fue lavada con etanol al 70% agregando 500  $\mu\text{L}$  por la pared del tubo y se vertió suavemente. El etanol fue descartado por decantación y la pastilla se secó con la ayuda del equipo Speed Vac Concentrator modelo DNA 120OP-115 (Thermo Scientific) por 30 min.

Una vez seca la pastilla se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de buffer TE, y se dejó reposar por 1 h más para permitir la solubilización de los ANT golpeando suavemente el tubo cada 15 min.

#### 6.7.2. EXTRACCIÓN DE mRNA

##### Digestión del ADN

A los tubos con 50  $\mu\text{L}$  de buffer TE que contenía los ANT se les agregó 0.5  $\mu\text{L}$  de DNasa I (217/  $\mu\text{L}$ ; Invitrogen, Carlsbad, EUA) y se mezcló; esta mezcla se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 40 min y posteriormente se paso a hielo. Se determinó la concentración y el índice de pureza del ARN total con la ayuda del equipo NanoDrop. Se continuó inmediatamente con la purificación de ARNm

A partir del ARN total se realizó la purificación del ARNm utilizando como base el protocolo propuesto por el fabricante del kit comercial GenElute™ Direct mRNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) con algunas modificaciones para lograr la mayor cantidad y calidad posible de ARNm. Todas las soluciones y reactivos utilizados son los contenidos en el kit antes mencionado y se prepararon previamente como señala el fabricante.

Al cada tubo que contenía 50  $\mu\text{L}$  con ARN se le agregaron 200  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNasa para ajustar el volumen a 250  $\mu\text{L}$ . Se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de solución de unión 2X a el total de la solución anterior completando así 500  $\mu\text{L}$  y se agitó brevemente con vortex, de esta manera se preparó el ARNm para la unión con las perlas oligo dT.

Se añadieron 15  $\mu\text{L}$  de perlas oligo dT (previamente mezcladas y a temperatura ambiente) y se mezcló el contenido a fondo por agitación en vortex. La mezcla fue incubada a  $70^{\circ}\text{C}$  por 3 min en baño maría para desnaturalizar el RNA. La muestra fue retirada del baño maría y se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente. El complejo de ARNm se centrifugó por 2 min a 13 000 rpm y cuidadosamente se descartó el sobrenadante por pipeteo, dejando aproximadamente 50  $\mu\text{L}$  para evitar perturbar el botón o pastilla.

La pastilla se resuspendió en 500  $\mu\text{L}$  de solución de lavado por pipeteo y posteriormente se pipeteó la suspensión dentro de un tubo de colección para centrifuga con filtro, cuidando que toda la suspensión hubiera sido expulsada de la punta y que la pastilla estuviera completamente removida del tubo. Se centrifugó 2 min a 13 000 rpm. Se removió la columna que contenía el complejo de ARNm (perlas) y se descartó el sobrenadante, la columna se colocó de nuevo dentro del tubo de colección.

Para el segundo lavado se pipetearon otros 500  $\mu\text{L}$  de solución de lavado dentro del filtro giratorio, se centrifugó 2 min a 13 000 rpm y se descartó el sobrenadante.

La primera elución se realizó transfiriendo el filtro giratorio dentro de un nuevo tubo de colección y se pipetearon 50  $\mu\text{L}$  de solución de elución (precalentada a  $70^{\circ}\text{C}$  en baño maría) en el centro del filtro giratorio asegurándose de que la solución hiciera contacto con las perlas (complejo de ARNm). Se incubó 5 min a  $70^{\circ}\text{C}$  y se centrifugó por 1 min a 13 000 rpm.

Para la segunda elución se pipetearon otros 50  $\mu\text{L}$  de solución de elución precalentada a  $70^{\circ}\text{C}$  en el centro del filtro giratorio, asegurándose de que la solución hiciera contacto con las perlas, se incubó por 5 min a  $70^{\circ}\text{C}$  y se centrifugó por 1 min a 13 000 rpm.

El ARNm poli(A+) se encontraba ahora en el sobrenadante de elución y estaba listo para su uso inmediato o almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se continuó inmediatamente con la síntesis del ADNc.

### 6.7.3. SÍNTESIS DE cDNA

El ADNc se sintetizó a partir del ARNm aislado anteriormente. Se utilizó el kit comercial SuperScript<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (invitrogen<sup>TM</sup> by life technologies<sup>TM</sup>) con algunas modificaciones, el procedimiento se describe a continuación:

En un tubo Eppendorf de 200  $\mu$ L se colocó la siguiente mezcla (mezcla 1):

- Primers oligo dT            1  $\mu$ L
- dNTPs                        1  $\mu$ L
- Muestra de ARNm            8  $\mu$ L

El resto de ARNm se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El tubo se colocó en el termociclador Veriti 96 well (Applied Biosystem) para su desnaturalización a  $65^{\circ}\text{C}$  por 5 min.

En un nuevo tubo de 200  $\mu$ L se preparó la mezcla 2 cuidando el siguiente orden:

- Buffer 10X                    2  $\mu$ L
- $\text{MgCl}_2$  25 Mm                4  $\mu$ L
- 0.1 M de DTT                2  $\mu$ L
- Inh. RNasa (RNase out)    1  $\mu$ L
- Enzima Super Script        1  $\mu$ L

Al tubo que contenía la mezcla 1 se le agregó la mezcla 2 y se colocó de nuevo en el termociclador para el alineamiento y síntesis de ADNc a  $50^{\circ}\text{C}$  por 50 min seguido de una reacción terminal a  $85^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos.

Se tomó el tubo del termociclador y se agregó 1  $\mu$ L de RNasa H a la reacción, se colocó en el termociclador por 20 min a  $37^{\circ}\text{C}$  para la remoción de ARN. Terminado el programa se retiró la reacción y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### 6.7.4. MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES POR RT-qPCR

Las reacciones de qPCR tanto para las pruebas iniciales como para medir la expresión génica de *S. cerevisiae* se realizaron en un termociclador LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) con una mezcla maestra de reacción LightCycler<sup>®</sup> FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). Se utilizaron capilares de vidrio a un volumen final de 10  $\mu$ L, los detalles se muestran en la **tabla 6.4**. Los iniciadores utilizados fueron específicos para cada gen y se describen en las **tablas 5 y 6**.

**Tabla 6.4.** Preparación de las reacciones de qPCR con SYBR Green Master.

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen</b>
SYBR Green Master	5X	1X	2.0 µL
Iniciador Directo	10 µM	200 nM	0.2 µL
Iniciador Reverso	10 µM	200 nM	0.2 µL
Agua	--	--	6.6 µL
Muestra	--	--	2.0 µL
Total	--	--	10 µL

El termociclador LightCycler 1.5 se programó como se muestra en la **tabla 6.5.**:

**Tabla 6.5.** Programación de corrida para qPCR.

<b>Paso del programa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (segundos)</b>	<b>Rampa (°C/s)</b>	<b>Medición de fluorescencia</b>
Desnaturalización inicial	95	600	4.4	
Desnaturalización	95	20	4.4	
Amplificación	Variable	10	2.2	una vez
45 ciclos	(tabla 5 y 6)			
Elongación	72	20	4.4	
	95	5	2	
Curva melting	65	15	2	continuo
	95	--	0.04	
Enfriamiento	40	5	20	

## 6.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron en el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI, debido a que fue necesario un análisis estadístico diferente para cada capítulo de resultados, estos serán descritos en cada uno de ellos. Se utilizaron el ANOVA de uno y varios factores, el análisis de componentes principales, el análisis de factores, el análisis discriminante y la superficie de respuesta.

## **7. RESULTADOS**

**7.1. CAPITULO 1. Potencial de cepas no-Saccharomyces para su uso en fermentación alcohólica de jugo de *Agave* para la producción de tequila 100% y tequila**

**7.2. CAPITULO 2. Influencia de la temperatura y la agitación durante la fermentación de jugo de *Agave* y medio semi-sintético con levaduras no-*Saccharomyces* para la producción de etanol y compuestos volátiles**

**7.3. CAPITULO 3. Influencia de la concentración de Ca y Mg en el medio de fermentación sobre la capacidad de producción de etanol en levaduras no-*Saccharomyces* aisladas de procesos de fermentación de *Agave***

**7.4. CAPITULO 4. Caracterización de cultivos puros libres e inmovilizados en jugo de *Agave* y medio semi-sintético, (artículo 1)**

**7.5. CAPITULO 5. Efecto de la concentración de nitrógeno, aireación y temperatura en cultivo continuo en reactor con jugo de *Agave*, sobre la producción de etanol y compuestos volátiles con *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* y *Pichia kluyveri***

**7.6. CAPITULO 6. Relación entre la producción de esteres y la expresión de genes ATF1 y ATF2 en *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación en continuo en jugo de *Agave***

**7.7. CAPITULO 7. Comparación de capacidades fermentativas de las cepas AR5, DU3 y GRO3 entre nivel reactor y nivel matraz, en condiciones controladas en el laboratorio**

**7.8. CAPITULO 8. Caracterización de levaduras no-*Saccharomyces* en cultivo puro para la producción de tequila a nivel piloto**

**7.9. CAPITULO 9. Caracterización de cultivos mixtos *Saccharomyces* /no-*Saccharomyces* y comparación contra *Saccharomyces* en cultivo puro. (Artículo 2)**

**7.10. CAPITULO 10. Modelo matemático de las cinéticas de crecimiento y consumo de azúcar de los cultivos puros y mixtos a nivel laboratorio en matraz**

## **7.1. CAPITULO 1. Potencial de cepas no-*Saccharomyces* para su uso en fermentación alcohólica de jugo de *Agave* para la producción de tequila 100% y tequila.**

### **7.1.1. INTRODUCCIÓN**

Las levaduras no-*Saccharomyces* fueron consideradas como contaminación de las fermentaciones alcohólicas, y durante años se busco la manera de no tenerlas presentes en la fermentación. Existen reportes donde las levaduras no-*Saccharomyces* proliferan en las primeras etapas de la fermentación y su crecimiento es inhibido por su baja tolerancia al etanol, aproximadamente 5 a 6 %, dando lugar a que las levaduras más tolerantes al etanol, especies del genero *Saccharomyces*, continuaran con la fermentación (Fleet y Heard 1993, Kunkee, 1984, Fleet y col., 1984, Ciani y Picciotti 1995). A pesar de que las levaduras no-*Saccharomyces* están activas durante un corto periodo en la fermentación, contribuyen en la calidad aromática de la bebida final (Comi y col., 2001, Romano y col., 2003). Después de 1990 fueron reportadas algunas levaduras no-*Saccharomyces* con la capacidad de sobrevivir durante toda la fermentación en co-cultivo con *S. cerevisiae*, donde esta fue la levadura mayoritaria durante la fermentación (Ciani y Picciotti 1995).

Se conoce que durante el proceso de elaboración de bebidas de *Agave* en la etapa de fermentación se encuentran consorcios estables de bacterias y levaduras en fermentaciones espontaneas (Lappe-Oliveras y col., 2008). En el proceso de elaboración del tequila han sido identificados diferentes géneros de levaduras no-*Saccharomyces* tales como, *Brettanomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomycoides*, *Zygosaccharomyces*, *Torulaspota* e *Issatchenkia* (Lachance, 1995), los cuales también han sido identificados en otras bebidas alcohólicas como el vino.

Actualmente existe un creciente interés en el estudio de las levaduras no-*Saccharomyces* durante la fermentación, al saber que estas son las principales responsables de la producción de diferentes aromas deseados en las bebidas (Carrau y col., 2008, Blanco y col., 2008, Ciani y col., 2010). Investigaciones recientes en vino demuestran que las cepas no-*Saccharomyces* son capaces de producir etanol y tolerar altas concentraciones, hasta el momento solo una investigación reporta un cultivo puro de *Pichia kudriavzevii* con la cual se realizó una fermentación de vino (Sharma y col., 2011).

Las levaduras no-*Saccharomyces* en comparación con *Saccharomyces*, tienen la capacidad de sintetizar varias enzimas extracelulares tales como esterases y  $\beta$ -glucosidasas las cuales poseen un importante rol en las características aromáticas del vino, convirtiendo los compuestos precursores de aromas en el jugo de uva a compuestos aromáticos activos ([Charoenchai y col., 1997](#)).

Las levaduras no-*Saccharomyces* del género *Hanseniaspora* producen altas concentraciones de compuestos volátiles deseados en las bebidas tales como: acetato de etilo (aroma frutal, pero por arriba de los 200 mg/L es un aroma a solvente ([Mamede y col., 2005](#))), acetato de feniletilo (aroma floral), alcohol fenilico (aroma rosas) y acetoina (aroma a mantequilla), los cuales impactan en el bouquet ([Romano y col., 2003](#), [Moreira y col., 2005](#)). En la búsqueda de aumentar la cantidad de aromas en el vino se han realizado estudios en fermentaciones de jugo de uva Pinot noir y Chardonnay fermentados con levaduras *Pichia membranaefaciens*, y jugo de uva Chardonnay fermentado con *Kloeckera apiculata* produciendo concentraciones similares de acetato de etilo, acetato de isoamilo, acetaldehído y etanol ([Mamede y col., 2005](#)).

En la fermentación de malta para la producción de cerveza, también se ha pretendido utilizar levaduras no-*Saccharomyces* para incrementar el perfil aromático de la cerveza, teniendo que *C. tropicalis* muestra un mejor crecimiento que el presentado por *S. cerevisiae*, demostrando ser una buena candidata para estudios posteriores en la fermentación de malta ([Alloue-Boraud y col., 2015](#)).

En este capítulo se presenta el estudio del potencial de las levaduras no-*Saccharomyces* para la realización de fermentaciones en jugo de *Agave tequilana* Weber var. azul en cultivo puro evaluando sus capacidades fermentativas en base a la producción de etanol y producción de compuestos volátiles, especialmente ésteres, en comparación a lo producido por una cepa control *S. cerevisiae* (AR5).

### 7.1.2. METODOLOGÍA

Para este capítulo se utilizaron 12 cepas de levaduras de la colección de CIATEJ, las cuales fueron: *Kluyveromyces marxianus* (OFF1, GRO6, DU3, SLP1), *Torulaspota delbrueckii* (DI, DI1), *Pichia kluyveri* (GRO3), *Zygosaccharomyces bisporus* (ML2), *Z. bailii* (ML3), *Z. rouxii* (CF), *Shizosaccharomyces pombe* (MN). Todas las no-*Saccharomyces* fueron aisladas de procesos

fermentativos de mezcal en los estados de Guerrero, Oaxaca y San Luis Potosí. Una *Saccharomyces cerevisiae* (AR5) que fue aislada de un proceso fermentativo de tequila, la cual se utilizó como referencia o control. Las fermentaciones se realizaron en matraz Erlenmeyer de 125 mL con un volumen de 50 mL a una concentración inicial de azúcar de 100 g/L.

Los medios de fermentación fueron jugo de *Agave* (*Agave tequilana* Weber var. azul), y medio mínimo (M11) con glucosa, fructosa, piloncillo y melaza como fuente de carbono. (El piloncillo se obtuvo de manera comercial de una tienda y la melaza fue obtenida de la industria).

El medio M11 se formuló con las siguientes concentraciones, 0.4 g/L de extracto de levadura, 1 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.982g/L de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1.688 g/L de  $\text{MgSO}_4$ , 2.227 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 100 g/L de fuente de carbono, ajustando el pH final a  $4.5 \pm 0.2$  con HCl.

Para tener las levaduras en el mismo estado fisiológico al inicio de la fermentación independientemente de la fuente de carbono en el medio de fermentación, los inóculos se prepararon en caldo YPD (10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de bactopectona, 20 g/L de glucosa), donde no hay limitación de nutrientes, y se incubaron a 30°C y 250 rpm de 18 a 20 h.

Se realizaron duplicados de fermentación y se inocularon con  $1 \times 10^6$  cel/mL incubándolos a 30°C y 100rpm por 72h. Se tomaron muestras inicial y final. Los azúcares reductores totales se midieron por la técnica de Miller con el reactivo de DNS. Para la medición del etanol y compuestos volátiles se utilizó HS-GC, metodología previamente descrita en el capítulo 6 materiales y métodos.

### **7.1.3. RESULTADOS.**

Se probaron las 11 cepas de levaduras no-*Saccharomyces* (más una *S. cerevisiae* como referencia) en diferentes medios de fermentación para determinar sus características fermentativas así como la producción de los principales compuestos volátiles incluyendo ésteres (en particular el acetato de etilo como referencia).

### 7.1.3.1. PRODUCCIÓN DE ETANOL.

Las concentraciones más altas de etanol obtenidas para las diferentes cepas se obtuvieron en jugo de *Agave* (**figura 7.1.1.**). La cepa de referencia AR5 (*S. cerevisiae*) fue la que produjo la mayor concentración de etanol, pero las cepas del género *Kluyveromyces* (OFF1, SLP1, DU3, GRO3) en jugo de *Agave* y piloncillo produjeron concentraciones similares a AR5 (*S. cerevisiae*). En glucosa las cepas no-*Saccharomyces* que produjeron la mayor concentración de etanol fueron las *Zygosaccharomyces* (ML2, ML3, CF). Cabe destacar la cepa ML2 la cual produjo en el medio con glucosa una gran cantidad de etanol, fue la que menos produjo en los medios con fructosa, melaza y piloncillo. Las cepas del género *Torulaspota* (DI, DI1) muestran que son las que producen la mayor cantidad de etanol en el medio con melaza sin embargo en el medio con glucosa son de las que menos etanol producen.

En jugo de *Agave* las capacidades fermentativas de las no-*Saccharomyces* en comparación con *S. cerevisiae* son similares, sin embargo, en los demás medios de fermentación se observó una concentración de azúcar residual alta, especialmente en los medios donde la fuente de carbono era fructosa o glucosa (**Figura 7.1.2.**), esto ligado a bajas concentraciones de producción de etanol, en comparación con lo que se puede observar en la **figura 7.1.3.** donde los rendimientos de etanol de la cepa AR5 (*S. cerevisiae*) en comparación con las no-*Saccharomyces*, lo que se corrobora con una alta concentración de azúcares residuales en los medios de fermentación formulados (**Figura 7.1.2.**).

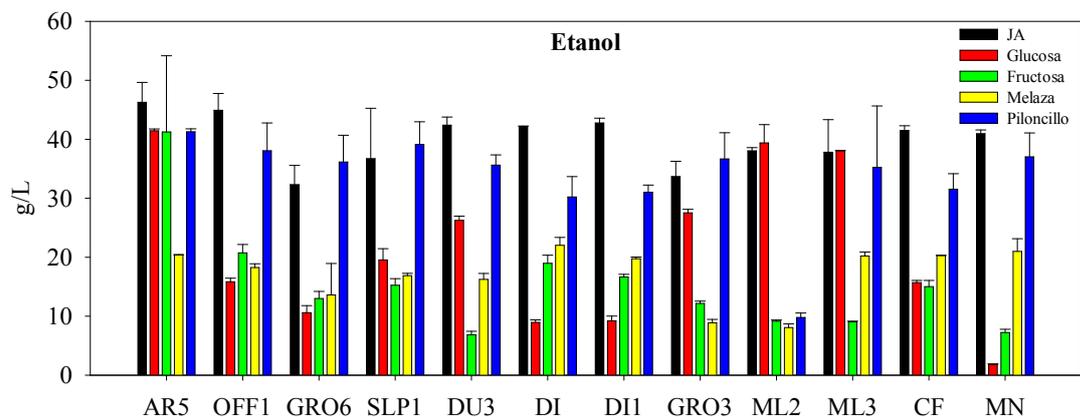
Estos resultados ponen en evidencia que las levaduras no-*Saccharomyces* están adaptadas al medio de jugo de *Agave* o bien este les proporciona los nutrientes necesarios no solo para su crecimiento sino, también para poder producir una buena concentración de etanol, por lo que muestran un rendimiento de etanol aceptable para la industria tequilera. El medio utilizado para la comparación del efecto de la fuente de carbono probablemente no tiene los nutrientes necesarios, pero esto pone en evidencia la importancia no solo de la fuente de carbono, sino también, que los demás nutrientes juegan un papel importante en el metabolismo para la producción de los compuestos volátiles deseados.

De la Torre González y col., (2016) reportan que la presencia de glucosa en el medio como única fuente de carbono aumenta la tolerancia al etanol, mientras que la presencia de fructosa como única fuente de carbono provoca una disminución a la tolerancia de etanol en levaduras tanto

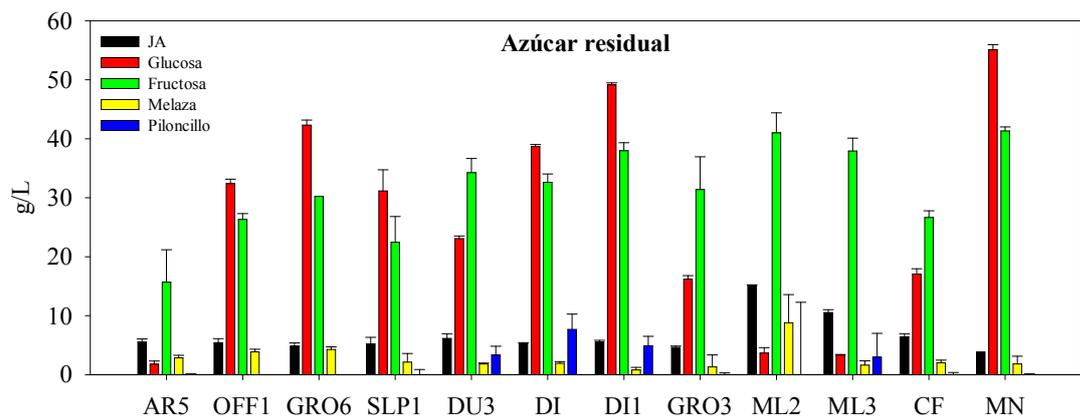
*Saccharomyces* como no-*Saccharomyces*. Si la presencia de glucosa como única fuente de carbono aumenta la tolerancia al etanol, las levaduras no-*Saccharomyces* podrían llegar a terminar la fermentación por sí solas, puesto que se atribuye que no terminan la fermentación por su baja tolerancia al mismo. En el presente trabajo se observó que independientemente del carbohidrato presente en el medio de cultivo, cada una de las levaduras presenta un comportamiento diferente, siendo la producción de etanol en algunas ocasiones mejor con fructosa que con glucosa. Si consideramos que las levaduras provienen de procesos fermentativos de jugo de *Agave*, han sido adaptadas de manera natural a este jugo, el cual contiene una mayor concentración de fructosa que de glucosa. La glucosa al ser el carbohidrato más común en los alimentos, es el primero en ser metabolizado por los microorganismos, debido a esto, solo existe la presencia de glucosa durante las primeras horas de la fermentación, quedando con fructosa como única fuente de carbono en el medio cuando se trabaja con jugo de *Agave*.

En la búsqueda de nuevas levaduras que puedan realizar la fermentación con un incremento de la concentración de aromas en la bebida final se ha recurrido a comparar diferentes levaduras no-*Saccharomyces* con *S. cerevisiae*, en diferentes bebidas alcohólicas como en cerveza donde *Candida tropicalis* presenta un crecimiento mejor en extracto de malta que el presentado por *S. cerevisiae* (Alloue-Boraud y col., 2015). Al igual que en este trabajo, puede llegar a haber otras levaduras que presenten mejores rendimientos de crecimiento o producción de etanol que los que se tienen con *S. cerevisiae*.

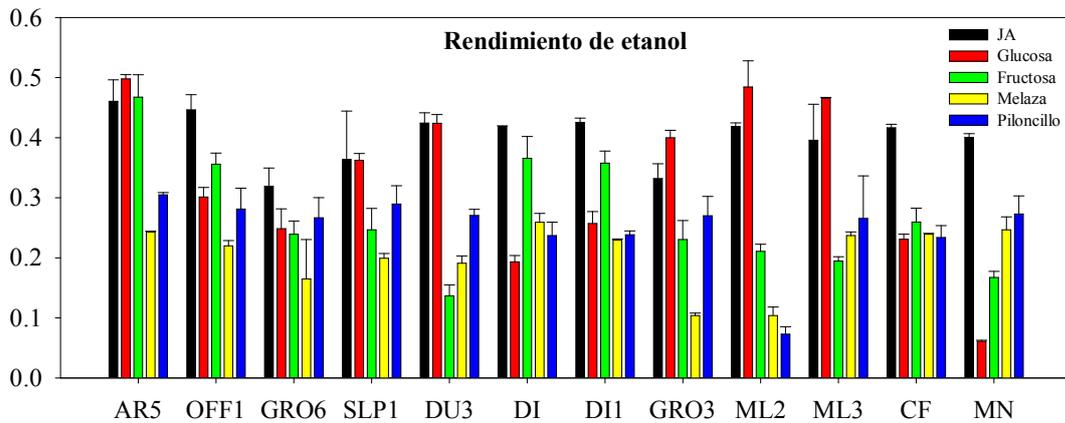
Las levaduras presentan un comportamiento particular y único, debido a que se utilizan como productoras de alcohol en las bebidas alcohólicas, es de suma importancia evaluar la capacidad que tiene cada una de ellas para poder generar etanol a partir de las diversas fuentes de carbono, se pretende llegar a utilizar estas levaduras en fermentaciones de jugo de *Agave* para la producción de tequila. Por lo que podemos evaluar en base a la producción de etanol, que todas las levaduras son buenas candidatas para llegar a realizar una fermentación alcohólica en jugo de *Agave* con el objetivo de producir tequila, ahora falta revisar y evaluar los demás parámetros, para determinar cuál de las levaduras es mejor, no solo en producción de etanol, sino también, en producción de compuestos que contribuyan al perfil aromático de la bebida de una manera positiva.



**Figura 7.1.1.** Grafica de la concentración de etanol producida a las 72 h por las 12 cepas de levaduras en los diferentes medios de fermentación.



**Figura 7.1.2.** Gráfica de la concentración de azúcar residual de las 12 cepas de levaduras a las 72h de fermentación, en los diferentes medios.

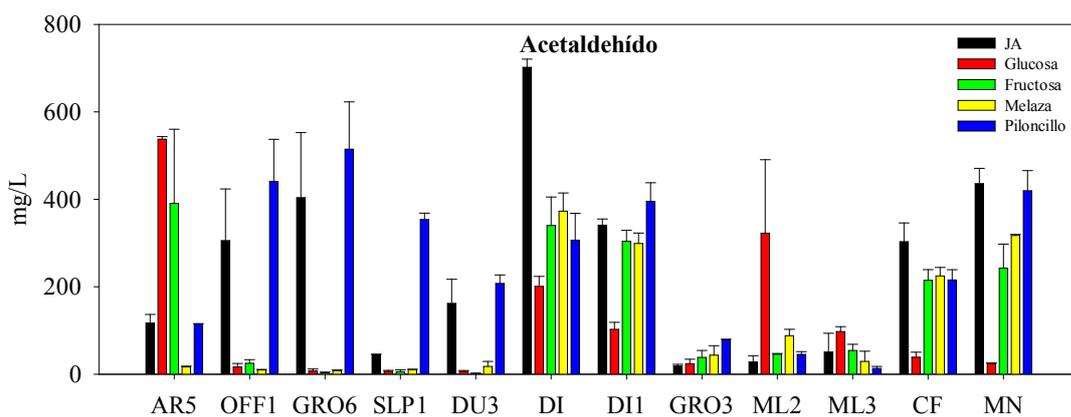


**Fig**

**ura 7.1.3.** Gráfica del rendimiento de conversión del azúcar a etanol de las 12 cepas de levaduras a las 72h en los diferentes medios de fermentación.

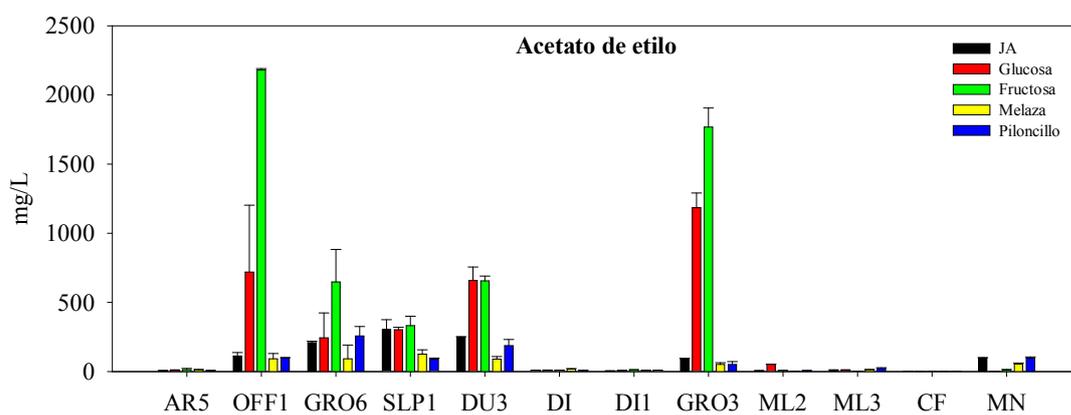
### 7.1.3.2. PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES.

En la **figura 7.1.4.** se muestran las concentración de acetaldehído a las 72 h de fermentación, donde se puede apreciar que las cepas DI y DI1 (*T. delbrueckii*) presentan las concentraciones más altas, lo que demuestra que fue una fermentación incompleta. Las levaduras del genero *Kluyveromyces* (OFF1, DU3, SLP1, GRO6) presentan una alta concentración de acetaldehído en el medio donde la fuente de carbono fue el piloncillo, sin embargo, la concentración de etanol es similar a la producida en JA.



**Figura 7.1.4.** Gráfica de la concentración de acetaldehído producido a las 72h por las 12 cepas de levaduras en los diferentes medios de fermentación.

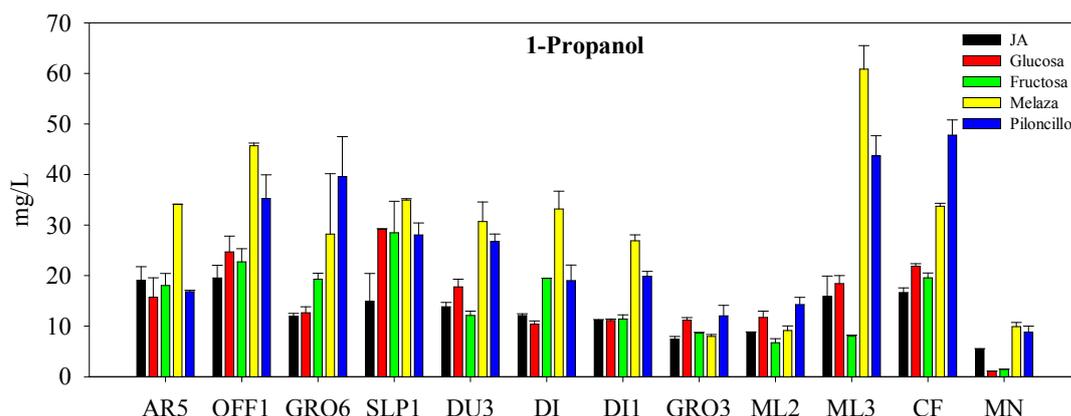
El acetato de etilo es el éster que se produce en mayor concentración durante la fermentación de jugo de *Agave* para la producción de tequila, por lo que su utiliza como indicador de la concentración de esteres producidos. Se puede apreciar en la **figura 7.1.5.** que en el medio de fermentación con fructosa es donde más acetato de etilo se produce. Las cepas del genero *Kluyveromyces* son las mayores productoras de acetato de etilo en los diferentes medios con respecto a las demás cepas no-*Saccharomyces*. La cepa GRO3 (*P. kluyveri*) en el medio con glucosa es la que produce la mayor cantidad de acetato de etilo así mismo sobre fructosa también produce una gran cantidad de este éster. Comparando la cepa DU3 (*K. marxianus*) con las demás cepas que no son *Kluyveromyces* es una buena productora de acetato de etilo en los 5 diferentes medios y si la comparamos con la cepa OFF1 en jugo de *Agave* la DU3 produce mayor cantidad de acetato de etilo. La cepa AR5 (*S. cerevisiae*) produce una baja concentración de esteres en comparación con las cepas de levaduras de los géneros *Kluyveromyces* y *Pichia*, quedando al final las cepas de levaduras de los géneros *Torulaspota*, *Zygosaccharomyces* y *Shizosaccharomyces* las cuales presentan una producción similar a las obtenidas por la cepa AR5 (*S. cerevisiae*). Si bien, las cepas no-*Saccharomyces* se consideran como las productoras de aromas durante la fermentación, no todas las cepas de levaduras no-*Saccharomyces* tiene la capacidad de generar una alta producción de esteres que contribuyen al aroma final de la bebida. Por lo que es necesario el estudio de las capacidades fermentativas de cada una de ella en cultivo puro.



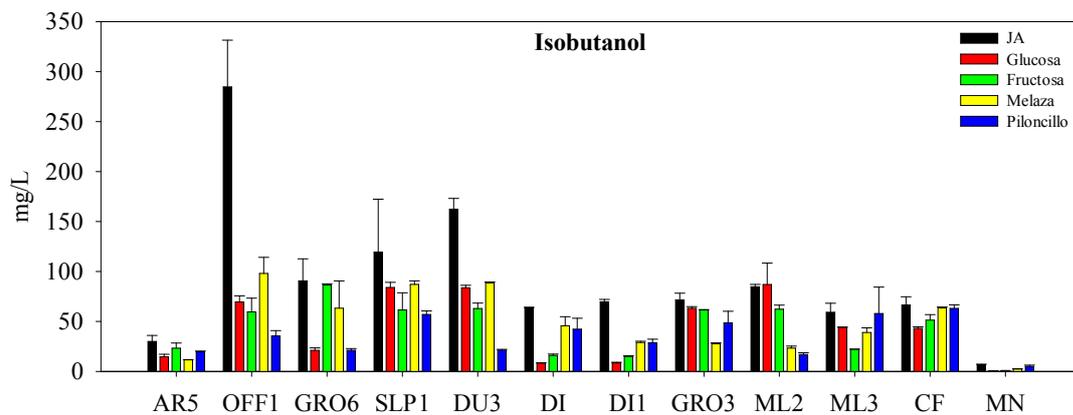
**Figura 7.1.5.** Gráfica de la concentración de acetato de etilo producido a las 72h por las 12 cepas de levaduras en los diferentes medios de fermentación.

Los alcoholes superiores que se producen en mayor concentración son los alcoholes amílicos seguidos del isobutanol, 1-propanol y 1-butanol. Cada una de las levaduras presenta un perfil de producción de alcoholes superiores diferente. En la **figura 7.1.6** se presentan las concentraciones de 1-propanol producidas por cada una de las cepas de levaduras donde se puede apreciar que en el medio con fuente de carbono melaza y piloncillo es donde se registran las mayores concentraciones producidas, siendo las cepas ML3 (*Z. bailli*) y CF (*Z. rouxii*) las que producen la mayor concentración. En la **figura 7.1.7**, se muestran las concentraciones de isobutanol, donde se puede apreciar que las levaduras *Kluyveromyces* (OFF1, GRO6, SLP1, DU3) presentan una producción mayor en comparación a lo que produce la cepa AR5 (*S. cerevisiae*), mientras que las cepas MN (*S. pombe*), GRO3 (*P. kluyveri*) y ML2 (*Z. bisporus*) producen una concentración menor comparado con lo producido por AR5 (*S. cerevisiae*). En la **figura 7.1.8**, se presenta la concentración de 1-butanol producido, donde se observa que todas las cepas producen concentraciones similares de este alcohol, solo se destaca que con la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) no se detectó la producción en los medios con fructosa, glucosa y melaza.

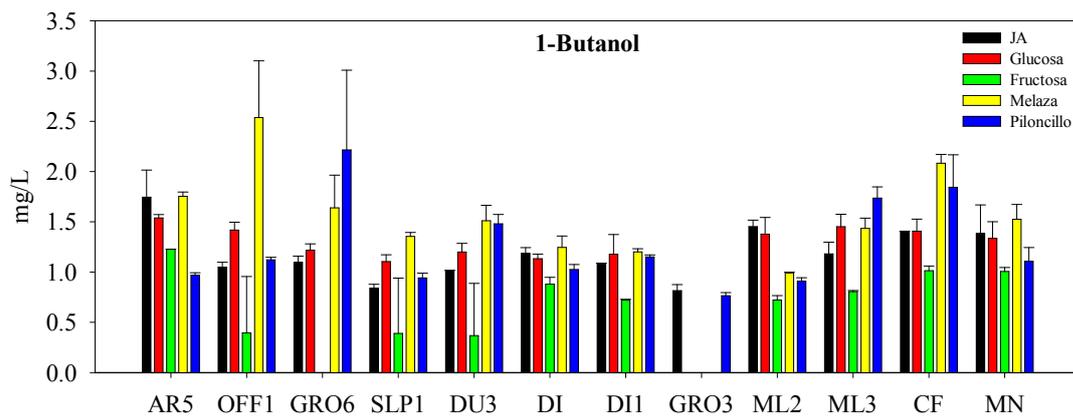
La cepa control AR5 (*S. cerevisiae*) produce una concentración de alcoholes amílicos mayor (**Figura 7.1.9**). Del mismo modo se puede observar que las cepas de *Kluyveromyces* (OFF1, GRO6, SLP1, DU3), presentan concentraciones de alcoholes amílicos superiores a las producidas por la cepa control. La cepa MN (*S. pombe*) es la que presenta concentraciones menores a las producidas por la cepa control.



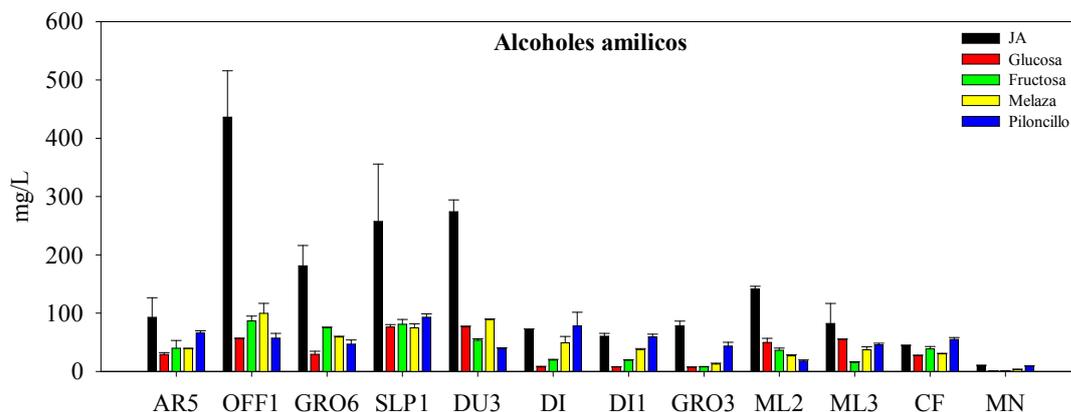
**Figura 7.1.6.** Gráfica de la concentración de 1-propanol producido a las 72h por las 12 cepas de levaduras en los diferentes medios de fermentación.



**Figura 7.1.7.** Gráfica de la concentración de isobutanol producido a las 72h por las 12 cepas de levaduras en los diferentes medios de fermentación.



**Figura 7.1.8.** Gráfica de la concentración de 1-butanol producido a las 72h por las 12 cepas de levaduras en los diferentes medios de fermentación.



**Fig**

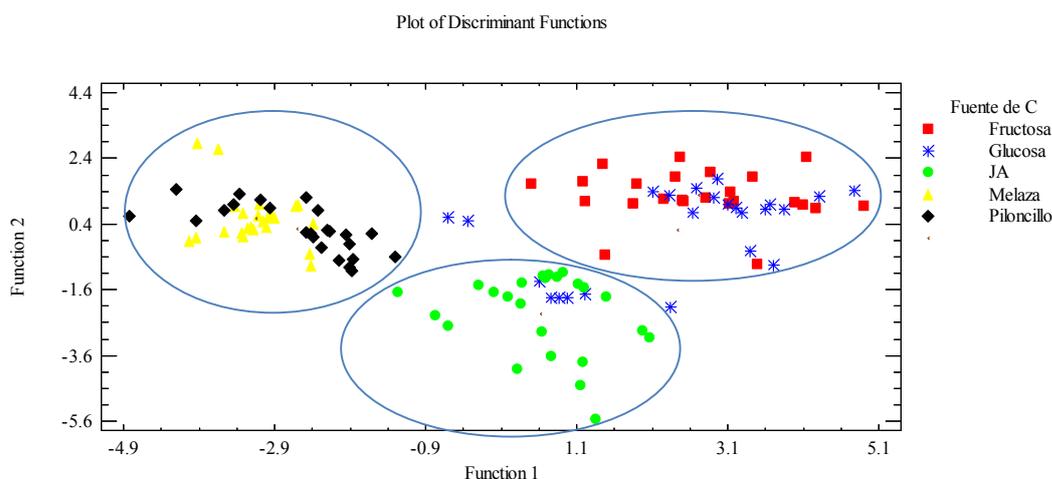
**ura 7.1.9.** Gráfica de la concentración de alcoholes amílicos producidos a las 72h por las 12 cepas de levaduras en los diferentes medios de fermentación.

### 7.1.3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se realizó un análisis estadístico discriminante para determinar el comportamiento de las cepas de levaduras en los diferentes medios y del mismo modo evaluar el efecto de la fuente de carbono, considerando como variables de respuesta la concentración de azúcar residual, rendimiento de producción de etanol, y concentración de los principales compuestos volátiles que fueron, acetaldehído, acetato de etilo, 1-propanol, 1-butanol, isobutanol y alcoholes amílicos.

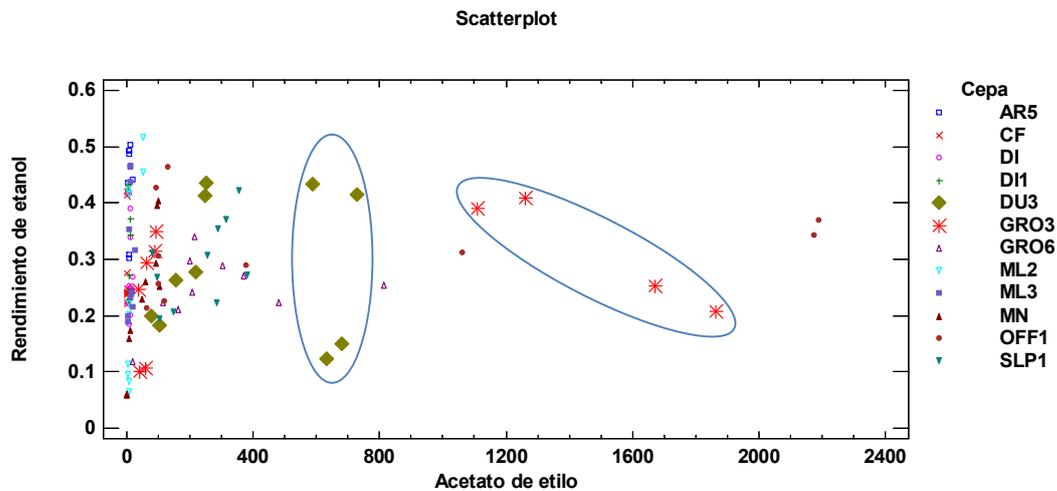
El análisis discriminante agrupa los datos en 4 diferentes funciones, donde la función 1  $[-0.0485378 * (\text{Acetaldehído}) + 0.0625308 * (\text{Acetato de etilo}) - 0.307179 * (1\text{-Propanol}) + 0.425002 * (\text{Isobutanol}) - 0.25743 * (1\text{-Butanol}) - 0.354149 * (\text{Alcoholes amílicos}) + 1.25136 * (\text{Azucres residuales}) + 1.18244 * (\text{Rendimiento de etanol})]$  explica el 76.36%, mientras que la función 2  $[0.20256 * (\text{Acetaldehído}) + 0.154332 * (\text{Acetato de etilo}) + 0.821 * (\text{Propanol}) + 0.100915 * (\text{Isobutanol}) - 0.436445 * (1\text{-Butanol}) - 0.750662 * (\text{Alcoholes amílicos}) + 0.369924 * (\text{Azucres residuales}) - 0.451275 * (\text{Rendimiento de etanol})]$  explica un 18.73%. Las 4 funciones fueron analizadas por un ANOVA donde se demuestra que hay diferencia estadísticamente significativa en las 4 funciones, tanto para la fuente de carbono como para la cepa de levadura utilizada. En la **figura 7.1.10.** se muestra la grafica de las funciones 1 y 2 del análisis discriminante donde se puede apreciar que las fuentes de carbono se agrupan de acuerdo a su naturaleza química, en el cuadrante superior izquierdo se tiene la melaza y el piloncillo los cuales son productos de la caña de azúcar y por tanto tienen una composición química similar, mientras que en el cuadrante superior derecho se

encuentran la glucosa y la fructosa. Finalmente al centro y abajo el jugo de *Agave*, con lo que se pueden formar 3 grupos. También se puede observar que en el cuadrante superior están las fermentaciones realizadas en medio mineral con las diferentes fuentes de carbono, mientras que en la parte inferior se encuentra el jugo de *Agave*. En el grupo del jugo de *Agave* se observan algunos puntos del medio mínimo con glucosa, esto puede deberse a que la glucosa es el carbohidrato más común, y puede activar las vías de síntesis de varios compuestos, a pesar de que en el jugo de *Agave* es la fructosa quien está en mayor concentración.



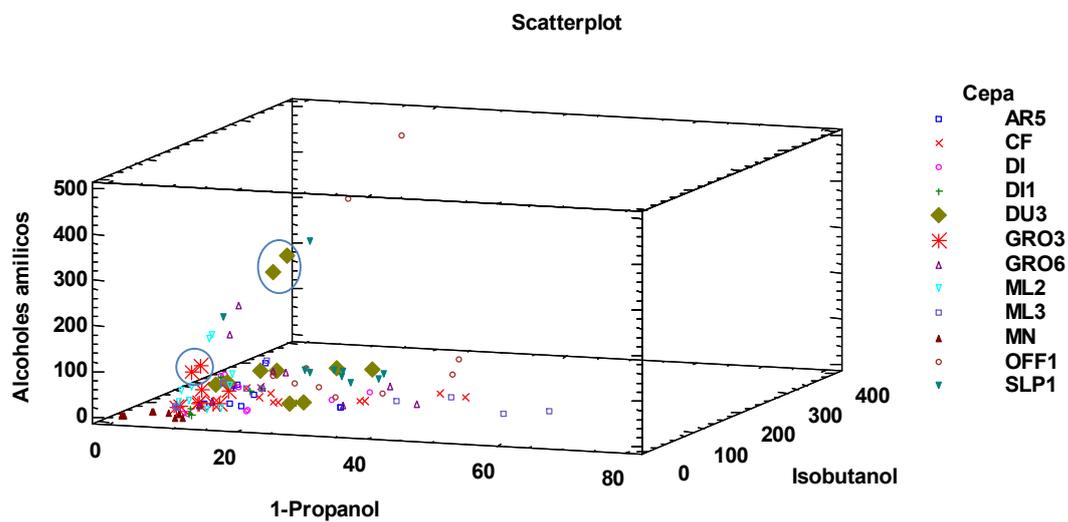
**Figura 7.1.10.** Gráfica de funciones discriminantes de las fuentes de carbono.

Para realizar la selección de las cepas con las que se continuó trabajando se tomó en cuenta la concentración de acetato de etilo producido, debido a que es el éster que se produce en mayor concentración y también se consideró el rendimiento de etanol, puesto que es una fermentación alcohólica, por lo que se realizó el análisis de la correlación de estos 2 factores con el análisis discriminante, observando en la **figura 7.1.11.** que las cepas del genero *Kluyveromyces* (OFF1, DU3, GRO6, SLP1) y la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) son las que producen la mayor concentración de acetato de etilo con rendimientos similares a la cepa control AR5 (*S. cerevisiae*).



**Figura 7.1.11.** Gráfica de correlación entre el acetato de etilo y el rendimiento de etanol, del análisis discriminante de las 12 cepas de levaduras.

Si bien, los ésteres son compuestos responsables de dar aromas al tequila, también los alcoholes superiores aportan notas aromáticas deseadas, por lo que se graficaron los 3 alcoholes superiores que se produjeron en mayor concentración (**figura 7.1.12.**), teniendo que la cepa OFF1 (*K. marxianus*) es la que presenta la mayor concentración de alcoholes superiores producida.



**Figura 7.1.12.** Gráfica de la correlación del análisis discriminante de los 3 principales alcoholes superiores producidos por las 12 cepas de levaduras.

Las cepas de levaduras *Kluyveromyces* mostraron ser buenas candidatas para continuar trabajando con ellas, pero debido a que en el tequila una alta concentración de alcoholes superiores no es aceptada por la norma oficial mexicana, debido a su riesgo de toxicidad, se descartó la cepa OFF1 (*K. marxianus*). Se seleccionó la cepa DU3 (*K. marxianus*) por tener el segundo lugar de las cepas del genero *Kluyveromyces* en la producción de esteres y rendimiento de etanol (**figura 7.1.11.**). La segunda cepa que se seleccionó fue la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) por su alta producción de esteres (**figura 7.1.11.**) y baja producción de alcoholes superiores (**figura 7.1.12.**). Finalmente se selecciono la cepa DI (*T. delbrueckii*) para tener una cepa no-*Saccharomyces* con un perfil similar al de la cepa control AR5 (*S. cerevisiae*).

La selección de cepas de levaduras para la fermentación, va a depender de lo que se busque en el producto final, teniendo que recientemente en la industria del vino se pretende la reducción de la concentración de etanol pero al mismo tiempo aumentar la concentración de esteres. Una manera de poder encontrar levaduras que puedan realizar esta acción es ir a las fermentaciones naturales y lugares de trabajo para la recuperación y caracterización de cepas adaptadas naturalmente a los procesos, como el aislamiento de levaduras de los viñedos para la producción de vino (Rossouw y Bauer 2016). Con el objetivo de disminuir la concentración de etanol se ha probando con levaduras que anteriormente no se consideraban buenas fermentadoras. *Williopsis saturnus* puede formar bajos niveles de etanol, además de reducir también la concentración de alcoholes superiores (Aung y col., 2015).

#### 7.1.4. CONCLUSIÓN.

Esta primera etapa del estudio destaca grandes diferencia a nivel de la producción de etanol en función de la fuente de carbono empleada en combinación con la cepa de levadura.

Las cepas de levaduras no-*Saccharomyces* son buenas productoras de etanol y aromas (ésteres) en fermentaciones de jugo de *Agave*, y las cepas de *K. marxianus* producen la mayor cantidad de acetato de etilo por lo que son posibles candidatas para fermentar en cultivos puros sin *S. cerevisiae* y así aumentar la concentración de esteres.

En la fermentación, la fuente de carbono parece no ser el principal factor que afecta la capacidad fermentativa de la levadura, sino más bien, el factor cepa de levadura utilizada para la fermentación y la deficiencia de nutrientes.

Comparando los diferentes medios utilizados se destaca el comportamiento de las levaduras sobre el medio a base de jugo de *Agave*. Cabe mencionar que las levaduras utilizadas para este estudio fueron aisladas de jugos de *Agave* de diferentes especies por lo que es un medio que contiene muchos macro y micronutrientes que favorecen el buen desarrollo de las levaduras.

En la producción de esteres destaca la influencia de la fructosa y la glucosa en el caso de algunas de la cepas en donde se observa un incremento importante de la concentración de esteres producidos.

Con los resultados obtenidos en esta primera etapa se seleccionaron las cepas DU3 (*Kluyveromyces marxianus*), GRO3 (*Pichia kluyveri*) y DI (*Torulaspota delbrueckii*), como las cepas no-*Saccharomyces* que se utilizaran para continuar con la siguiente etapa del proyecto. En el planteamiento inicial estaba planeado seleccionar únicamente una levadura sin embargo a la vista de estos resultados se tomó la decisión de seguir trabajando con 3 cepas pertenecientes a 3 especies de levaduras diferentes para enriquecer el trabajo y los conocimientos sobre estas levaduras en lo particular.

#### PERSPECTIVA DEL USO DE LAS LEVADURAS NO-SACCHAROMYCES ANALIZADAS EN ESTE TRABAJO.

El uso de levaduras actualmente en la industria biotecnológica va en aumento y no solo para la producción de bebidas alcohólicas. Los saborizantes son moléculas biológicamente activas y con un gran interés comercial en la industria de alimentos, cosméticos, detergentes e industrias farmacéuticas. La producción de sabores puede realizarse mediante la extracción de compuestos vegetales, síntesis química, bio-conversión enzimática de precursores o síntesis *de novo*. Las técnicas biotecnológicas mediante la ingeniería metabólica, muestran actualmente buenas eficiencias de producción para los llamados bio-saborizantes, los cuales son sabores naturales y/o fragancias que se obtienen de sistemas enzimáticos o celulares (Carlquist y col., 2015). Algunas de las levaduras estudiadas en este trabajo muestran un potencial en la producción de estos saborizantes de manera natural sin necesidad de manipulación genética. En especial las no-*Saccharomyces* muestran ser las principales candidatas para explotar la industria en la producción de este tipo de compuestos.

## 7.2. CAPITULO 2. Influencia de la temperatura y la agitación durante la fermentación de jugo de *Agave* y medio semi-sintético con levaduras no-*Saccharomyces* para la producción de etanol y compuestos volátiles.

### 7.2.1. INTRODUCCIÓN

La temperatura juega un papel importante durante la fermentación debido a que las levaduras tienen un óptimo de crecimiento entre 25 y 30°C, por lo que las fermentaciones se realizan en este rango de temperatura, favoreciendo el crecimiento de las mismas.

La fermentación alcohólica tiene como principal objetivo de producir etanol, es por esto que muchas investigaciones han sido encaminadas en la producción de etanol dejando de lado los compuestos que son responsables del perfil aromático de las bebidas alcohólicas. Se ha demostrado que la levadura *Kluyveromyces marxianus* es capaz de fermentar a temperaturas superiores en comparación con las temperaturas que *S. cerevisiae* soporta, industrialmente 5°C de diferencia en el proceso puede repercutir considerablemente en los costos de producción, por lo que *K. marxianus* es una opción viable que se considera actualmente para la producción de etanol ([Abdel-Banat y col., 2010](#)).

La temperatura es un factor que afecta la producción de ésteres observando que en fermentaciones con *S. cerevisiae* realizadas a 15°C se producen mayor cantidad de aromas frutales comparado con fermentaciones realizadas a 28°C en vinos ([Molina y col., 2007](#)). La fermentación a bajas temperaturas favorece la producción de ésteres y modifica la composición de lípidos celulares en levaduras, en vinos puede atribuirse este fenómeno a la retención de terpenos, a la reducción en alcoholes superiores y de un incremento en la producción de ésteres de etilo y acetato con el total de compuestos volátiles, además de que el medio de cultivo proporciona precursores para la formación de estos ([Beltran y col., 2008](#)).

Cuando se realizan fermentaciones por debajo de los 15°C se ha visto que el aroma en el vino aumenta debido a la retención de aromas en el vino por las bajas temperaturas, el metabolismo de los microorganismos también es afectado por la temperatura, observando cambios en el crecimiento y producción de compuestos aromáticos ([Andorra y col., 2010b](#)).

Se ha reportado que cuando existe una alta concentración de ácidos grasos insaturados en el medio provoca que exista una baja producción de etil ésteres, pero en fermentaciones a altas temperaturas con una alta concentración de ácidos grasos las levaduras producen octanoato y decanoato de etilo. Los ésteres aromáticos son formados intracelularmente por las levaduras, los etil ésteres se difunden fácilmente al medio de fermentación, pero para los ésteres de ácidos grasos la

difusión se obstaculiza por el tamaño de las cadenas de ácidos grasos y su hidrofobicidad al medio (Saerens y col., 2008).

La producción de ésteres por las levaduras está afectado por diversos factores, Yamada (1927) estudio *Willia anomala* (*Pichia anomala*) aislada de la superficie de la tina de fermentación de Sake observando que la aerobiosis es una de las condiciones de fermentación que más afectan positivamente a la producción de ésteres, teniendo una alta concentración de estos compuestos al final en la bebida. Este mismo fenómeno lo observó Peel (1951) con *Hansenula anomala* (*Pichia anomala*) ya que en condiciones anaeróbicas no logro producir estos compuestos. La habilidad de algunas levaduras de producir trazas de ésteres es una propiedad de muchas levaduras como *H. anomala* que logra producir 25 mmol de acetato de etilo por cada 100 mmol de glucosa consumida en condiciones aeróbicas, por lo que la formación del acetato de etilo es un proceso aeróbico (Davies y col., 1951), otros estudios demuestran que la producción de acetato de etilo por *Candida pseudotropicalis* fue favorecido en condiciones aeróbicas mientras que en condiciones anaeróbicas solo se produjo etanol, además en un medio deficiente de metales también se favorece la producción de ésteres (Willets y col., 1989).

## 7.2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para las fermentaciones realizadas en este capítulo se utilizó medio YPD para la preparación de los inoculos y medio M11 para la realización de las fermentaciones a nivel matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio y tapón de algodón. Para las condiciones variables se siguió un experimento de superficie de respuesta considerando 3 niveles (alto, medio y bajo) de temperatura y agitación (Tabla 7.2.1.).

**Tabla 7.2.1.** Superficie de respuesta.

		Agitación		
		250 rpm	175 rpm	100 rpm
Temperatura	35°C	AA	AC	AB
	25°C	CA	CC	CB
	20°C	BA	BC	BB

Donde los resultados de todas las variables de respuesta se midieron a las 72h de fermentación. Se consideraron como variables de respuesta; la población de levaduras, concentración de azúcar residual, etanol, ésteres, (acetato de etilo y acetato de isoamilo) y alcoholes superiores (1-propanol, isobutanol, alcoholes amílicos).

A partir de los resultados de la concentración de azúcar residual y la producción de etanol se calcularon los rendimientos para cada una de las fermentaciones en las diferentes condiciones.

De todas las fermentaciones se realizó el monitoreo de la población y la evolución de la concentración en el consumo de azúcar, con lo que se determinaron las velocidades de crecimiento en base a la ecuación de Monod y consumo de azúcar, mediante el cálculo de  $\mu$ .

Para realizar el cálculo de las velocidades, se ajustaron los datos a un modelo matemático con el programa *curve fit expert* de acuerdo a las siguientes ecuaciones (**Tabla 7.2.2.**).

**Tabla 7.2.2.** Modelos matemáticos que se utilizaron con el programa *curve fit expert* para modelar los resultados de las fermentaciones.

Modelo	Ecuación
Harris	$y = \frac{1}{(a + bx^c)}$
MMF	$y = \frac{(ab + cx^d)}{(b + x^d)}$
Logístico	$y = \frac{a}{(1 + be^{-cx})}$
Richard	$y = \frac{a}{(1 + e^{b-cx})^{1/d}}$

Existen diversas leyes de velocidad de crecimiento celular. Sin embargo, la expresión que comúnmente se usa es la ecuación de Monod para el crecimiento exponencial:

$$dx/dt = \mu x$$

Al resolver la ecuación anterior, tendremos que la velocidad máxima de crecimiento en la fase exponencial de un cultivo está dada por:

$$\ln x = \mu_{\max} t$$

Por lo que al graficar el tiempo de la fase exponencial de la cinética contra el logaritmo natural del crecimiento celular la pendiente de esta ecuación corresponde a la velocidad máxima de crecimiento. Por lo que las velocidades máximas de crecimiento fueron calculadas en Microsoft Office Excel®.

Para la determinación de la velocidad de consumo de azúcar, esta fue calculada mediante el cálculo de la pendiente, realizando un ajuste matemático de los resultados con el programa *curve fit expert* mediante la ecuación.

$$\text{Exponential Fit: } y = ae^{(bx)}$$

Obteniendo el valor de b, correspondiente a la velocidad de consumo de azúcar expresada en g/h

### 7.2.3. RESULTADOS

#### 7.2.3.1. Población de levaduras, cinéticas y velocidades máximas de crecimiento.

La evolución del crecimiento de las levaduras durante las 72 horas en que se realizó el experimento se muestra en la **figura 7.2.1.** donde se aprecian del lado izquierdo las fermentaciones en medio M11 y del lado derecho las fermentaciones en JA. En la **tabla 7.2.3.** se muestran las velocidades de crecimiento que fueron calculadas con el modelo de crecimiento MMF.

La cepa AR5 (*S. cerevisiae*) presenta un crecimiento mayor en JA (mayor a 1 E+08) comparado con el observado en medio M11 (menor a 1 E+08), se puede decir que es una cepa robusta, debido a que las variaciones de la temperatura y de la agitación parece no tener un efecto en el crecimiento (**Figura 7.2.1.**). Las velocidades máximas de crecimiento y consumo de azúcar son similares e independientes de los factores estudiados. Donde se observan diferencias es en el factor medio de fermentación, teniendo velocidades de crecimiento mayores en JA (**Tabla 7.2.3.**).

El crecimiento de la cepa DU3 (*K. marxianus*) en medio M11 se observa homogéneo a diferencia de lo que se observa en medio JA. La velocidad de crecimiento fue afectada por la temperatura, puesto que a temperaturas bajas se observan velocidades menores. Esto coincide con el efecto que tiene la temperatura sobre el metabolismo de las levaduras y la característica que tiene la cepa DU3 (*K. marxianus*) al pertenecer al género *Kluyveromyces* que se caracterizan por ser termotolerantes.

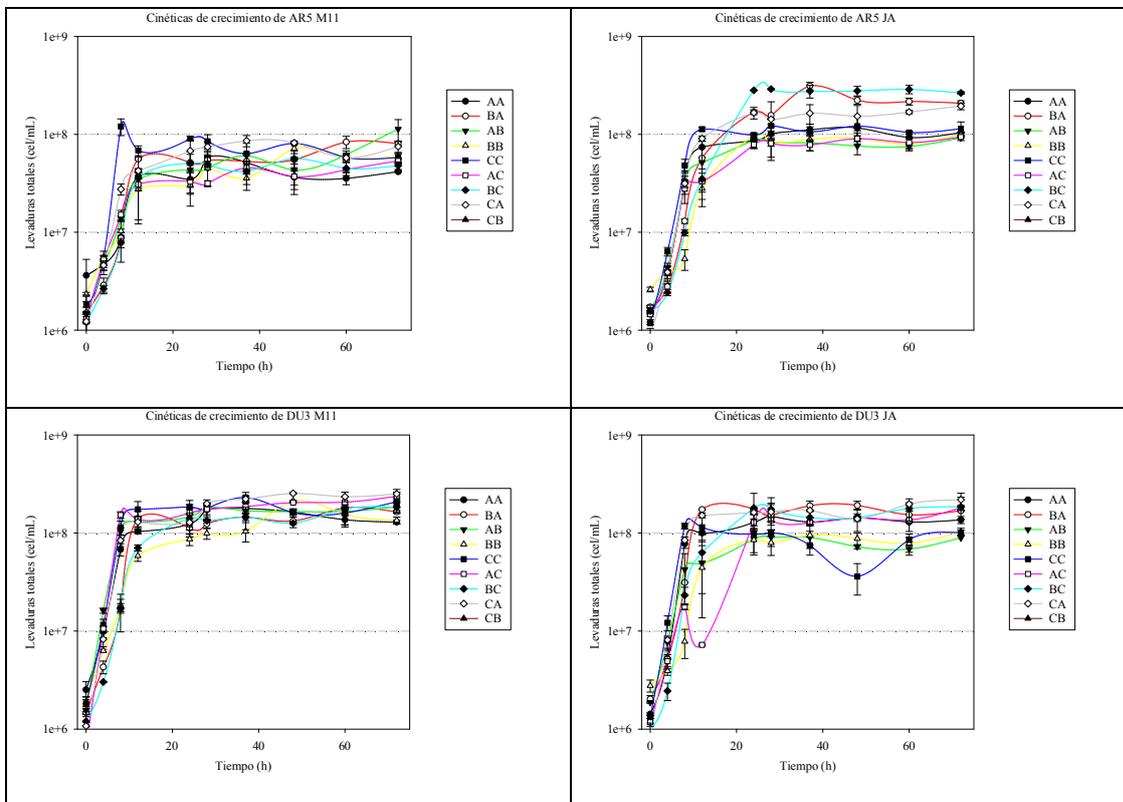
La levadura GRO3 (*P. kluyveri*) en medio M11 muestra un crecimiento alto en comparación con las demás levaduras, siendo afectada únicamente por la temperatura, teniendo que a temperatura alta de 35°C la población total de levaduras es menor. La temperatura entre 25 y 30°C favorece en crecimiento, observándose la más alta población de levaduras en esta temperatura, tanto en medio M11 como en JA. La agitación parece no tener efecto sobre el crecimiento (**Figura 7.2.1.**). Las velocidades de crecimiento coinciden con la temperatura y agitación donde se obtuvieron las poblaciones máximas (**Tabla 7.2.3.**).

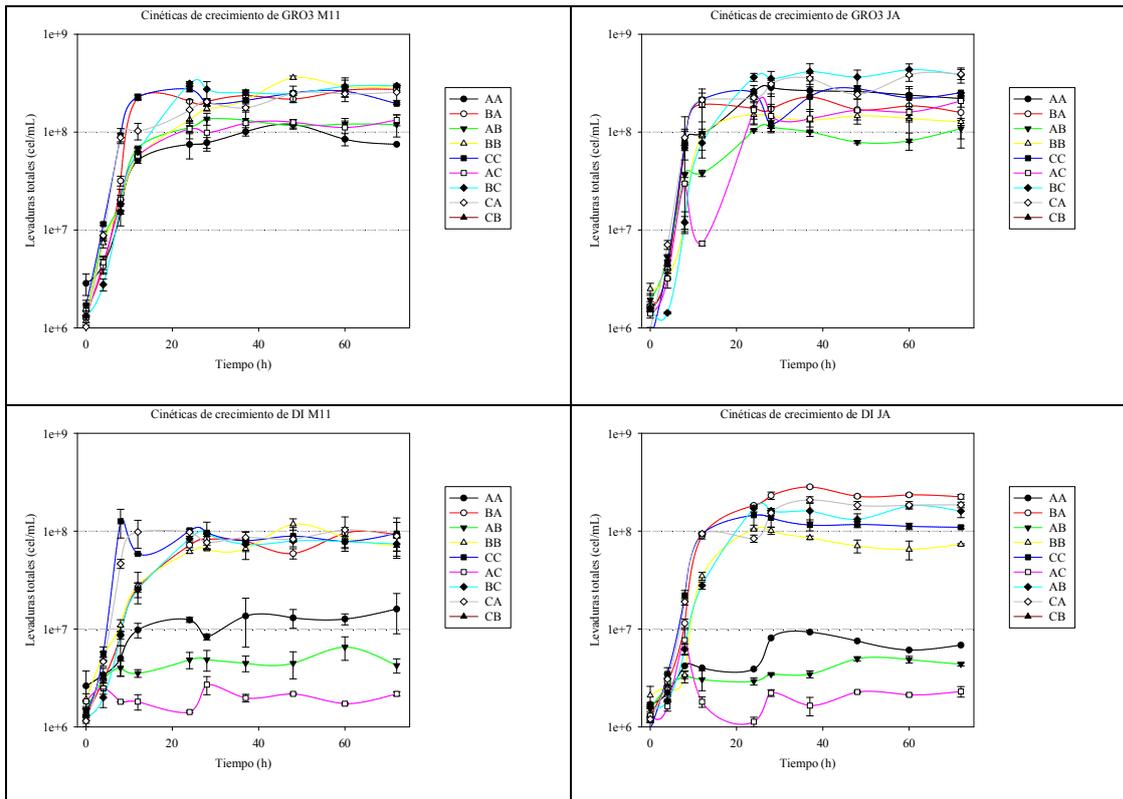
Finalmente el crecimiento de la cepa DI (*T. delbrueckii*) fue el más afectado por efecto tanto de la temperatura como de la agitación (**Figura 7.2.1.**) observando un crecimiento prácticamente nulo a temperatura de 35°C y una agitación de 150 rpm (AC). Esta cepa en particular

mostro ser la menos robusta comparada con las demás no-*Saccharomyces* estudiadas, a pesar de ser genéticamente la cepa más parecida a *S. cerevisiae*. Las velocidades de crecimiento son las más bajas en comparación con las demás cepas estudiadas, teniendo el mejor desempeño a 30°C y siendo afectada tanto al subir como al bajar la temperatura (**Tabla 7.2.3**).

El crecimiento de cada una de las levaduras estudiadas es diferente en cada medio y las reacciones a los cambios de temperatura y agitación son muy distintos, lo que hace suponer que las cepas de levaduras pudieron tener una adaptación de manera natural al jugo de *Agave*, puesto que se observa en su desempeño al crecer de una mejor manera en JA en comparación a los crecimientos obtenidos en medio M11.

**Figura 7.2.1.** Cinéticas de crecimiento de las cepas AR5 (*S. cerevisiae*), DU3 (*K. marxianus*), GRO3 (*P. kluyveri*), DI (*T. delbrueckii*) en medio M11 y JA.





**Tabla 7.2.3.** Velocidades máximas de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) de las cepas AR5 (*S. cerevisiae*), DU3 (*K. marxianus*), GRO3 (*P. kluyveri*) y DI (*T. delbrueckii*) en medio M11 y JA.

AR5	M11			JA		
	250 rpm	175 rpm	100 rpm	250 rpm	175 rpm	100 rpm
35°C	0.19±0.07	0.35±0.03	0.28±0.03	0.31±0.14	0.27 ±0.01	0.33±0.11
30°C	0.38±0.03	0.53±0.01	0.35±0.06	0.44±0.03	0.46±0.02	0.40±0.00
25°C	0.18±0.04	0.29±0.02	0.20±0.01	0.26±0.09	0.23±0.00	0.19 ±0.02

DU3	M11			JA		
	250 rpm	175 rpm	100 rpm	250 rpm	175 rpm	100 rpm
35°C	0.37±0.01	0.68 ±0.02	0.56±0.02	0.38±0.07	0.18 ±0.00	0.29±0.10
30°C	0.51±0.01	0.47±0.04	0.51±0.00	0.57±0.00	0.56±0.00	0.51±0.01
25°C	0.32±0.05	0.28±0.05	0.29 ±0.01	0.38±0.00	0.37±0.01	0.16 ±0.06

GRO3	M11			JA		
	250 rpm	175 rpm	100 rpm	250 rpm	175 rpm	100 rpm
35°C	0.25±0.02	0.34 ±0.05	0.34±0.00	0.38±0.00	0.19 ±0.00	0.27±0.02
30°C	0.54±0.00	0.50±0.01	0.46±0.10	0.49±0.04	0.55±0.09	0.56±0.01
25°C	0.43±0.01	0.25±0.01	0.19 ±0.01	0.56±0.10	0.25±0.01	0.27±0.05

DI	M11			JA		
	250 rpm	175 rpm	100 rpm	250 rpm	175 rpm	100 rpm
35°C	0.11±0.02	0.22 ±0.02	0.18±0.01	0.08±0.002	0.22 ±0.02	0.13±0.09
30°C	0.46±0.03	0.44±0.13	0.47±0.01	0.23±0.09	0.29±0.02	0.36±0.00
25°C	0.26±0.01	0.26±0.01	0.21 ±0.02	0.35±0.01	0.21±0.01	0.22 ±0.03

Unidades de velocidad máxima de crecimiento expresadas en  $h^{-1}$ .

### 7.2.3.2. Consumo de azúcar, cinéticas y velocidades de consumo de azúcar.

Las cinéticas de consumo de azúcar de AR5 (*S. cerevisiae*) en medio M11 presentan diferencias en la velocidad y la concentración de azúcar final (**Figura 7.2.2.**). El medio JA se observan diferencias en la velocidad de consumo de azúcar; siendo mayores en medio JA en comparación a las obtenidas en medio M11 (**Tabla 7.2.4.**) y a las 60 horas de fermentación el consumo de azúcar es casi total para todas las condiciones estudiadas en JA.

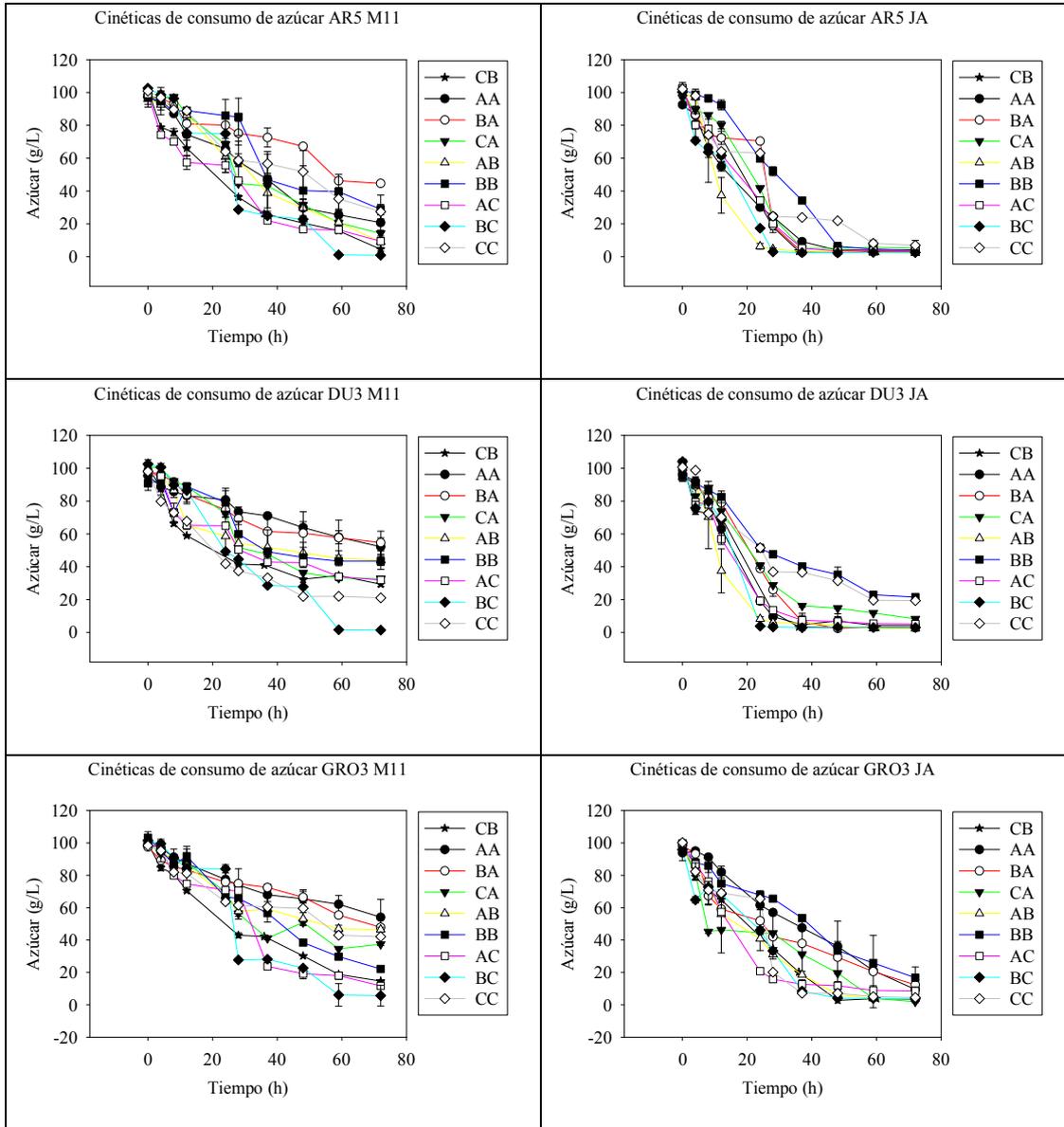
La cepa DU3 (*K. marxianus*) presenta cinéticas de consumo de azúcar con diferentes velocidades por efecto de la temperatura y la agitación, al igual como se observa con la cepa AR5 (*S. cerevisiae*) en medio M11. Las cinéticas en medio JA presenta un consumo casi total, excepto las fermentaciones BB (25°C/100 rpm) CC (30°C/175rpm) donde se observa una concentración de azúcar residual de 20 g/L a las 72h (**Figura 7.2.2.**).

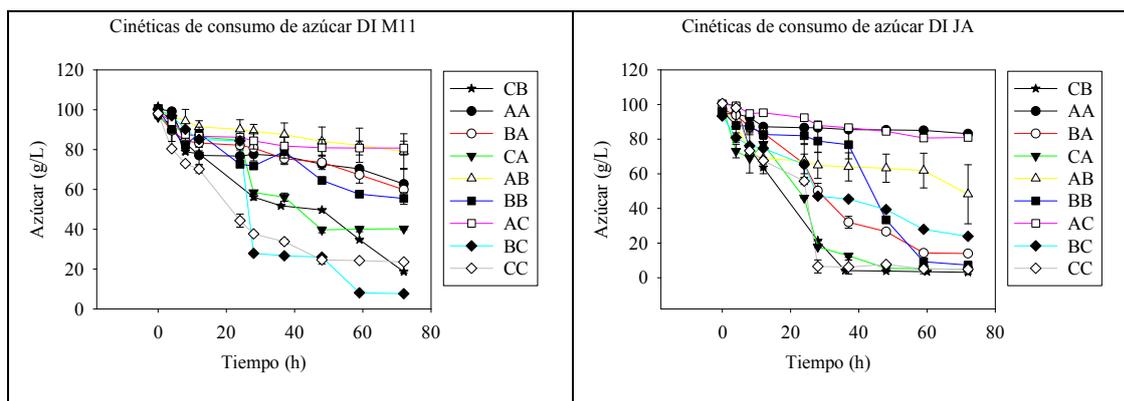
Las cinéticas de consumo de azúcar que presenta la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) tienen un comportamiento similar al observado con la cepa AR5 (*S. cerevisiae*) donde en medio M11 las velocidades de consumo de azúcar (**Tabla 7.2.4.**) son más lentas y las concentraciones de azúcar residual son altas, por otro lado en medio JA se observa que el consumo de azúcar es mayor en comparación con el observado en medio M11 pero no en todas las fermentaciones las levaduras logran consumir todo el azúcar a las 72 h (**Figura 7.2.2.**).

La cepa DI (*T. delbrueckii*) al igual que como se observo en el crecimiento, las cinéticas de consumo de azúcar son afectadas tanto por la agitación como por la temperatura, siendo la temperatura alta lo que más afecta el consumo (**Figura 7.2.2.**), ligado a un nulo crecimiento (**Figura 7.2.1.**). Las velocidades de consumo de azúcar (**Tabla 7.2.4.**) son las más bajas en comparación con las demás cepas de levaduras analizadas en este trabajo, observándose nuevamente que en medio JA las velocidades son más rápidas que las obtenidas en medio M11.

El consumo de azúcar de las levaduras corresponde al crecimiento observado, teniendo que en medio M11 es donde se observan concentraciones altas de azúcar residual, mientras que en medio JA el consumo de azúcar fue mayor.

**Figura 7.2.2.** Cinéticas de consumo de azúcar de las cepas de levaduras AR5 (*S. cerevisiae*), DU3 (*K. marxianus*), GRO3 (*P. kluyveri*) y DI (*T. delbrueckii*) en medio M11 y JA.





**Tabla 7.2.4.** Velocidades de consumo de azúcar de las cepas AR5 (*S. cerevisiae*), DU3 (*K. marxianus*), GRO3 (*P. kluyveri*) y DI (*T. delbrueckii*) en medio M11 y JA.

T°C	Agitación		M11 AR5	M11 DU3	M11 GRO3	M11 DI
35	250	AA	0.0216 ± 0.0015	0.0079 ± 0.0009	0.0087 ± 0.0021	0.0056 ± 0.0009
35	175	AC	0.0308 ± 0.0009	0.0182 ± 0.0010	0.0266 ± 0.0014	0.0025 ± 0.0008
35	100	AB	0.0249 ± 0.0005	0.0144 ± 0.0040	0.0133 ± 0.0028	0.0030 ± 0.0011
30	250	CA	0.0250 ± 0.0006	0.0198 ± 0.0006	0.0171 ± 0.0006	0.0147 ± 0.0004
30	175	CC	0.0173 ± 0.0034	0.0284 ± 0.0008	0.0134 ± 0.0005	0.0266 ± 0.0006
30	100	CB	0.0350 ± 0.0018	0.0208 ± 0.0005	0.0261 ± 0.0004	0.0185 ± 0.0004
25	250	BA	0.0103 ± 0.0009	0.0096 ± 0.0035	0.0085 ± 0.0005	0.0055 ± 0.0006
25	175	BC	0.0350 ± 0.0004	0.0343 ± 0.0004	0.0319 ± 0.0020	0.0307 ± 0.0003
25	100	BB	0.0160 ± 0.0042	0.0131 ± 0.0008	0.0194 ± 0.0005	0.0077 ± 0.0001

T°C	Agitación		JA AR5	JA DU3	JA GRO3	JA DI
35	250	AA	0.0510 ± 0.0021	0.0585 ± 0.0011	0.0230 ± 0.0014	0.0017 ± 0.0000
35	175	AC	0.0528 ± 0.0000	0.0590 ± 0.0035	0.0544 ± 0.0028	0.0032 ± 0.0002
35	100	AB	0.0811 ± 0.0025	0.0764 ± 0.0147	0.0442 ± 0.0063	0.0079 ± 0.0040
30	250	CA	0.0450 ± 0.0005	0.0389 ± 0.0013	0.0346 ± 0.0001	0.0440 ± 0.0003
30	175	CC	0.0366 ± 0.0011	0.0279 ± 0.0004	0.0419 ± 0.0004	0.0492 ± 0.0034
30	100	CB	0.0544 ± 0.0001	0.0676 ± 0.0011	0.0442 ± 0.0006	0.0550 ± 0.0004
25	250	BA	0.0536 ± 0.0025	0.0461 ± 0.0024	0.0290 ± 0.0159	0.0269 ± 0.0015
25	175	BC	0.0674 ± 0.0028	0.0686 ± 0.0065	0.0410 ± 0.0001	0.0187 ± 0.0004
25	100	BB	0.0332 ± 0.0004	0.0235 ± 0.0007	0.0196 ± 0.0006	0.0192 ± 0.0010

Cabe señalar que en medio M11 el crecimiento de la levaduras se detiene antes de que el azúcar se haya terminado, por lo que debe de existir un problema de falta de algún nutriente, puesto que en el medio de jugo de *Agave* si se logra consumir el azúcar.

Con los resultados de la concentración final de levaduras se llevo a cabo el estudio de superficie de respuesta, con lo que se obtuvo el gráfico correspondiente de cada cepa, donde se pueden observar las zonas de mayor crecimiento controlando la temperatura y la agitación. La

interpretación de los gráficos nos permite determinar las condiciones de temperatura y agitación óptimas para favorecer el crecimiento y lograr tener la concentración máxima de células en una fermentación.

Las poblaciones máximas alcanzadas con la cepa AR5 (*S. cerevisiae*) en medio M11 presenta poblaciones finales similares, mientras que en medio JA la población máxima se registró a una temperatura baja de 25°C y agitación de 175 rpm (**Figura 7.2.3.**).

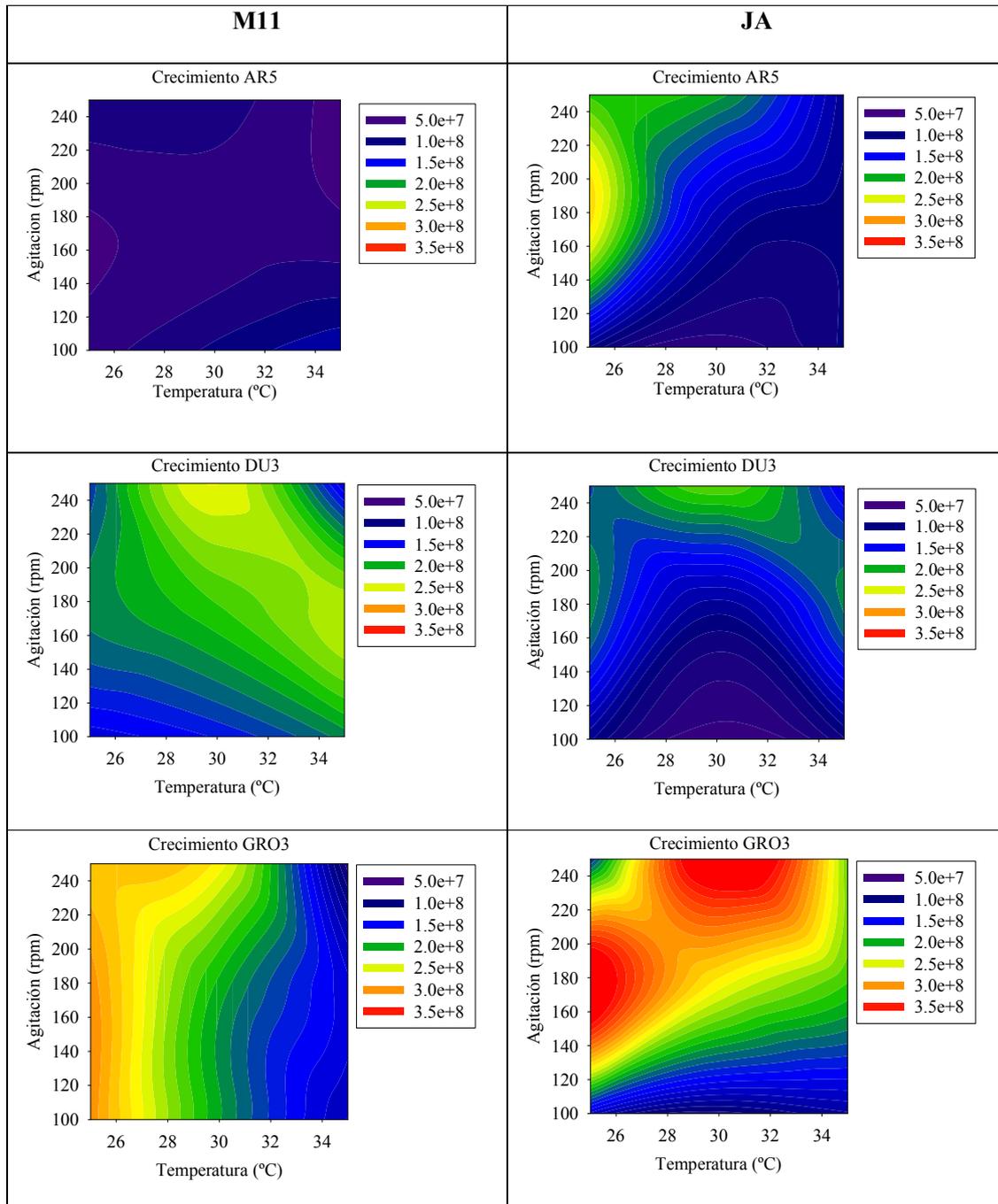
La cepa de levadura DU3 (*K. marxianus*) presentó un máximo de crecimiento a 30°C y 250 rpm, siendo mayor en medio M11 que en medio JA. Se observó un efecto por la agitación, teniendo que a mayor agitación fue mejor el crecimiento (**Figura 7.2.3.**).

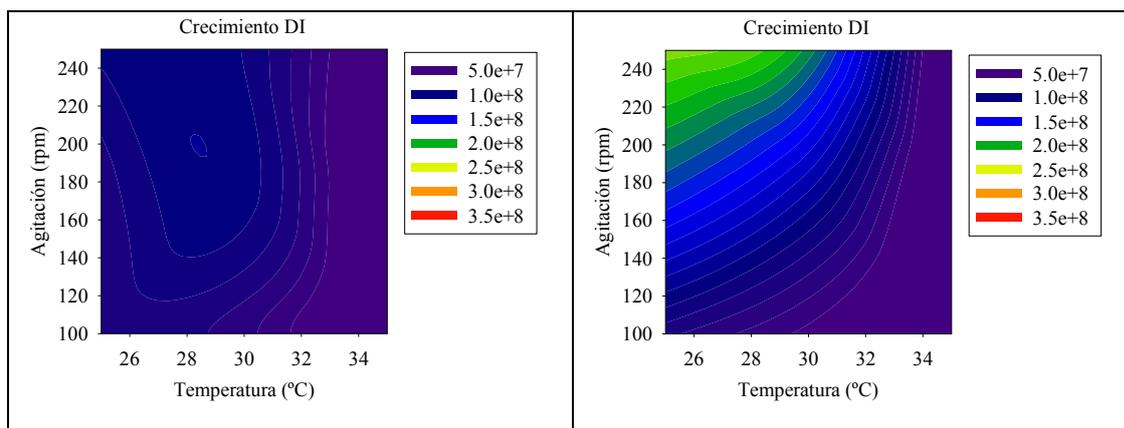
La población total de levaduras de la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) fue la cepa que presentó el valor más alto, observándose claramente un efecto por la temperatura en medio M11, siendo afectada por la temperatura alta y favorecida por la temperatura baja. Sin tener efecto en la concentración de células por la velocidad de agitación del medio de fermentación. Por otro lado en medio JA la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) presenta concentraciones celulares variadas en las diferentes condiciones analizadas, observado que el crecimiento aumenta conforme aumenta la velocidad de agitación y cambios menores por efecto de la temperatura (**Figura 7.2.3.**).

Finalmente la cepa DI (*T. delbrueckii*) mostro las poblaciones de levaduras más bajas por efecto de la temperatura, teniendo un crecimiento casi nulo a temperatura alta de 35°C. La agitación favorece el crecimiento de la cepa DI (*T. delbrueckii*) presentando un crecimiento mayor conforme aumenta la agitación, sin embargo en la grafica este efecto solo se aprecia en el medio JA (**Figura 7.2.3.**).

La concentración final de levaduras observada demuestra la capacidad de las levaduras para desarrollarse en cada medio, siendo mayor en medio JA que la concentración obtenida en medio M11. Si bien el objetivo final de la fermentación es la producción de etanol, teniendo una concentración mayor de células se produce una mayor concentración de etanol. Aunque no hay que olvidar que la cantidad de glucosa que se utiliza para el crecimiento celular disminuye la cantidad que puede llegar a transformarse en etanol.

**Figura 7.2.3.** Gráficos de superficie de respuesta de las concentraciones de población de levaduras a las 72 horas de incubación con las cepas AR5 (*S. cerevisiae*), DU3 (*K. marxianus*), GRO3 (*P. kluyveri*) y DI (*T. delbrueckii*) en medio M11 y JA.





Del mismo modo que con los resultados de las poblaciones de levaduras, se realizó un estudio de superficie de respuesta con los resultados de las concentraciones residuales de azúcar, para determinar las condiciones de temperatura y agitación que nos permitan el máximo consumo de azúcar y de esta manera tener la menor pérdida de sustrato a nivel industrial.

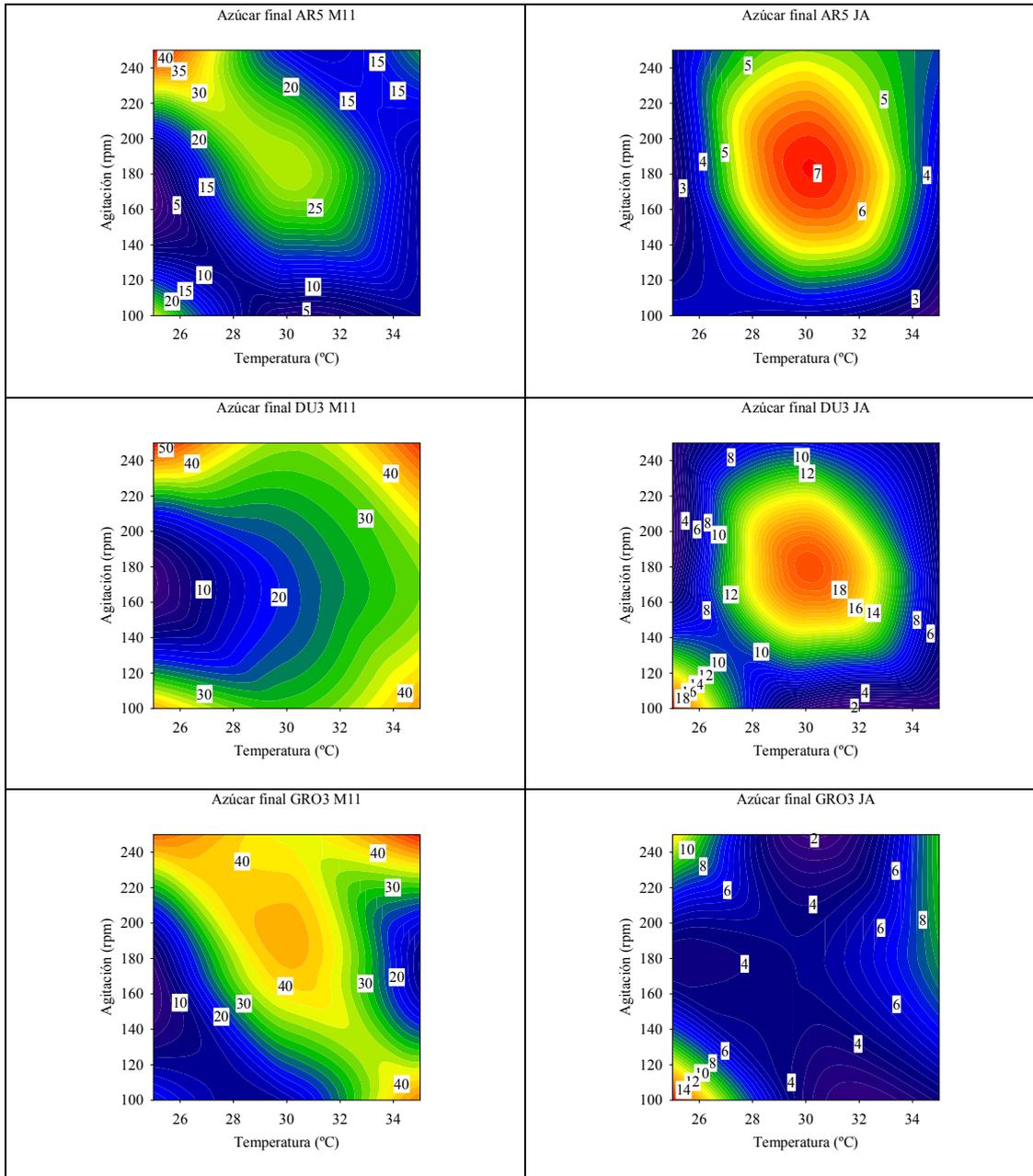
La concentración de azúcar residual observada en medio M11 es mayor que la obtenida en medio JA. Para cada uno de los medios y de las cepas de levaduras el comportamiento fue diferente, encontrando que para AR5 (*S. cerevisiae*) la temperatura alta y agitación baja en medio M11 fue donde la concentración final de azúcar fue mayor, mientras que con agitación baja y temperatura de 30°C fue donde consumió todo el azúcar (**Figura 7.2.4.**). En medio JA la concentración final de azúcar fue baja en todas las condiciones, teniendo un mayor consumo con temperaturas y agitación baja.

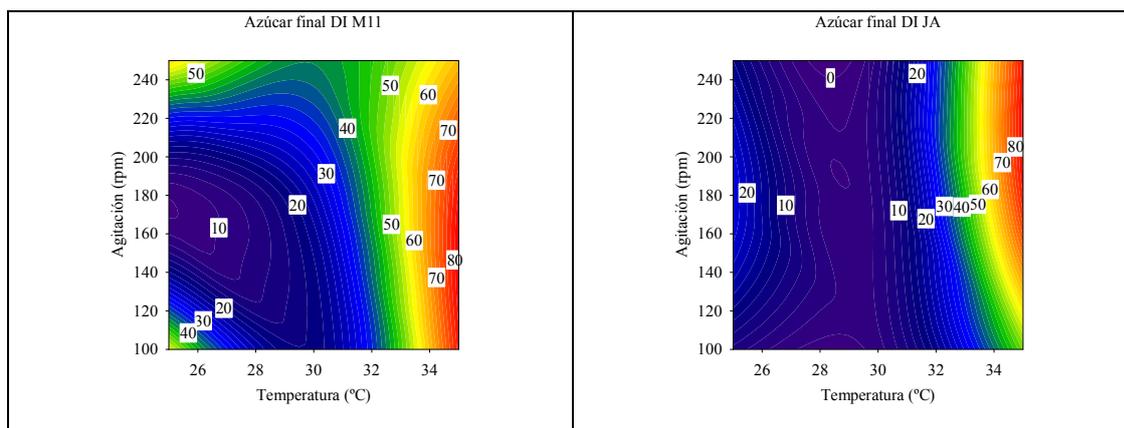
La cepa DU3 (*K. marxianus*) en medio M11 muestra un óptimo de consumo de azúcar a 25°C y 175 rpm, mientras que en medio JA se observa un mayor consumo de azúcar a temperatura y agitación alta (**Figura 7.2.4.**).

El consumo de azúcar mostrado por la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) en medio M11 muestra que es mejor a temperatura y agitación baja. Mientras que en medio JA tiene un consumo de azúcar casi total en casi cualquier condición estudiada, teniendo un óptimo de 30°C y 175 rpm, viéndose ligeramente afectado por temperatura y agitación bajas (**Figura 7.2.4.**).

La cepa de levadura DI (*T. delbrueckii*) muestra las concentraciones más altas de azúcar residual en comparación con las demás levaduras estudiadas, lo que corresponde con los crecimientos observados. La temperatura alta afecta de manera significativa tanto el crecimiento como el consumo de azúcar de la levadura DI (*T. delbrueckii*) tanto en medio M11 como en medio JA. Siendo la temperatura el principal factor que afecta el consumo de azúcar debido a que no se observa un efecto por la agitación (**Figura 7.2.4.**).

**Figura 7.2.4.** Concentración de azúcar residual (g/L) a las 72h de incubación con las cepas AR5 (*S. cerevisiae*), DU3 (*K. marxianus*), GRO3 (*P. kluyveri*) y DI (*T. delbrueckii*) en medio M11 y JA.





### 7.2.3.3. Concentración final de etanol producido y rendimiento de etanol respecto al consumo de azúcar.

La concentración final de etanol es la principal variable que se tiene en cuenta en una fermentación alcohólica, debido a que es el principal objetivo del proceso.

La agitación tiene el efecto más fuerte en la producción de etanol que el observado por la temperatura con la cepa AR5 (*S. cerevisiae*), tanto en medio M11 como en medio JA, observando un óptimo de producción con una agitación de 100 rpm y 30°C. Si bien el óptimo de producción de etanol se localiza en las mismas condiciones en ambos medios, la concentración más alta producida fue en medio M11 (**Figura 7.2.5.**).

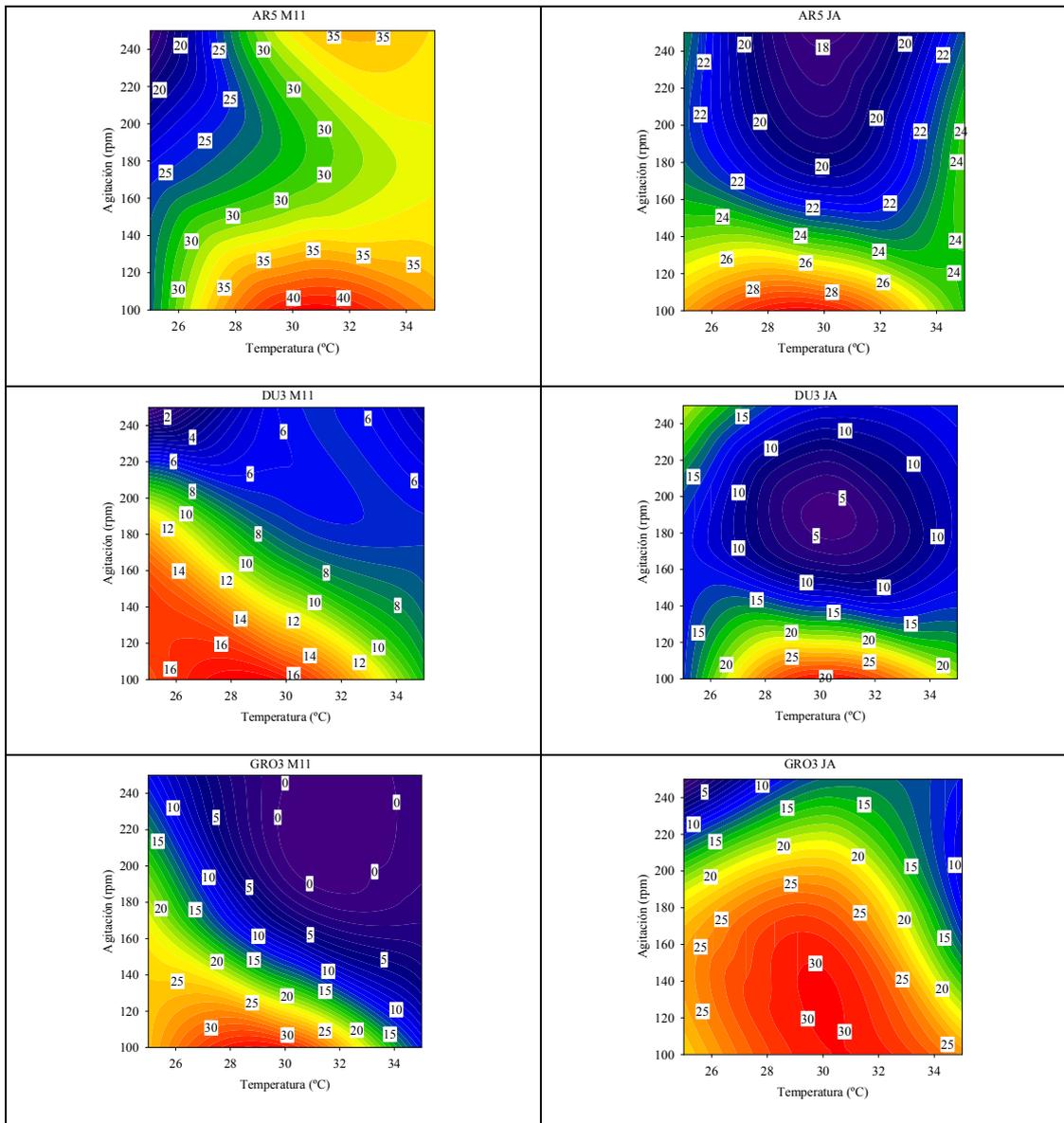
La cepa de levadura DU3 (*K. marxianus*) muestra un óptimo de producción de etanol igual que el observado por AR5 (*S. cerevisiae*), mostrando nuevamente que la agitación es el principal factor que afecta la producción de etanol, pero en este caso es en medio JA donde se observa la concentración máxima de producción de etanol (**Figura 7.2.5.**).

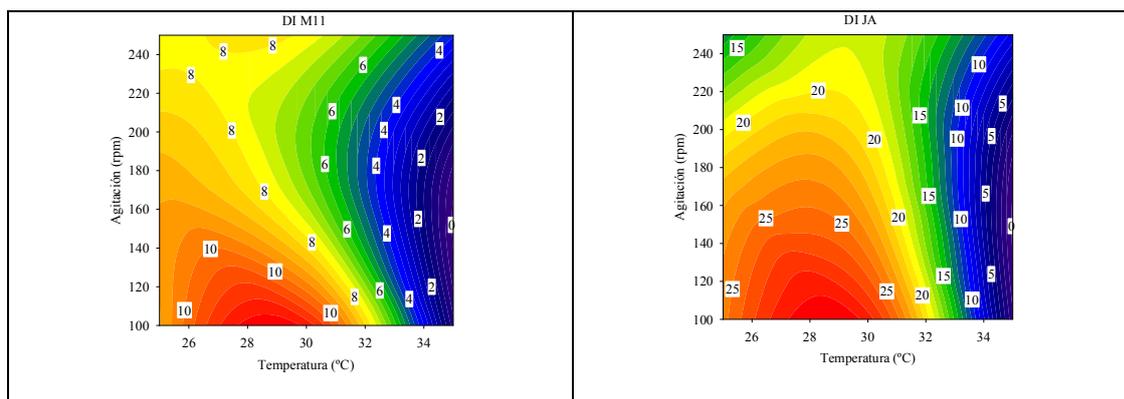
Las concentraciones finales de etanol observadas con la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) muestran que en medio M11 la agitación tiene un mayor efecto negativo, en comparación con el medio JA donde tolera más agitación produciendo una alta concentración de etanol (**Figura 7.2.5.**). Las condiciones óptimas de producción nuevamente son a 30°C y 100 rpm.

La cepa DI (*T. delbrueckii*) ha mostrado que el consumo de azúcar y el crecimiento no fueron los mejores comparados con las demás levaduras, nuevamente la producción de etanol es la más baja en comparación con las demás levaduras, pero las condiciones óptimas de producción de etanol son las mismas que para las otras 3 cepas de levaduras (30°C y 100 rpm). Tendiendo una concentración máxima de 10 g/L en medio M11 y 25 g/L en medio JA (**Figura 7.2.5.**).

La agitación alta favorece un óptimo crecimiento, por lo que el azúcar consumido se utiliza para el crecimiento desarrollando biomasa, mientras que una agitación baja disminuye la transferencia de oxígeno, teniendo un medio más anaerobio y por tanto se favorece la vía bioquímica para la producción de etanol. Todas las cepas de levaduras estudiadas en este trabajo muestran que el óptimo de producción de etanol está a 30°C y 100 rpm.

**Figura 7.2.5.** Concentración final de etanol producida (g/L) a las 72h de incubación con las cepas AR5 (*S. cerevisiae*), DU3 (*K. marxianus*), GRO3 (*P. kluyveri*) y DI (*T. delbrueckii*) en medio M11 y JA.





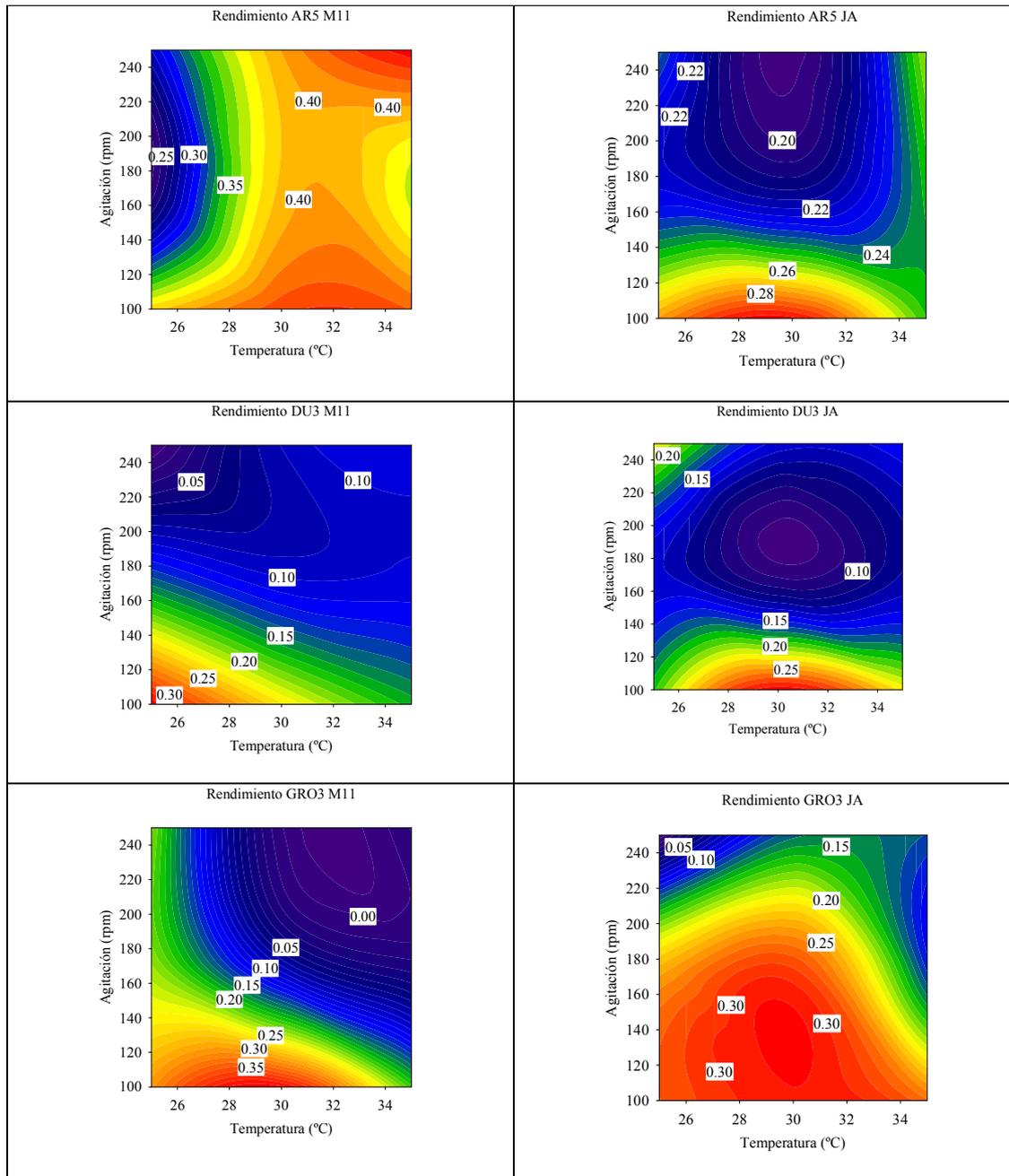
El rendimiento de etanol más alto respecto al consumo de azúcar, corresponde a la concentración más alta de etanol producida en muchos casos, debido a que se encuentra en agitación baja de 100 rpm, donde el consumo de azúcar no es desviado para la producción de biomasa. A nivel industrial es deseado que una levadura crezca lo suficiente para tener una buena concentración de células para que produzcan etanol, pero que el azúcar consumido no sea utilizado solo para generar biomasa, por lo que, una buena cepa productora de etanol es aquella que es capaz de producir una alta concentración de manera individual.

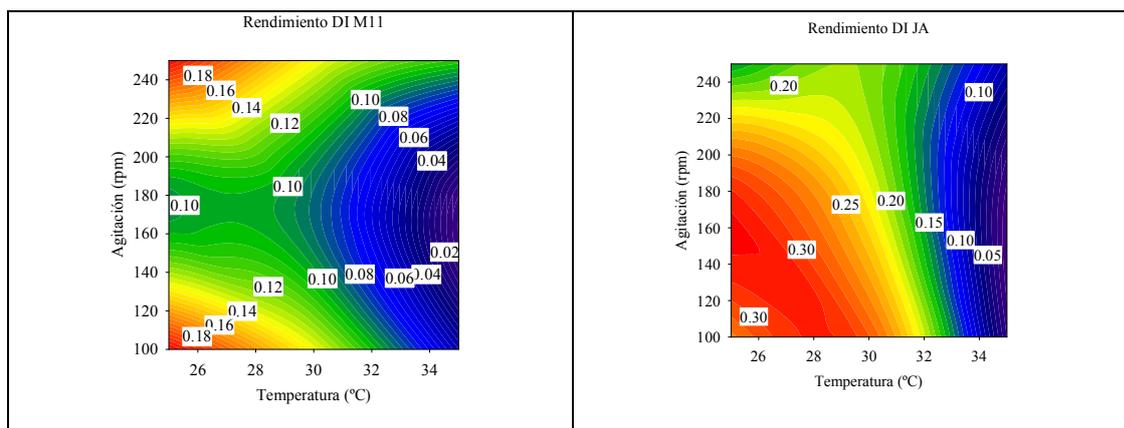
Existen 2 casos donde se produce una alta concentración de etanol, una de ellas es por alta concentración de células, donde la suma total del etanol producido por cada célula es alta. O bien donde cada célula es capaz de producir una alta concentración de etanol, por lo que, con poca biomasa se puede producir una alta concentración de etanol. La segunda opción es la más deseada industrialmente, los rendimientos de producción de etanol por célula son mayores y la cantidad de glucosa que se destina para el crecimiento es menor, aprovechando el resto para la producción de etanol.

Teóricamente el rendimiento más alto que se puede obtener es de 0.51 g etanol/g glucosa, que es la relación máxima de etanol que se produce por cada molécula de glucosa. La cepa AR5 (*S. cerevisiae*) en medio M11 mostro un rendimiento máximo de 0.40 siendo el más alto que se obtuvo con las diferentes cepas de levaduras.

Si bien no se logró llegar a obtener un rendimiento igual al teórico, nuestra cepa control mostro un valor de 0.40, por lo que con este experimento se pretendía determinar las condiciones de agitación y temperatura óptimas para realizar la fermentación de manera que una cepa no-*Saccharomyces* pueda producir la misma concentración de etanol, como lo hace la levadura *S. cerevisiae*, que es la que actualmente presenta los mayores rendimientos. Con los resultados obtenidos se observa que las cepas no-*Saccharomyces* no logran llegar al 0.40 de rendimiento de etanol respecto al consumo de sustrato, pero incluso AR5 (*S. cerevisiae*), se ve afectado su rendimiento por las variaciones de temperatura y agitación. Además no son los únicos factores para lograr que las cepas no-*Saccharomyces* lleguen a producir las mismas concentraciones que actualmente *S. cerevisiae* produce.

**Figura 7.2.6.** Rendimiento de la producción de etanol respecto al consumo de azúcar ( $Y_{p/s}$ ) a las 72h de incubación con las cepas AR5 (*S. cerevisiae*), DU3 (*K. marxianus*), GRO3 (*P. kluyveri*) y DI (*T. delbrueckii*) en medio M11 y JA.





#### 7.2.3.4. Concentración de la producción de esterés.

El acetato de etilo es un éster que se produce durante la fermentación en concentración superior comparado con los demás esterés. Debido a esto en la fermentación de JA para la producción de tequila a nivel industrial se relaciona la concentración de acetato de etilo con la producción de esterés totales. La cepa AR5 (*S. cerevisiae*) mostro un máximo de producción de 25 mg/L a temperatura y agitación baja en medio M11 mientras que en medio JA fue de 80 mg/L a temperatura baja pero agitación de 175 rpm (**Figura 7.2.7.**).

La cepa DU3 (*K. marxianus*) muestra una alta producción de esterés a temperatura baja y agitación media en medio M11. Pero es mejor en medio JA a 30 °C y 175 rpm donde se logró una producción de 1000 mg/L de acetato de etilo, en comparación con los 80 mg/L que fue el máximo de AR5 (*S. cerevisiae*) (**Figura 7.2.7.**).

La mayor producción de esterés fue obtenida con la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) en medio M11 a temperatura de 25°C y agitación de 175 rpm donde alcanzo una producción de 2000 mg/L. mientras que en medio JA se observa un máximo de 700 mg/L en condiciones extremas siendo temperatura y agitación bajas o altas (**Figura 7.2.7.**).

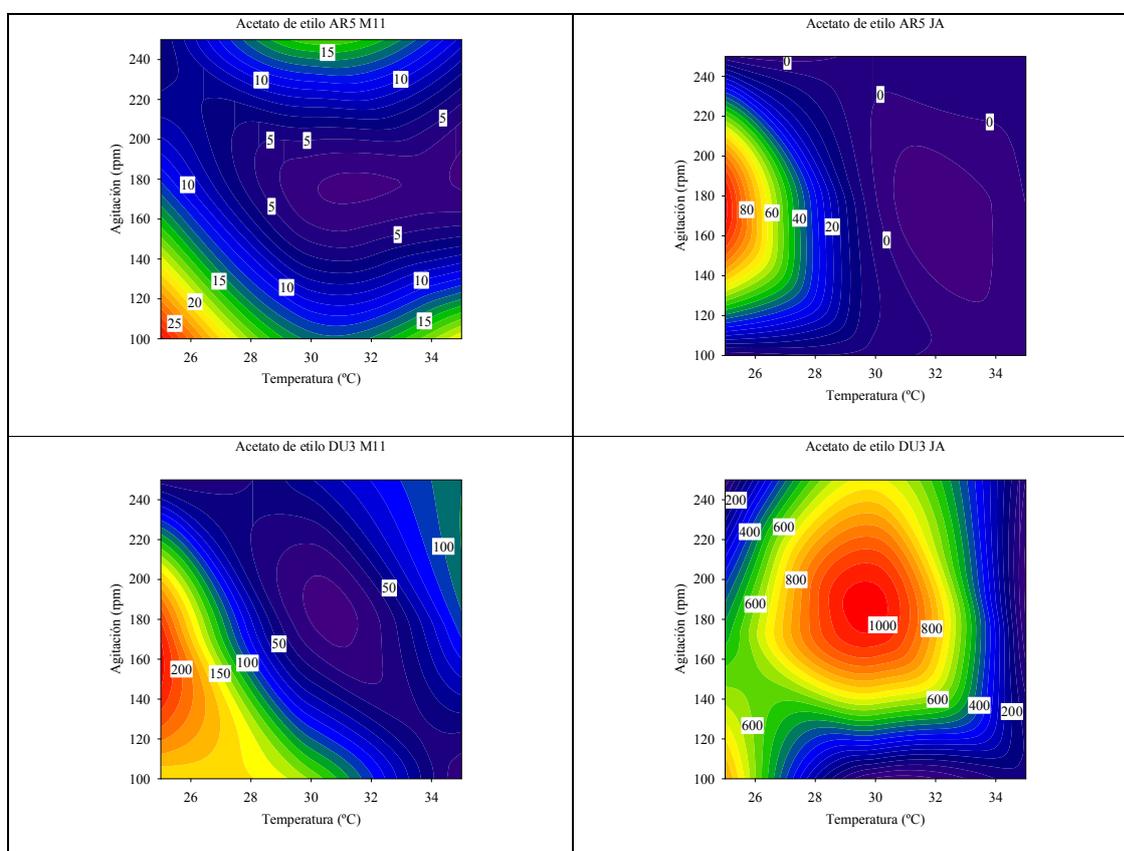
Finalmente la producción de acetato de etilo por la cepa DI (*T. delbrueckii*) es prácticamente nula a excepción de temperatura baja y agitación baja en medio M11 donde se produjo un máximo de 20 mg/L y por otro lado en medio JA se observa una producción de 200 mg/L en temperatura y agitación alta.

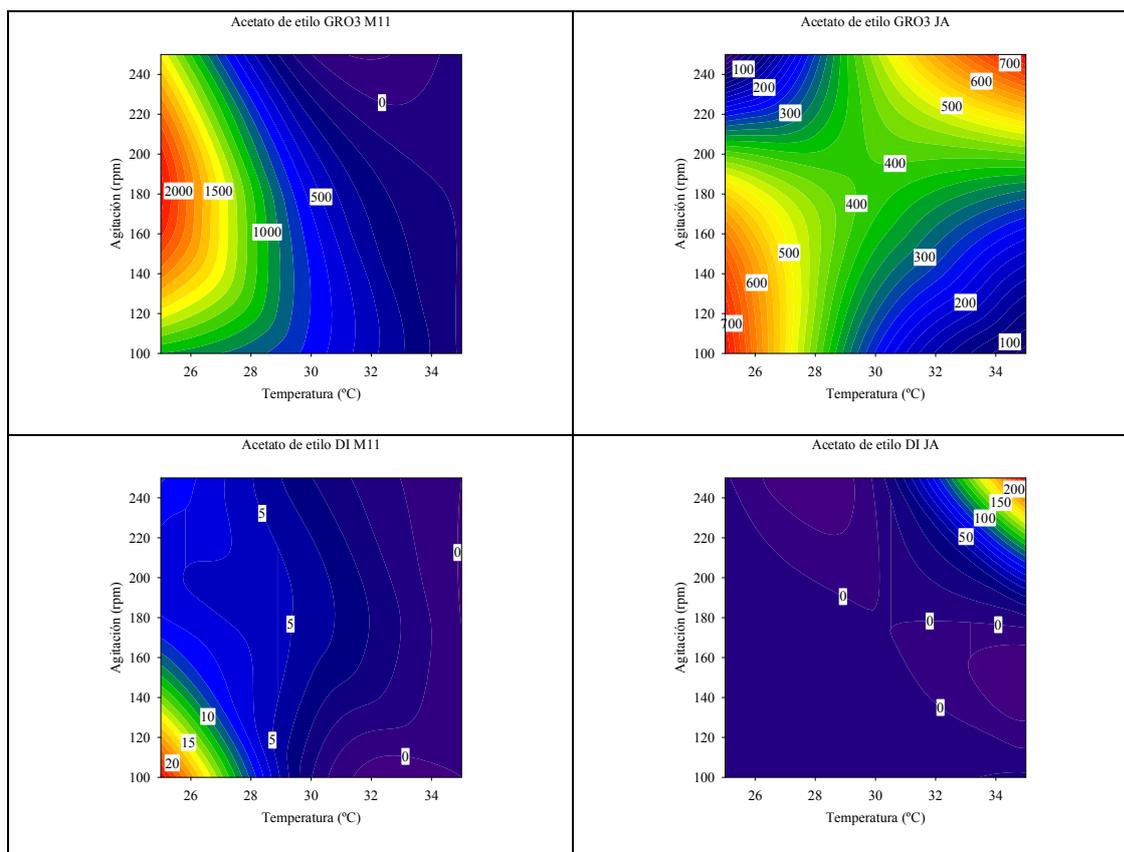
Los esterés son producidos como respuesta al estrés, se ha visto que las temperaturas bajas alrededor de 20 °C favorecen la producción de esterés. En este trabajo se observa ese efecto solo en medio M11, puesto que en medio JA los máximos de producción dependen de cada una de las cepas. También ha sido reportado que la aerobiosis favorece la producción de ésteres, en nuestro caso la agitación alta parece no tener un efecto positivo sobre la producción de ésteres. Otros investigadores asocian una mayor concentración de ésteres a temperatura baja asociado a la baja volatilidad del compuesto en esta temperatura, por lo que, a temperatura alta se volatiliza mayor concentración de ésteres y por tanto la concentración final será menor. Las cepas no-*Saccharomyces*

muestran producciones superiores a las observadas con AR5 (*S. cerevisiae*), destacando la cepa de levadura GRO3 (*P. kluyveri*).

En general se observa una tendencia a una mayor producción de esteres a temperaturas bajas, lo que coincide con la bibliografía. Pero si bien, el objetivo final es producir etanol, este no se ve favorecido a estas temperaturas, por lo que hay que realizar una valoración de la concentración de etanol perdida y la concentración de esteres ganada.

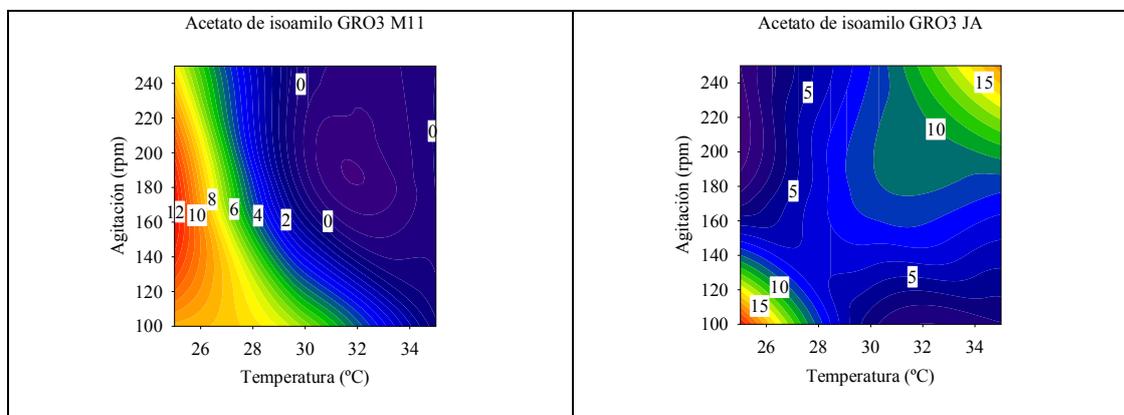
**Figura 7.2.7.** Concentración final de acetato de etilo producida (mg/L) a las 72h de incubación con las cepas AR5 (*S. cerevisiae*), DU3 (*K. marxianus*), GRO3 (*P. kluyveri*) y DI (*T. delbrueckii*) en medio M11 y JA.





El acetato de isoamilo fue producido solamente por la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) sin detectar producción por las demás cepas de levaduras. Al igual que el acetato de etilo, los máximos de producción de acetato de etilo corresponden a las mismas condiciones (**Figura 7.2.8.**). Lo que demuestra que el acetato de etilo es un buen indicador de las condiciones en las que los esteres de manera general pueden favorecerse. Por tanto es aceptable que se utilice como un indicador de la producción total de esteres.

**Figura 7.2.8.** Concentración final de acetato de isoamilo producida (mg/L) a las 72h de incubación con la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) en medio M11 y JA.



#### 7.2.3.5. Concentración de la producción de alcoholes superiores.

Los alcoholes superiores en concentraciones altas pueden llegar a ser tóxico para el consumo humano, pero deben de estar presentes para contribuir al aroma y sabor de la bebida. Por lo que es deseado que se produzcan pero no en concentraciones altas. De acuerdo a la norma la concentración de alcoholes superiores debe de ser entre 20 y 500 mg/100mL de alcohol anhidro. Utilizando como indicador el alcohol isoamilico, que es el que se produce en mayor concentración por la cepa de levadura *S. cerevisiae*.

En este trabajo se midieron las concentraciones de 1-propanol, isobutanol y alcoholes amílicos, como alcoholes superiores.

La cepa de levadura AR5 (*S. cerevisiae*) muestra un máximo de producción de 1-propanol a 30 °C, observándose un efecto en la producción por efecto de la temperatura y sin mostrar efecto por la agitación (**Figura 7.2.9.**).

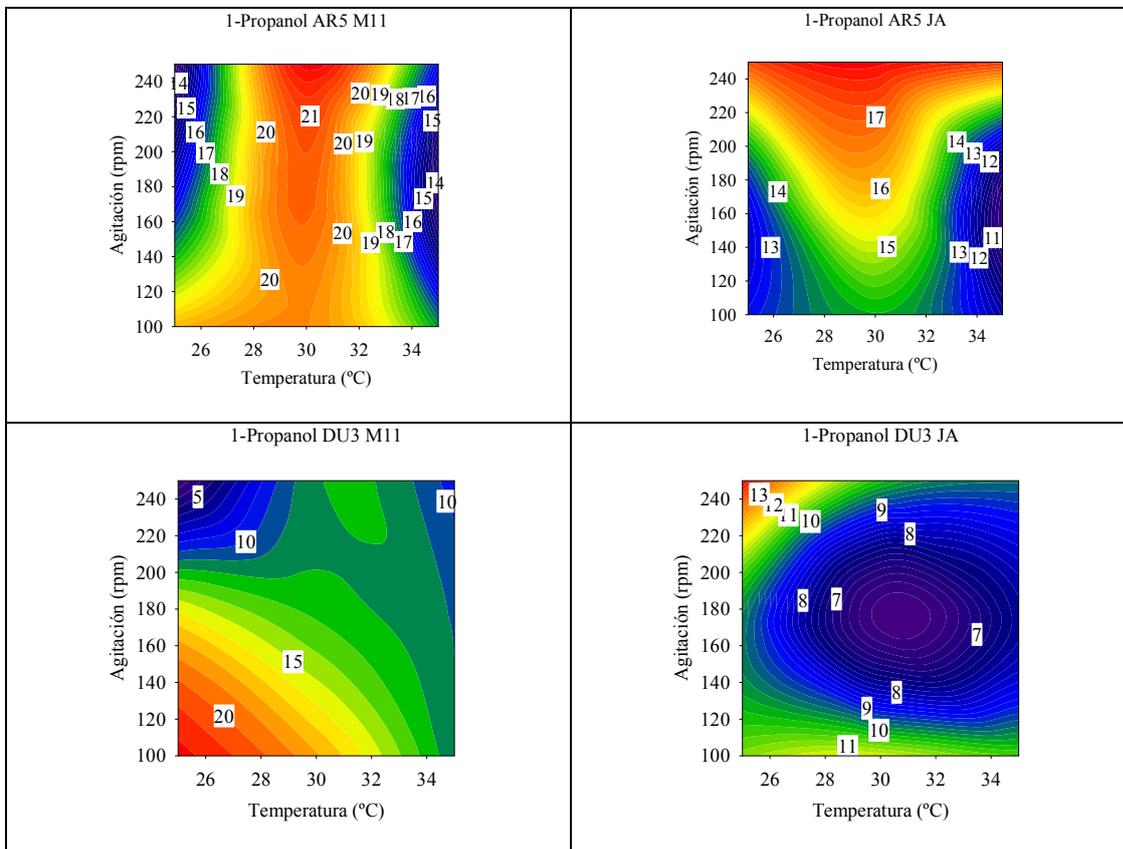
La concentración de 1-propanol producida por la cepa DU3 (*K. marxianus*) es similar a la producida por AR5 (*S. cerevisiae*), pero esta si se ve afectada tanto por los cambios de temperatura como de agitación en medio M11. Mientras en medio JA es la agitación la que afecta más la producción (**Figura 7.2.9.**).

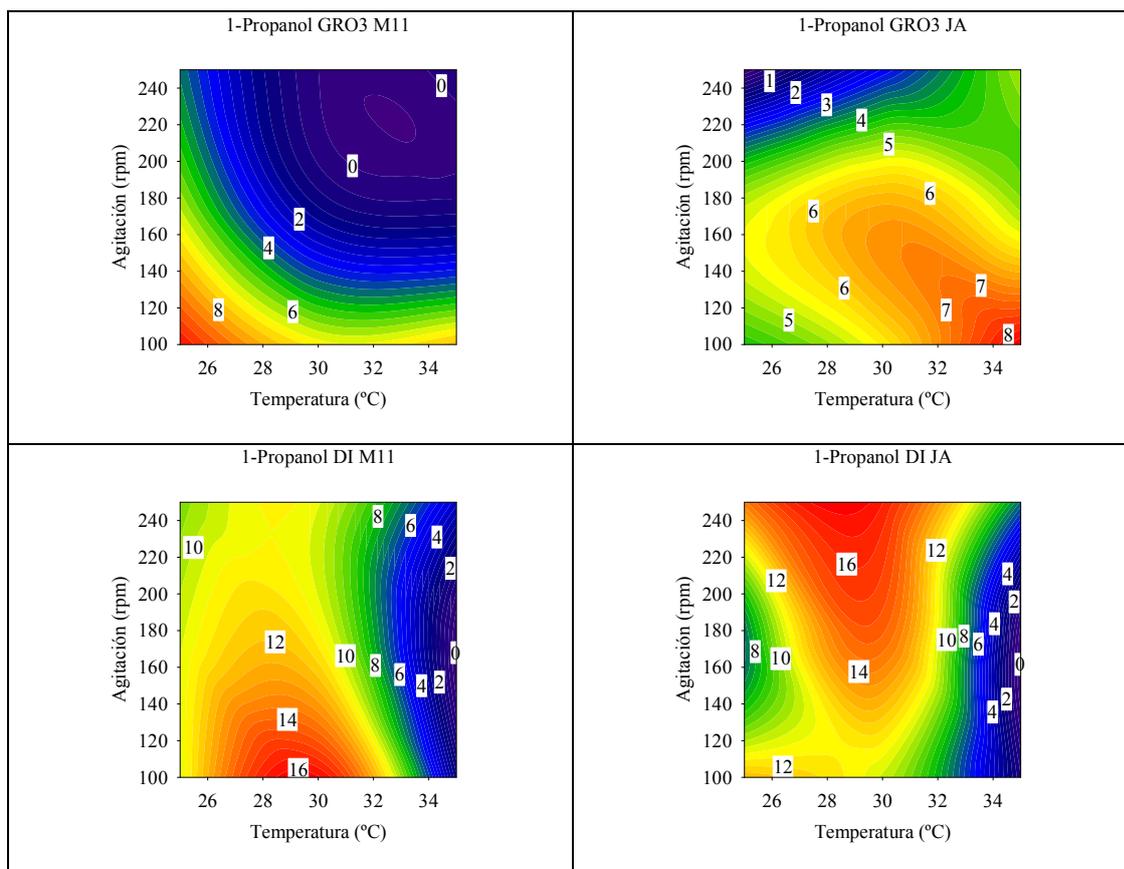
La cepa GRO3 (*P. kluyveri*) muestra la concentración de producción más baja de 1-propanol viéndose afectada en medio M11 tanto por la agitación como por la temperatura, sin detectar una producción en condiciones altas. Mientras que en medio JA la producción nula se observó con temperatura baja y agitación alta (**Figura 7.2.9.**).

La levadura DI (*T. delbrueckii*) mostró concentraciones muy similares a las obtenidas con AR5 (*S. cerevisiae*) observando el mismo efecto donde la temperatura es quien más afecta la producción, sin cambios por efecto de la agitación (**Figura 7.2.9.**).

La producción de 1-propanol no fue afectada por la temperatura y la agitación de manera significativa, por lo que no se observaron diferencias entre las concentraciones obtenidas de manera particular con cada cepa, las más grandes diferencias fueron observadas entre las cepas por lo que el principal factor que afecto la producción de este alcohol superior fue la cepa utilizada para realizar la fermentación.

**Figura 7.2.9.** Concentración final de 1-propanol producida (mg/L) a las 72h de incubación con las cepas AR5 (*S. cerevisiae*), DU3 (*K. marxianus*), GRO3 (*P. kluyveri*) y DI (*T. delbrueckii*) en medio M11 y JA.





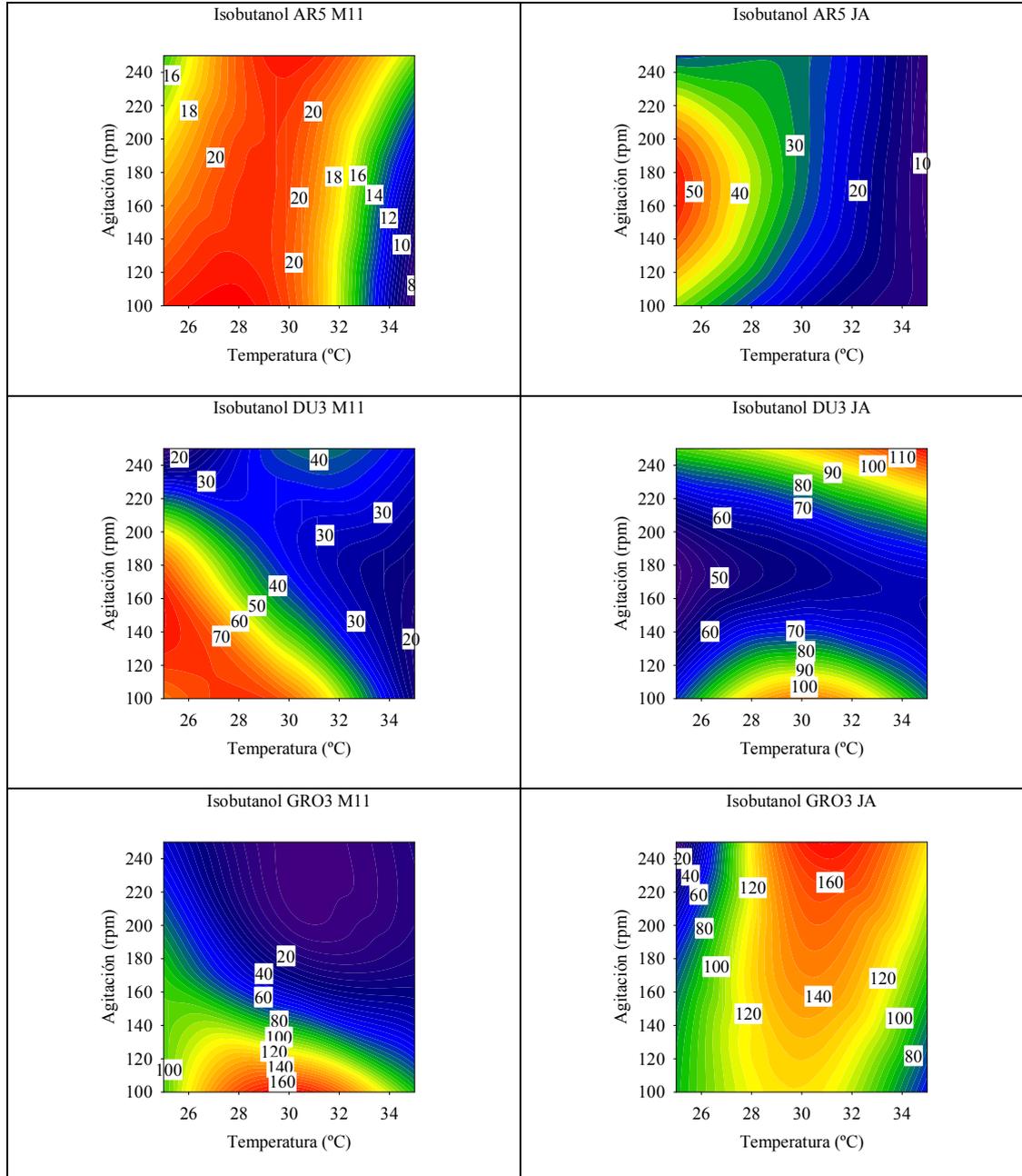
La concentración final de isobutanol producida por la cepa AR5 (*S. cerevisiae*) mostró ser afectada por la temperatura, teniendo producciones más altas a temperatura baja y concentraciones bajas a temperatura alta. Por otra parte la agitación parece no tener efecto sobre la producción de isobutanol (**Figura 7.2.10.**).

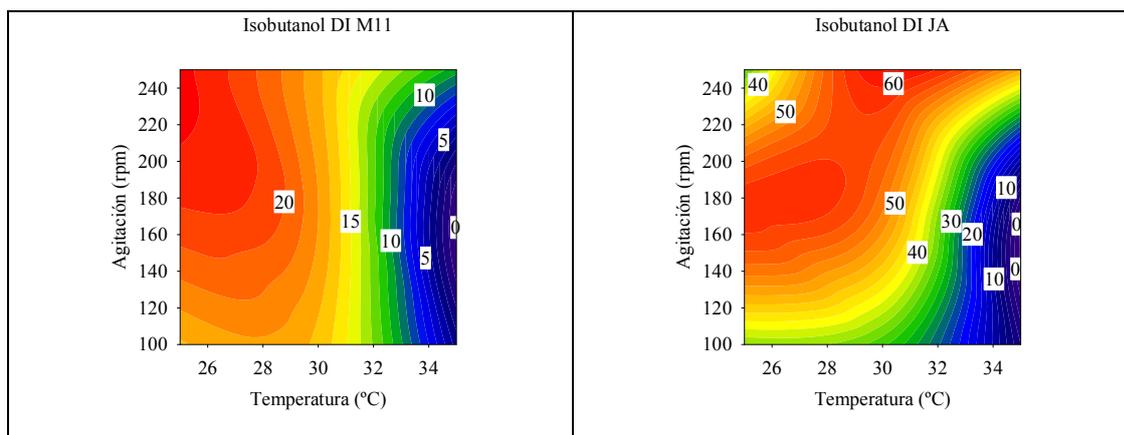
La cepa DU3 (*K. marxianus*) produjo concentraciones mayores que las obtenidas con la cepa AR5 (*S. cerevisiae*). Siendo afectada la producción en medio M11 tanto por la agitación como por la temperatura y en medio JA se observa un efecto solo por la agitación (**Figura 7.2.10.**).

El isobutanol producido por la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) fue la mayor concentración obtenida en comparación con las demás cepas de levaduras, observándose un efecto por la agitación en medio M11 mientras que en medio JA fue la temperatura la que tuvo efecto sobre la producción (**Figura 7.2.10.**).

La cepa DI (*T. delbrueckii*) tanto en medio M11 como en medio JA, muestra un efecto por la temperatura sin afectarle la agitación, con concentraciones similares a las producidas por AR5 (*S. cerevisiae*) (**Figura 7.2.10.**).

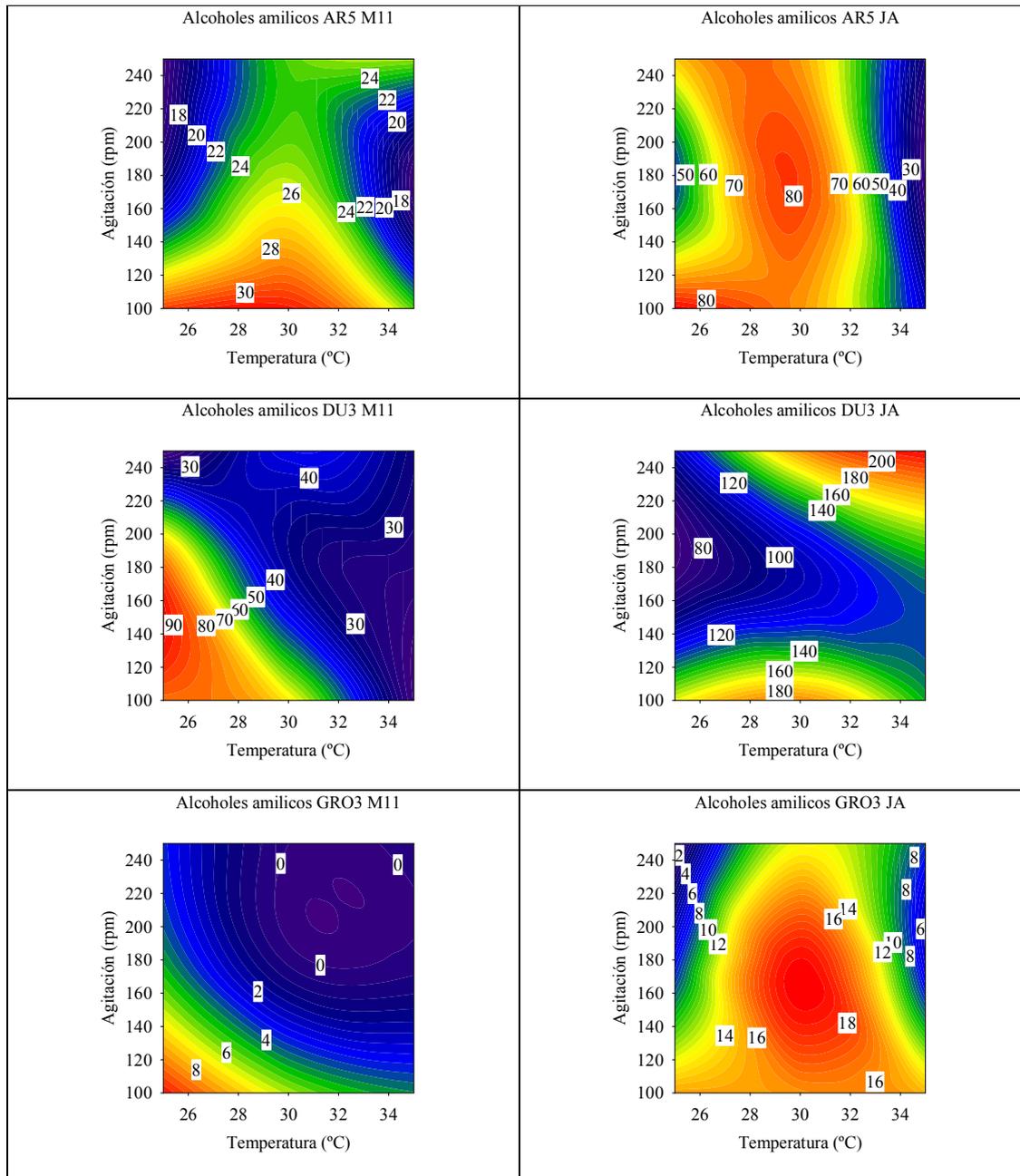
**Figura 7.2.10.** Concentración final de isobutanol producida (mg/L) a las 72h de incubación con las cepas AR5 (*S. cerevisiae*), DU3 (*K. marxianus*), GRO3 (*P. kluyveri*) y DI (*T. delbrueckii*) en medio M11 y JA.

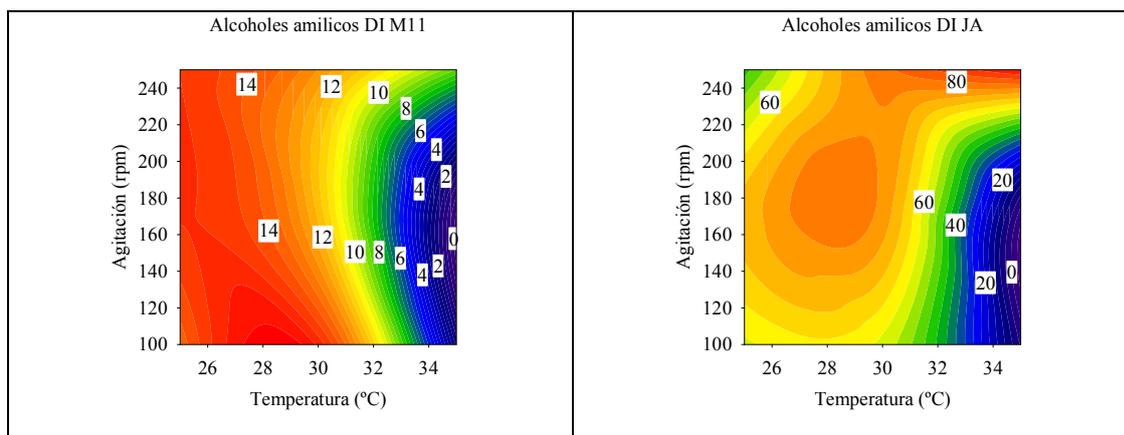




La producción de los alcoholes amílicos al igual que el isobutanol y el 1-propanol fue afectada por efecto de la temperatura con la cepa AR5 (*S. cerevisiae*), obteniéndose las concentraciones máximas a 30 °C. La cepa DU3 (*K. marxianus*) mostró las concentraciones máximas de producción en comparación con las demás cepas de levaduras, siendo afectada tanto por la agitación como por la temperatura en medio M11, mientras que en medio JA fue solo la agitación la que tuvo efecto. La cepa GRO3 (*P. kluyveri*) mostró las concentraciones más bajas de producción de alcoholes amílicos siendo afectada al igual que DU3 (*K. marxianus*) en medio M11 tanto por la agitación como por la temperatura y en medio JA fue la temperatura la que tuvo un efecto en la producción. La cepa DI (*T. delbrueckii*) mostró un efecto por la temperatura con concentraciones similares a las producidas por AR5 (*S. cerevisiae*) (**Figura 7.2.11.**).

**Figura 7.2.11.** Concentración final de alcoholes amilicos producidos (mg/L) a las 72h de incubación con las cepas AR5 (*S. cerevisiae*), DU3 (*K. marxianus*), GRO3 (*P. kluyveri*) y DI (*T. delbrueckii*) en medio M11 y JA.





La producción de alcoholes superiores fue afectada más, por la temperatura, que por la agitación. El alcohol superior que se produjo en mayor concentración por parte de la cepa AR5 (*S. cerevisiae*) fueron los alcoholes amilicos. Sin embargo la cepa DU3 (*K. marxianus*) fue la que presentó las concentraciones más altas de alcoholes superiores.

#### 7.2.4. Conclusión.

Esta parte del estudio nos demuestra que cada una de las cepas de levadura muestra un perfil de producción de compuestos propio, y éste será afectado tanto por las condiciones ambientales como por la composición química del medio. Si se desea una producción alta de etanol, las mejores condiciones son 30°C y 100 rpm, pero en este punto no se logra obtener una alta concentración de ésteres. Además de que en estas condiciones de agitación y temperatura se favorece también una alta concentración de alcoholes superiores. Por lo que si queremos elevar la concentración de ésteres debemos de sacrificar un poco la producción de etanol, reduciendo de esta manera también la concentración de alcoholes superiores. Por lo que a una temperatura de 25°C y agitación de 100 rpm se lograría aumentar la concentración de esterres y disminuir la producción de alcoholes superiores.

Con esto podemos demostrar que debido a que en la industria de la producción de tequila no se lleva a cabo la regulación de la temperatura en las tinas de fermentación, puede llegar a haber variaciones en la composición del producto fermentado, de acuerdo al clima y la época del año. Debido a que es una bebida destilada, puede llegar a realizarse una homogeneización del producto durante todo el año, seleccionando los compuestos que se deseen durante la destilación, controlando la temperatura y los cortes realizados.

En este capítulo se estudio el efecto que tienen la temperatura y la agitación en la producción de compuestos de interés durante la fermentación. Encontrando que no solo las condiciones ambientales son necesarias de controlar durante el proceso, sino también, cabe resaltar la importancia que tiene la selección de la cepa de levadura a utilizar durante el proceso de fermentación.

### **7.3. CAPITULO 3. Influencia de la concentración de Ca y Mg en el medio de fermentación sobre la capacidad de producción de etanol en levaduras no-*Saccharomyces* aisladas de procesos de fermentación de *Agave*.**

#### **7.3.1. INTRODUCCIÓN**

El jugo de *Agave* se utiliza como medio de cultivo y fermentación en la industria tequilera, el mosto de jugo de *Agave* proporciona a la levadura los nutrientes necesarios para su crecimiento. Las levaduras son organismos heterótrofos que son capaces de utilizar una gran variedad de nutrientes para el crecimiento y la generación de energía (Dashko y col., 2003).

La fermentación alcohólica se basa en la asimilación de carbohidratos y su conversión a etanol, esta reacción la realizan principalmente las levaduras del genero *Saccharomyces* pero también existen bacterias del genero *Zymomonas* que son capaces de metabolizar los carbohidratos para producir etanol. El nitrógeno es el segundo constituyente aportado por el medio de cultivo, todas las levaduras, asimilan el N en forma de ión amonio. En la producción industrial de tequila los mostos son enriquecidos con sulfato de amonio debido a que el jugo de *Agave* provee una baja concentración de nitrógeno a las levaduras (Diaz Montaña y col., 2010). Los elementos como el S, P, Mg, y K son elementos necesarios para realizar las reacciones metabólicas necesarias durante la fermentación, algunos de ellos como el Mg actúan como cofactores de diversas enzimas y es necesario en la glucólisis y en reacciones de la biosíntesis de ácidos grasos de levaduras, así mismo participa en la activación de la hexoquinasa, fosfofructoquinasa, fosfoglicerato quinasa, enolasa y piruvato quinasa (Walker y col., 1996) también participa en la protección de la levadura del estrés causado por el etanol, la temperatura y la presión osmótica (Walker, 1994); una concentración baja de Mg o su ausencia durante la fermentación provoca la producción de ácido acético (Leveau, 2000). El fósforo es asimilado por la levadura en forma de iones, el potasio es el mineral mas importante en las levaduras durante la fermentación debido a que en un pH ácido el potasio estimula la fermentación y la respiración, además de que actúa como efector de numerosas enzimas (Leveau, 2000). Otros elementos como el Cu, Fe, Zn, Co, Mo y B son considerados como elementos trazas pues se requieren en concentraciones muy pequeñas. Algunos microorganismos no pueden sintetizar nutrientes específicos como aminoácidos, vitaminas y nucleótidos por lo que deben de ser proporcionados por el medio de cultivo (Stanbury y col., 2003).

El ion Ca incrementa la estabilidad de la membrana plasmática, debido a que provoca la disminución de protones pasivos o bien se estabiliza por la influencia de la ATPasa que inhibe la actividad del etanol (Nabais y col., 1988).

La alta concentración de azúcar afecta la osmosis dentro de la membrana celular, el rango óptimo de concentración de azúcar es de 10 a 18%, debido a que a concentraciones de 22% las levaduras comienzan a tener problemas en el proceso de respiración celular (Stanbury y col., 2003).

Para el crecimiento celular las levaduras tiene una gran demanda de Mg pero no de Ca. El Mg es un requisito indispensable para muchos acidos grasos y enzimas glicolíticas, mientras que el Ca se requiere en muy pocas. El Mg es utilizado intracelularmente, mientras que el Ca funciona extracelularmente en la floculación celular y regula el pH del mosto. El Ca ayuda a proteger las membranas biológicas del estrés causado por el etanol, la temperatura y la presión osmótica. El Ca antagoniza muchas de las funciones metabólicas del magnesio, a través de mecanismos de unión inhibitoria competitiva (Walker y col., 1996).

### 7.3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron las levaduras AR5 (*S. cerevisiae*), DU3 (*K. marxianus*), GRO3 (*P. kluyveri*) y DI (*T. delbrueckii*).

Para la preparación de los inóculos se utilizó el medio YPD en matraces de 125 mL con 50 mL de medio incubados a 30°C y 100 rpm. Los medios de fermentación fueron JA y M11 con fructosa en matraces de 250 mL con 50 mL de medio incubados a 30°C y 250 rpm.

Para el estudio del aporte nutricional del jugo de *Agave* se prepararon medios de fermentación basados en el medio M11, enriqueciéndolos con diferentes concentraciones de jugo de *Agave*, descritos en la **tabla 7.3.1**.

**Tabla 7.3.1.** Porcentaje de azúcar de los medios de fermentación

Medio de fermentación	% de fructosa	% de azúcar de jugo de <i>Agave</i> *
M11	100 g/L	0
5% JA	95% = 95 g/L	5% = 32.26 mL
10% JA	90% = 90g/L	10% = 64.51 mL
15% JA	85% = 85g/L	15% = 96.77 mL
20% JA	80% = 80g/L	20% = 129.03 mL
100% JA	0	100 % = 645.16 mL

\*El jugo de *Agave* que se utilizó para la formulación de los medios tenía una concentración de azúcar de 155 g/L y los mililitros mostrados son para la preparación de 1L de medio.

Para el estudio del efecto del Ca y el Mg, los medios de fermentación se prepararon en base a la composición del medio M11 modificando las concentraciones de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  de acuerdo al modelo de superficie de respuesta que se describe en la **tabla 7.3.2.**

**Tabla 7.3.2.** Concentración de Ca y Mg de los medios de fermentación utilizados en el estudio del efecto de estos minerales.

	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Ca	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Mg
Baja (B)	29.51 mg/L	5 mg/L	16.8 mg/L	1.66 mg/L
Centro (C)	4.413 g/L	747.5 mg/L	520 mg/L	249.17 mg/L
Alta (A)	8.855 g/L	1500 mg/L	5.06 g/L	500 mg/L

Las concentraciones de Ca y Mg se establecieron de acuerdo a las máximas concentraciones de Ca y Mg reportadas en el jugo de *Agave* (Aguilar Uscanga y col., 2007). Además se envió a cuantificar una muestra del jugo de *Agave* utilizado en este trabajo para conocer la concentración exacta de estos minerales.

El conteo se realizó en cámara de Neubauer, la concentración de azúcar se realizó en microplaca con el método de DNS y la determinación del etanol y compuestos volátiles se realizó por HS-GC.

El balance de carbono se llevo a cabo en medio JA y medio M11 a 30°C en matraces de 250mL con 100 mL de medio a 250 rpm, donde se ajustaron las concentraciones de Ca y Mg. Por lo que el medio M11 se formulo de la siguiente manera.

- 1 g/L de extracto de levadura
- 1 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 5.066 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (equivalente a 500 mg/L de Mg)
- 2.23 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- 5.66 g/L de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (equivalente a 800 mg/L de Ca)
- 100 g/L de Fructosa como fuente de carbono.

Esterilizando el medio en autoclave a 121°C por 15 min.

Para la determinación de biomasa se centrifugaron 25 mL de muestra y se lavaron con agua destilada, el botón se resuspendió en 1 mL de agua y se colocó en una termobalanza.

La determinación de producción de  $\text{CO}_2$  se calculo mediante la pérdida de peso, por lo que se peso un matraz en tiempo cero, el cual se inoculo e incubo al igual que los demás matraces, simplemente no se tomaron muestras de éste y al final de las 72 horas se volvió a pesar para determinar la producción de  $\text{CO}_2$  por pérdida de peso. También se colocó un matraz sin inoculo para determinar la pérdida de peso por evaporación de agua y tener de esta manera el peso correspondiente solo al  $\text{CO}_2$ .

La cuantificación de azúcar, etanol y glicerol de las muestras del balance de carbono se realizaron por HPLC, para lo cual se centrifugaron 1.5 mL de muestra para retirar las células, se colocó 1 mL de muestra centrifugada en un matraz aforado de 20 mL y se llenó hasta el aforo con fase móvil. Para la preparación de fase móvil se colocaron 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en 1 L de agua ultra pura para una concentración de 1.87 mM. Una vez aforado el matraz se mezcló, con una jeringa de 3 mL se llenó y se desechó 2 veces para lavar la jeringa, la tercera vez se llenó y se coloca un filtro de membrana de nylon de 0.2  $\mu\text{m}$  de poro, se desechó la mitad de la muestra para lavar el filtro y la otra mitad se colocó en un vial para HPLC. Las muestras se refrigeraron hasta el momento de llevarlas al cromatógrafo.

El cromatógrafo HPLC utilizado (modelo ACCELA, Thermo electron corporation) está compuesto de 3 partes distintas, una parte que contiene las bombas y un desgasificador (bombas ACCELA), una parte que contiene las muestras y el automuestreador (automuestreador ACCELA) y la tercera parte que contiene el detector UV y visible (detector PDA), estos no se utiliza para la detección de compuestos pero es obligatorio para el funcionamiento del equipo. El detector es un aparato externo (Surveyor IR Plus detector, Finnigan) que mide la diferencia de refracción del líquido que fluye a través el sistema con respecto a la fase móvil. El detector para todos los experimentos se colocó a 40°C a fin de mantener los parámetros de detección constantes. Los resultados se expresan en unidades de RI (índice de refracción). En estas condiciones la respuesta del detector es específica para cada molécula y su concentración. Para la separación de los compuestos se utilizó una columna Rezex ROA-H<sup>+</sup> de 250 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro, con un flujo de 170 µL/min de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.87mM, se inyectaron 25 µL de muestra y la temperatura de la columna fue de 30°C. Para mantener la temperatura de la columna se utilizó un horno externo (HPLC Column controller, Thermo Sphere TS-130).

### **7.3.3. RESULTADOS**

#### **7.3.3.1. Estudio de las capacidades fermentativas de las cepas de levaduras en jugo de *Agave* y medio M11 enriquecido con jugo de *Agave*.**

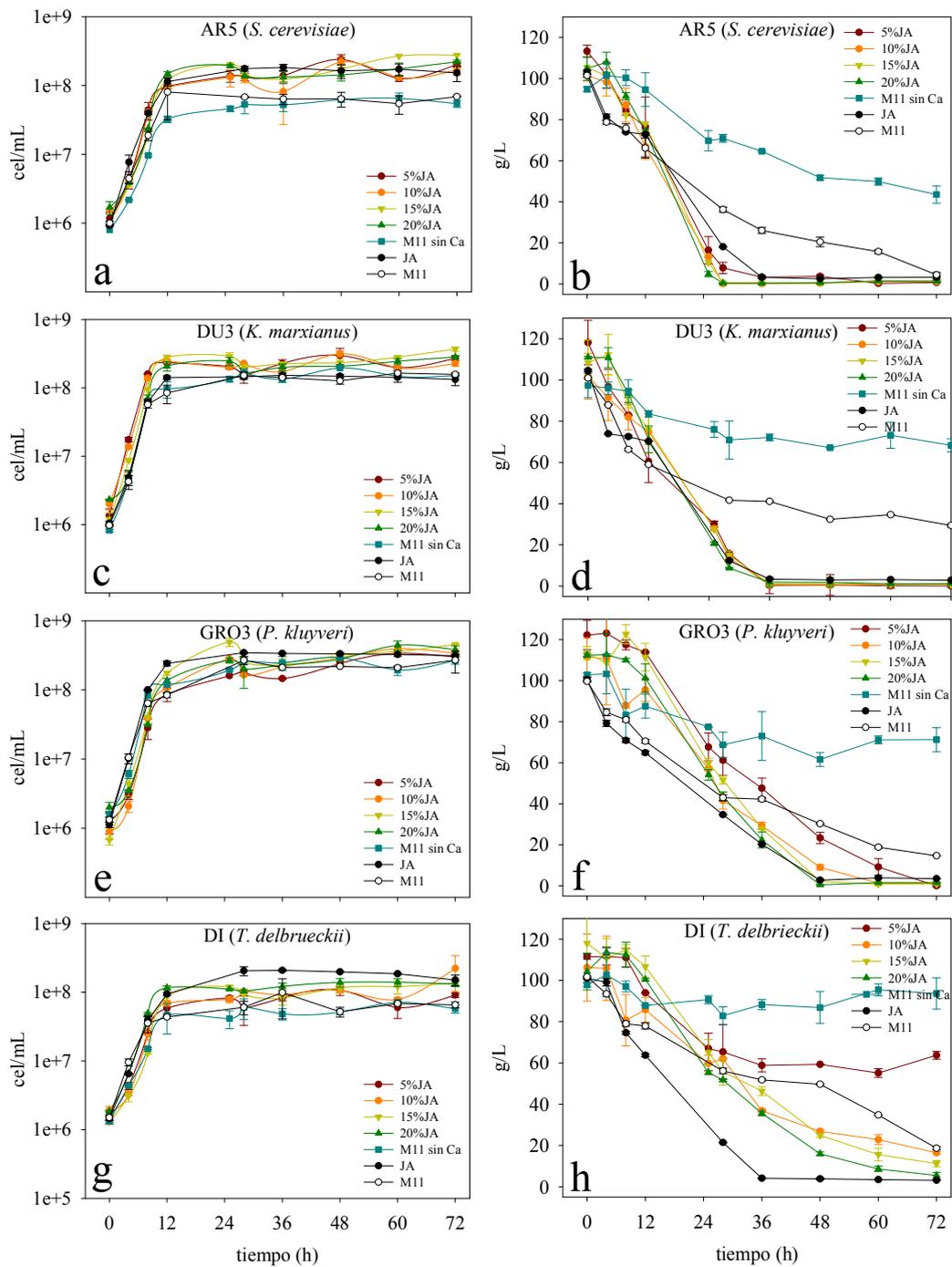
Para la determinación de la concentración de minerales se envió a analizar una muestra del jugo de *Agave* (155g/L de azúcar) que se utilizó para este trabajo, el resultado de absorción atómica mostro que el jugo de *Agave* tenía una concentración de Mn < 1 ppm, Ca 388 ppm, Mg 208 ppm, Zn 4.94 ppm y Fe 16.7 ppm.

Después de la determinación de la concentración de N<sub>asimilable</sub> por el método de Sørensen, se obtuvo como resultado una concentración de 47.93 mg/L para el jugo de *Agave* (100 g/L de azúcar). También se le determinó la concentración de N<sub>asimilable</sub> para el extracto de levadura que se utilizó en la preparación del medio M11 por lo que se preparo una solución de 1g/L de extracto de levadura y se obtuvo como resultado una concentración de 40.94 mg/L de N<sub>asimilable</sub>.

De las diluciones de jugo de *Agave* en medio M11 se determinaron las cinéticas de crecimiento y consumo de azúcar. En la **figura 7.3.1.** se puede apreciar que el crecimiento es similar en los diferentes medios para cada una de las cepas, observándose que en medio M11 y M11 sin Ca es donde el crecimiento es menor en comparación con los medios donde está presente

el jugo de *Agave*. Si bien las cinéticas de crecimiento son similares, las cinéticas de consumo de azúcar si presentan diferencias, siendo en el medio M11 sin Ca donde se observa la mayor concentración de azúcar residual para todas las cepas. Debido a esto se formula la hipótesis de que el Ca no es necesario para el crecimiento de las levaduras pero si para la fermentación, teniendo un consumo mínimo de azúcar, solo para el crecimiento de la cepa, en las primeras horas de la fermentación, correspondientes al crecimiento, después el azúcar ya no se consume, puesto que no genera producción de etanol.

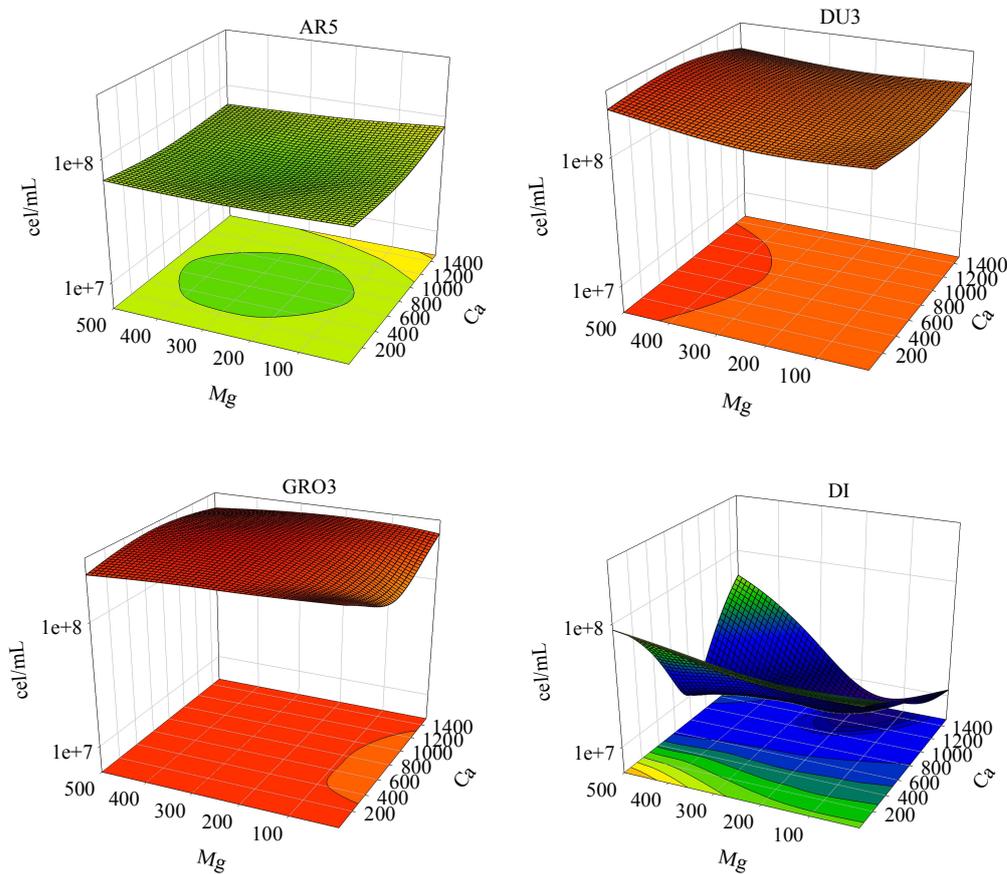
Los diferentes porcentajes de jugo de *Agave* en el medio afectan de distinta manera a cada una de las cepas de levaduras. Observando en la **figura 7.3.1.b.** que la cepa AR5 (*S. cerevisiae*) al igual que la cepa DU3 (*K. marxianus*) **figura 7.3.1.d.** presentan cinéticas de consumo de azúcar similares en los medios con los diferentes porcentajes de jugo de *Agave* y el medio JA. Mientras en la **figura 7.3.1.f.** se observó que las cinéticas de consumo de azúcar de la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) se van haciendo cada vez más rápidas conforme aumenta el porcentaje de jugo de *Agave* hasta llegar al medio JA, siendo este efecto más notorio en la **figura 7.3.1.h.** con la cepa DI (*T. delbrueckii*). Debido a esto nos formulamos la hipótesis de que en el medio JA existen nutrientes indispensables para estas cepas de levaduras, puesto que fueron aisladas de jugo de *Agave* de diferentes especies, y pueden estar adaptadas de manera natural a este medio.



**Figura 7.3.1.** Cinéticas de crecimiento (a, c, e, f) y consumo de azúcar (b, d, f, h) de las levaduras AR5 (*S. cerevisiae*), DU3 (*K. marxianus*), GRO3 (*P. kluyveri*) y DI (*T. delbrueckii*) en los medios de fermentación JA, M11, M11 sin Ca y los medios M11 enriquecidos con diferentes porcentajes de JA.

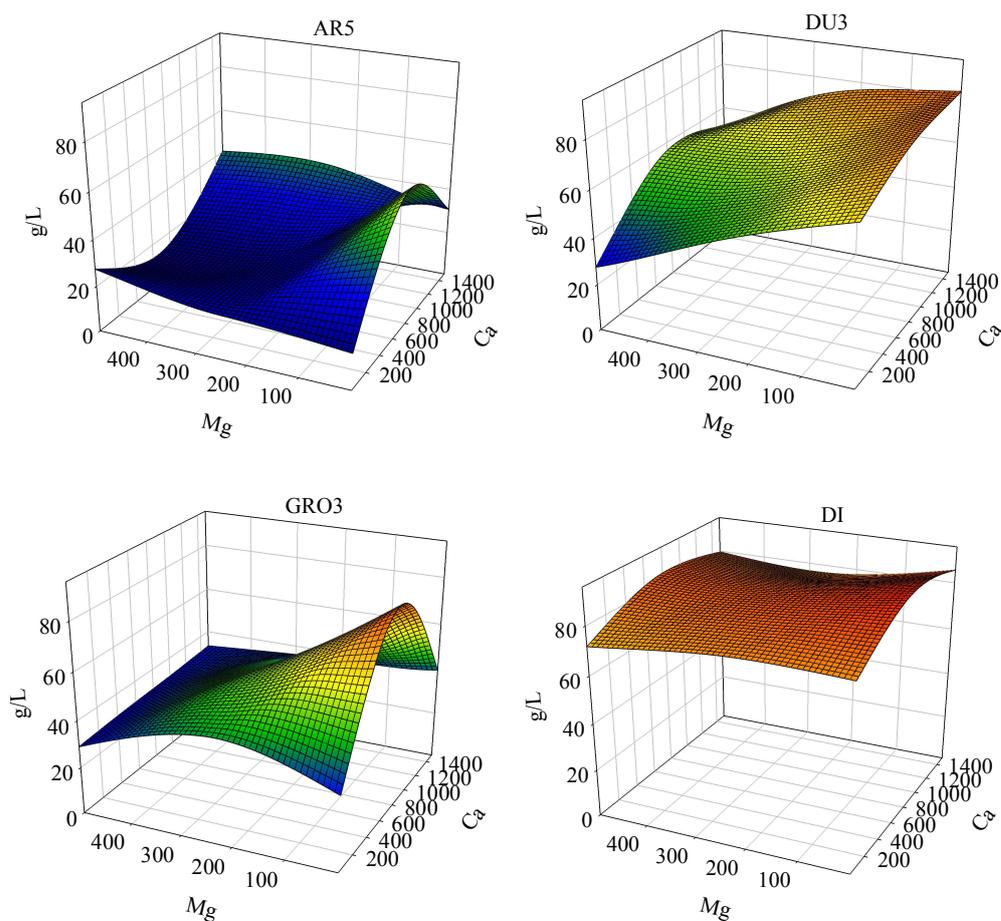
### 7.3.3.2. Evaluación del efecto de la concentración de Ca y Mg en las capacidades fermentativas de las levaduras.

Se puede apreciar en la **figura 7.3.2** que el crecimiento de las levaduras AR5 (*S. cerevisiae*) DU3 (*K. marxianus*) y GRO3 (*P. kluyveri*) no se ve afectado por la concentración de Ca y tampoco por la concentración de Mg, teniendo que el máximo crecimiento alcanzado a las 72 horas es el mismo independientemente de la concentración de minerales, observándose una superficie plana la cual indica que se tiene el mismo nivel de crecimiento independientemente de la concentración de los minerales estudiados. Mientras que la levadura DI (*T. delbrueckii*) muestra los máximos de crecimiento cuando la concentración de magnesio es alta en combinación con altas y bajas concentraciones de Ca.



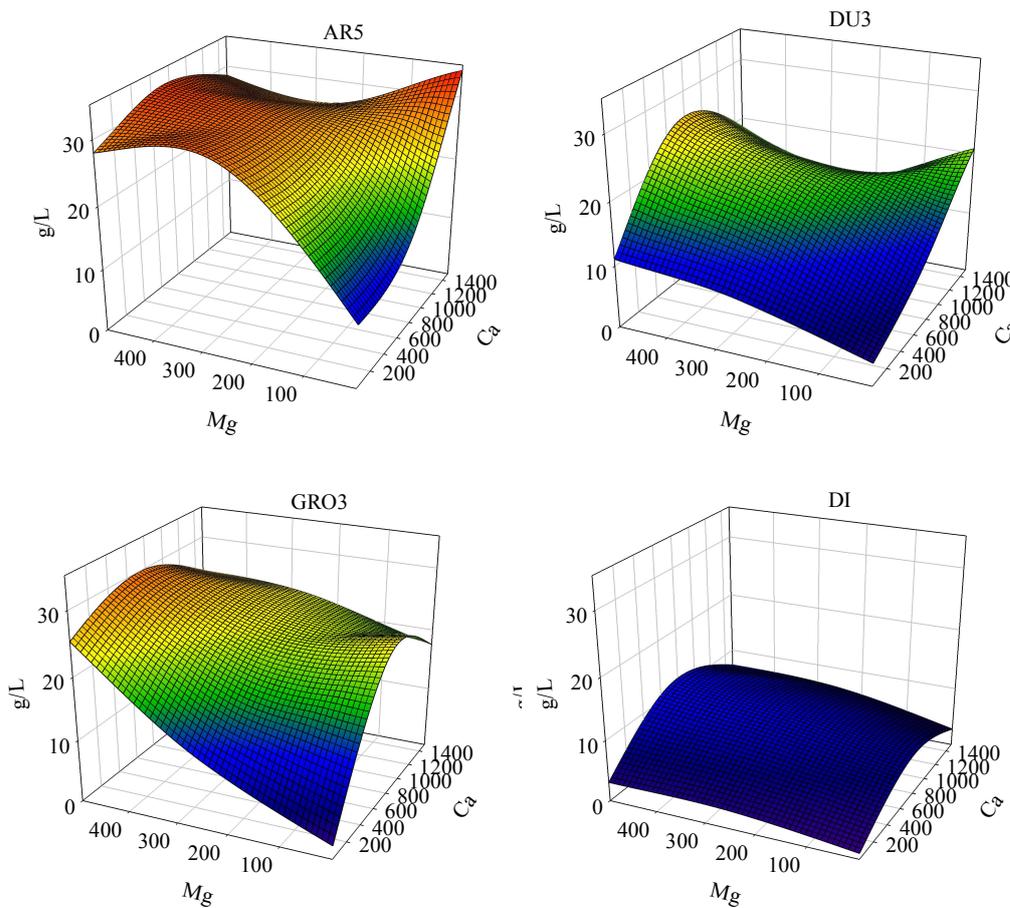
**Figura 7.3.2.** Crecimiento de las levaduras al final de las 72 horas de fermentación con las diferentes concentraciones de Ca y Mg.

Sin embargo la concentración de azúcar residual al finalizar las 72 horas de fermentación es diferente para cada una de las cepas de levaduras (**figura 7.3.3.**), siendo la cepa DI (*T. delbrueckii*) la que menos azúcar consumió. La cepa GRO3 (*P. kluyveri*) mostró diferentes concentraciones de azúcar residual en las distintas concentraciones de Ca cuando la concentración de Mg es baja, pero no se observaron diferencias cuando la concentración de Mg era alta. La cepas de levadura DU3 (*K. marxianus*) presento una tendencia a consumir la mayor concentración de azúcar a concentraciones altas de Mg y bajas de Ca, mientras que por el contrario, mostró una alta concentración de azúcar residual cuando la concentración de Mg fue baja y la concentración de Ca alta, por lo que se puede observar que la concentración de Mg afecta más en el consumo de azúcar en comparación al efecto que se observó por la concentración de Ca con la cepa DU3 (*K. marxianus*). Finalmente la cepa que consumió la mayor cantidad de azúcar después de las 72 horas de fermentación fue la cepa AR5 (*S. cerevisiae*), sin embargo se observó un efecto de mayor consumo de azúcar a concentraciones bajas de Ca.



**Figura 7.3.3.** Concentración de azúcar residual de las 4 cepas de levaduras después de las 72 horas de fermentación.

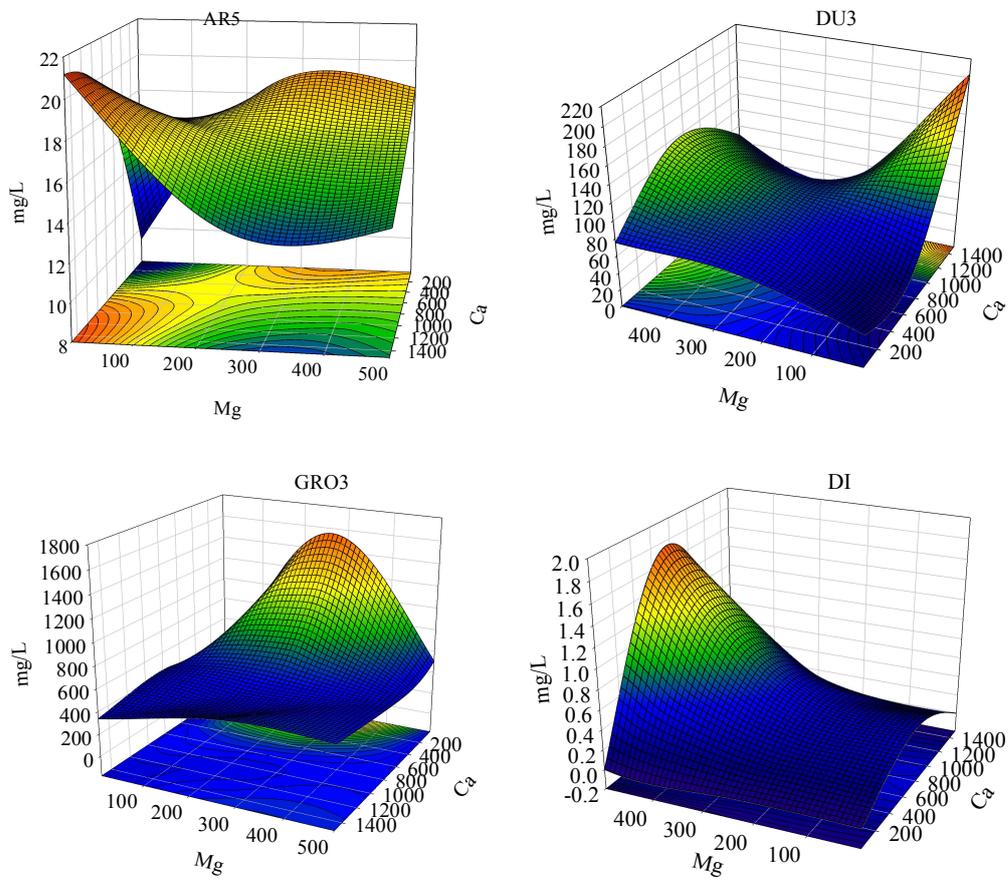
La producción de etanol obtenida por cada una de las cepas fue diferente (**Figura 7.3.4.**), siendo la cepa AR5 (*S. cerevisiae*) la que presentó la mayor concentración de etanol, lo que corresponde a lo visto anteriormente en el consumo de azúcar. Cabe destacar que la menor producción de la cepa AR5 (*S. cerevisiae*) fue a bajas concentraciones de Ca y Mg. Presentado una producción similar de etanol con una concentración alta de Ca y baja de Mg, o bien una concentración alta de Mg y baja de Ca. Por lo que esta cepa muestra ser, o bien, dependiente de Ca o Mg. Este mismo efecto se observa en las cepas DU3 (*K. marxianus*) y GRO3 (*P. kluyveri*). La cepa de levadura DI (*T. delbrueckii*) fue la que presento la menor concentración de etanol producida. Para las 4 cepas de levaduras se puede observar que altas concentraciones de Mg y medias de Ca es donde se produce la mayor concentración de etanol, lo que corresponde a 747.5 mg de Ca y 500 mg de Mg.



**Figura 7.3.4.** Producción de etanol a las 72 horas de fermentación en las distintas concentraciones de Ca y Mg.

El etanol es un indicador importante en la fermentación alcohólica, debido a que es el producto principal que se desea producir, pero una bebida alcohólica también está formada por distintos compuestos como lo son los ésteres que le van a conferir las características aromáticas principales a la bebida. En el caso del tequila el acetato de etilo es el principal éster que se produce y es por esto que se utiliza como indicador de la concentración de esteroides producidos, en la **figura 7.3.5.** se puede observar la concentración de acetato de etilo que se produjo después de las 72 horas de fermentación por cada una de las cepas estudiadas en este trabajo.

La cepa que produjo la mayor concentración de acetato de etilo fue la cepa GRO3 (*P. kluveri*) con concentraciones desde los 200 hasta los 1600 mg/L, seguida de la cepa DU3 (*K. marxianus*) que produjo desde 20 hasta 200 mg/L. La cepa AR5 (*S. cerevisiae*) presentó concentraciones desde los 10 hasta los 20 mg/L y finalmente la cepa que menos produjo fue la cepa DI (*T. delbrueckii*) que presentó solo una máximo de producción de 2 mg/L.



**Figura 7.3.5.** Producción de acetato de etilo de las 4 cepas de lavaduras a las 72 horas de fermentación.

### 7.3.3.3. Balance de carbono en medio JA y medio M11 modificando las concentraciones de Ca y Mg.

Finalmente se realizó un balance de carbono ajustando las concentraciones de Ca y Mg en el medio M11, como se describió previamente en este capítulo.

**Tabla 7.3.3.** Concentraciones de fuente de carbono y principales productos de carbono, para la realización del balance de carbono.

Medio y Cepa	Azúcar consumida (g/L)	X mol	Etanol producido (g/L)	X mol	Glicerol producido (g/L)	X mol	CO <sub>2</sub> producido (g/L)	X mol	Biomasa producida (g/L)	X mol *	Balance de Carbono
JA AR5	96.35	3.21	40.81	1.77	1.95	0.06	47.24	1.07	3.40	0.14	0.16
JA DU3	98.09	3.27	41.17	1.79	2.65	0.09	42.24	0.96	3.01	0.12	0.32
JA GRO3	96.24	3.21	43.18	1.87	1.93	0.06	36.24	0.82	2.39	0.10	0.35
JA DI	96.22	3.21	41.42	1.80	1.29	0.04	40.24	0.91	3.21	0.13	0.32
M11 AR5	81.81	2.73	33.57	1.46	4.70	0.15	35.24	0.80	1.83	0.07	0.24
M11 DU3	54.55	1.82	18.80	0.82	4.35	0.14	15.24	0.35	4.09	0.16	0.35
M11 GRO3	96.60	3.22	36.04	1.56	1.86	0.06	40.24	0.91	2.60	0.10	0.58
M11 DI	42.01	1.40	19.83	0.86	1.29	0.04	16.24	0.37	1.47	0.06	0.07

\* La fracción molar de biomasa fue calculada considerando la siguiente fórmula (CH<sub>1.79</sub>O<sub>0.59</sub>N<sub>0.15</sub>) con un peso molecular de 25.036 g/mol.

El balance de carbono se obtiene de restar las fracciones molares de los productos a la fracción molar de azúcar (fuente de carbono), para que el balance de carbono sea correcto, el resultado final no debe de ser mayor a 0.5 lo que equivale al 15% de los moles de carbono proporcionados por el azúcar inicial, debido a que en estos 0.5 moles se encuentran los demás compuestos que se producen en menor concentración y que no se están cuantificando, esto es basado en estudios con *Saccharomyces cerevisiae* que es la cepa modelo.

La cepa GRO3 (*P. kluyveri*) en medio M11 presentó un balance de 0.58, superior a lo que normalmente se obtiene en los balances de carbono, esto debido a que la concentración de otros compuestos como ésteres es hasta 2000 veces superior que lo producido por la cepa AR5 (*S. cerevisiae*) con la que se realizan los balances de carbono normalmente. También cabe destacar que la cepa DI (*T. delbureckii*) en medio M11 mostró un resultado cercano a cero, esto debido a que es una cepa que presentó las menores concentraciones de compuestos diferentes a los que se consideraron en este balance en comparación a las producidas por AR5 (*S. cerevisiae*) tanto de ésteres como de alcoholes superiores.

Es importante mencionar que en el medio JA el consumo de azúcar fue similar (cercano a 100 g/L), por lo tanto la producción de etanol también presentó concentraciones similares, sin embargo, las concentraciones de glicerol y biomasa fueron diferentes para cada una de las cepas. Más aun se observan diferencias entre medio y cepas, lo que nos hace formular la hipótesis de que cada una de las cepas presenta un metabolismo diferente al compararlo con la cepa control AR5 (*S. cerevisiae*).

La comparación del efecto de los metales durante la fermentación ha revelado que el uso de potasio solo en un medio sintético tiene el mayor efecto, mientras que el cobre presenta el menor efecto. Cuando es comparado con un medio de fermentación que contiene una mezcla de Cu, Ca, K y Na, el tiempo de fermentación es igual que los medios sintéticos donde estuvo presente solo el Ca o el Na. El mayor aumento en crecimiento celular fue observado con el potasio. Las diferencias en la producción de etanol observadas a nivel industrial cuando es utilizada la melaza como fuente de carbono, son causadas principalmente por las diferencias en la concentración de metales ([Akrida-Demertzi y Koutinas 1991](#)).

Al estudiar el efecto de diferentes iones sobre las enzimas puras, se ha reportado que el cloruro de calcio no presenta efecto en la enzima alcohol deshidrogenasa pero si activa fuertemente (400% a 0.2 mM) la enzima piruvato descarboxilasa, mientras que los iones de Co, Mn y Ni activan la alcohol deshidrogenasa ([Hoppner y Doelle 1983](#)).

#### **7.3.4. CONCLUSION**

Se observo que el crecimiento no es afectado por la concentración de Ca en el medio, pero si es indispensable su presencia para favorecer la producción de etanol.

El magnesio afecta de diferente manera a cada una de las cepas estudiadas, en combinación con la concentración de Ca. Por lo que no se puede hacer una conclusión general de todas las levaduras, debe de ser de manera individual.

Cada cepas muestra un perfil de producción de compuestos propio, y este es afectado tanto por las condiciones ambientales como por la composición química del medio.

Una alta concentración de Ca en el medio, favorece a la producción de etanol debido a que esta refuerza la membrana de la célula, dándole una mayor capacidad para soportar una concentración más alta de etanol en el medio (Nabais y col., 1998; Walker, 2004). En este trabajo se observo que el crecimiento no es afectado por la concentración de Ca en el medio, pero si es indispensable su presencia para determinar la capacidad fermentativa de las levaduras favoreciéndose la producción de etanol ante la presencia del Ca. Considerando que el medio de JA tiene una concentración alta de etanol de manera natural, esto ayuda a las levaduras a que tengan una productividad de alcohol mayor, comparada con otros medios utilizados.

Así como el Ca es indispensable para la producción de etanol, el Mg en altas concentraciones favorece la producción del mismo, no solo en el medio M11, si no, también en el medio JA que de manera natural tiene una alta concentración de Ca, cuando se enriquece con Mg, donde las levaduras llegan a producir una concentración mayor de etanol.

#### **7.4. CAPITULO 4. Caracterización de cultivos puros libres e inmovilizados en jugo de *Agave* y medio semi-sintético. (Artículo 1)**

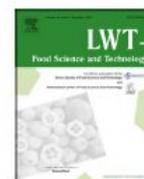
El siguiente capítulo muestra los resultados de la experimentación de los cultivos puros en medio de jugo de *Agave* y medio M11 a nivel matraz en condiciones controladas en el laboratorio.

En este capítulo se evaluó el efecto que tiene la inmovilización en los cultivos puros, debido a que se llega a generar un estrés al momento de estar las células inmovilizadas, a pesar de ser un material inerte el que se utiliza para inmovilizar las células, el estado fisiológico de las levaduras cambia, por el hecho de no estar libres en el medio. La inmovilización limita la transferencia de gases desde y hacia el interior de los soportes de inmovilización, sobre todo cuando las células son embebidas en el soporte.

Ante el estrés de estar las levaduras inmovilizadas, llegan en algunas ocasiones a aumentar la producción de esteroides que al final contribuyen en el cambio positivo para el perfil aromático de la bebida alcohólica, encontrando en este trabajo, que no se observa un cambio significativo por la inmovilización de levaduras.

El trabajar con medio jugo de *Agave* hace que el trabajo sea muy específico y regional, por lo que se utilizó el medio M11, que es un medio semi-sintético, formulado en el laboratorio y que se puede llegar a preparar en cualquier otra parte, con lo cual, se pueden llegar a hacer comparaciones o reproducir los resultados obtenidos en el presente trabajo. Es por ello la importancia de trabajar con los 2 medios de fermentación.

Se caracterizaron los perfiles de compuestos volátiles que llega a producir cada una de las levaduras, tanto libres como inmovilizadas en ambos medios, lo que nos permite tener la información y poder sugerir cambios a los productores, en base a los perfiles aromáticos que requieran. Haciendo un cambio de la levadura con la cual se trabaja, para tener al final una bebida más aromática.



## Fermentative capacity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* in agave juice and semi-synthetic medium



Luis E. Segura-García<sup>a, b, c</sup>, Patricia Taillandier<sup>b, c</sup>, Cedric Brandam<sup>b, c</sup>, Anne Gschaedler<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. A.C., Av. Normalistas 800, Colinas de la Normal, Guadalajara, Jalisco, C.P. 44270, México

<sup>b</sup> Université de Toulouse, INP-ENSIACET, Laboratoire de Génie Chimique, 4, Allée Emile Monso, BP 83234, F-31432 Toulouse Cedex 4, France

<sup>c</sup> CNRS, Laboratoire de Génie Chimique, UMR 5503, F-31030 Toulouse, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 March 2014  
Received in revised form  
5 August 2014  
Accepted 6 August 2014  
Available online 15 August 2014

#### Keywords:

Fermentation  
*Saccharomyces*  
Non-*Saccharomyces*  
Agave juice  
Yeast immobilization

### ABSTRACT

Various consortia of yeasts and bacteria involved in the natural fermentation process of tequila have been identified, particularly non-*Saccharomyces* yeasts. This study evaluates the fermentative capacity of two non-*Saccharomyces* yeasts (isolated from traditional mezcal fermentation): *Kluyveromyces marxianus* (DU3) and *Pichia kluyveri* (GRO3), and assesses their production of volatile compounds. The values found are compared with those of the same attributes of a *Saccharomyces cerevisiae* (AR5) isolated from tequila fermentation. The fermentations were performed in two different media, agave juice (JA) and a semi-synthetic medium (M11). The study also compared free and immobilized yeast fermentations in the JA medium in order to evaluate the potential benefits of immobilization on the yeast behaviour. This study demonstrated the potential of non-*Saccharomyces* yeasts, which fermented the agave juice in the same manner as *S. cerevisiae* but with higher ester production. Furthermore, *K. marxianus* produced more higher alcohols than *S. cerevisiae*. This could lead to tequila with different aroma profiles. Results were different in the synthetic medium, thus showing sensitivity to the composition of the medium. No significant differences between yeast fermentations with free and immobilized cells were detected, except for ethanol yield.

© 2014 Published by Elsevier Ltd.

### 1. Introduction

Tequila, the distilled *Agave* beverage traditionally associated with Mexico, is produced exclusively in the territory of the appellation of origin of the beverage, according to Mexican regulations (SECOFI, 2012, NOM-006-SCFI-2012). The classic process of tequila production is divided into five steps: cooking of the *Agave tequilana* Weber var azul stems, milling of the cooked agaves, fermentation, distilling and, in some cases, ageing. In some distilleries, cooking is carried out in brick ovens heated by steam injection; in others, steel autoclaves are used. Agaves contain high concentrations of highly branched fructans, which are hydrolysed during the cooking step so as to obtain simple sugars (fructose, glucose and sucrose). The cooked agave is milled to extract the sweet must containing a high concentration of fructose. In recent years, a diffusion process has been developed using hot water to extract fructans or fructose from

crude crushed agave or agave fibres. Hydrolysis is achieved using an acid treatment. The initial sugar concentration in fermentation is between 40 and 160 g/L, depending on which type of tequila is being produced. The lowest sugar concentrations occur when only agave sugars are used (tequila 100%) and higher concentrations result from the addition of other sugars, mainly corn fructose syrup (tequila). Fermentation is mainly carried out with selected *Saccharomyces cerevisiae* inocula, although some factories still work with spontaneous fermentations. Normally, the fermentation lasts for 24–96 h, at a temperature between 30 and 35 °C. The final concentration of ethanol in fermented must lies between 30 and 90 g/L, depending on the initial sugar concentration (Cedeño, 1995).

Non-*Saccharomyces* yeasts have long been considered as contaminants of alcoholic fermentation and, for years, practitioners attempted to avoid their presence during the process. According to the literature, non-*Saccharomyces* yeasts proliferate in early fermentation stages, but their growth is rapidly inhibited due to their low ethanol tolerance (about 50–60 g/L). Thus, the fermentation continues with more tolerant yeasts, some belonging to the genus *Saccharomyces* (Ciani & Picciotti, 1995; Fleet & Heard, 1993). However, although non-*Saccharomyces* yeasts are active for short

\* Corresponding author. Tel.: +52 33 33 45 52 00; fax: +52 33 33 45 52 45.

E-mail addresses: [agschaedler@ciatej.mx](mailto:agschaedler@ciatej.mx), [gschaedler@hotmail.com](mailto:gschaedler@hotmail.com) (A. Gschaedler).

periods in the fermentation, they contribute significantly to the aromatic quality of the final beverage (Romano, Fiore, Paraggio, Caruso, & Capece, 2003).

Interest in the study of non-*Saccharomyces* yeasts for alcoholic fermentation is currently growing, since these are the main component responsible for the production of different flavours (Ciani, Comitini, Mannazzu, & Domizio, 2010). During the production of beverages from *Agave* using spontaneous fermentation, a stable consortium of bacteria and yeasts is present (Lappe-Oliveras et al., 2008). In the process of tequila making, different genera of non-*Saccharomyces* yeasts are detected such as *Brettanomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Issatchenkia* and *Torulaspota* (Lachance, 1995). These genera have also been identified in other alcoholic beverages, such as wine.

In tequila, recent studies have shown that fermentation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Hanseniaspora*) is able to produce ethanol levels as high as those given by *S. cerevisiae* in an agave juice enriched with yeast extract. The failure of non-*Saccharomyces* yeasts to survive under traditional agave juice conditions is attributed to a deficiency of nutrients and not to their inability to tolerate ethanol (Díaz-Montaño, Favela-Torres, & Córdova, 2010). López-Alvarez, Díaz-Pérez, Sosa-Aguirre, Macías-Rodríguez, & Campos-García (2012) demonstrated that a strain of *Kluyveromyces marxianus* was also able to ferment the juice of *A. tequilana*, and that the concentrations of volatile compounds and the ethanol yield were higher than those obtained with *S. cerevisiae*.

Yeast immobilization is also an alternative for the alcoholic beverage industry. For example, this is used in wine production to obtain a higher yeast concentration during the fermentation stage, thus increasing productivity, in order to favour the production of esters (Viana, Taillandier, Vallés, Strehaiano, & Manzanares, 2011) and to allow recycling of the yeasts, which results in decreased costs (Zhao & Xia, 2010). In mixed fermentations, this strategy helps to obtain and maintain equal concentrations of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts during the fermentation step. However, immobilization can generate physiological and biochemical changes with respect to free yeasts. In particular, these changes can lead to an increased ethanol yield (Ciesarová, Dömény, Smogrovicová, Pátková, & Sturdík, 1998) or to the limited transfer of nutrients into the immobilization matrix, which decreases their availability (Verbelen, De Schutter, Delvaux, Verstrepen, & Delvaux, 2006).

In this study, in order to produce tequila with an aromatic profile rich in esters and with acceptable ethanol yields, the use of two non-*Saccharomyces* yeasts isolated from spontaneous mezcal fermentations was explored and compared with a fermentation performed with *S. cerevisiae* isolated from tequila fermentation. Also, the influence of yeast immobilization on the productions of ethanol and volatile compounds was considered in order to evaluate the potential use of immobilized yeast during tequila fermentation. As *Agave* juice is a medium that presents differences in each batch, the fermentation experiments were performed in parallel in a semi-synthetic medium (M11), as an internal control having a chemical composition that is easy to reproduce everywhere.

## 2. Methodology

### 2.1. Yeast strains

Three yeasts from the CIATEJ (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco) collection were used: AR5 *Saccharomyces cerevisiae*, isolated from tequila fermentation, and DU3 *K. marxianus* and GRO3 *Pichia kluyveri*, isolated

from mezcal fermentation (Amaya-Delgado, Herrera-Lopez, Arriзон, Arellano-Plaza, & Gschaedler, 2013).

### 2.2. Fermentation and culture medium

Two fermentation media were used: a semi-synthetic medium M11 (100 g/L fructose, 1 g/L yeast extract, 1 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3.27 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.23 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.98 g/L  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) and an agave juice medium (*A. tequilana* Weber var. azul with 100 g/L of sugar enriched with 0.5 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ).

YPD medium (10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 20 g/L glucose) was used for the preparation of the inocula.

### 2.3. Yeast immobilization

The immobilized yeast was prepared using alginic acid sodium salt from brown algae (Sigma–Aldrich®) mixed with a suspension of cells in water ( $2\text{E}+09$  cell/mL). Equal volumes of the two solutions were used so as to obtain approximately  $1\text{E}+09$  cell/g bead as a final concentration in a 20 g/L alginic sodium yeast cells suspension, which was dripped using a pump and a 29G needle into a 170 g/L  $\text{CaCl}_2$  solution mixed with a magnetic stirring bar. After the beads had been incubated for 30 min in the  $\text{CaCl}_2$  solution, they were removed and washed with distilled sterile water to remove the excess calcium. The beads had an average diameter of 2 mm and were stored in a 40 g/L glucose solution at 4 °C until use.

### 2.4. Fermentation conditions

All the fermentations were carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks with 50 mL of medium, at a temperature of 30 °C and 100 rpm stirring for 72 h. Fermentation time was selected according to the standard industrial process. The 100 rpm stirring was chosen on the basis of a previous study (not published) which showed that this condition allowed yeast growth and ethanol production to be obtained simultaneously, as occurs in classical fermentation in the tequila industry (Cedeño, 1995). The inocula were incubated at 30 °C and 250 rpm for 18 h. The fermentation medium was inoculated with liquid inoculum grown in YPD medium overnight to start at a concentration of  $1\text{E}+06$  cell/mL or with beads to start at a concentration of  $1\text{E}+07$  cell/mL. Every 24 h, some beads were removed and the number of cells in the beads were counted. The fermentations were carried out in duplicate.

### 2.5. Cell counting

The cell concentration in the liquid medium was determined by microscopic counting. The beads were dissolved in a 20 g/L citric acid solution and stirred in a vortex, then the cells were counted in a Neubauer chamber.

### 2.6. Sugar concentration

The reducing sugar concentration (fructose and glucose) was measured with DNS (Dinitrosalicylic acid) reagent (Miller, 1959).

### 2.7. Ethanol and volatile compounds determination

Volatile compound profiles were obtained using a dynamic Head Space Sampler (HSS Model 7694 E, Hewlett Packard, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) coupled to a gas chromatograph (GC Hewlett Packard 6890, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) with a flame ionization detector (FID). A 2 mL sample of must was introduced into a 20 mL vial, which was immediately sealed and stored at  $-20$  °C until analysis. Each vial was equilibrated at

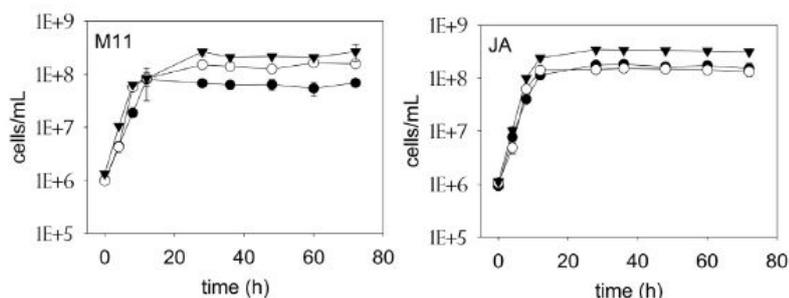


Fig. 1. Growth kinetics of free yeasts in semi-synthetic medium (M11) and agave juice medium (JA) for the yeasts AR5 (*Saccharomyces cerevisiae*) ●, DU3 (*Kluyveromyces marxianus*) ○ and GRO3 (*Pichia kluyveri*) ▼.

80 °C for 5 min in the HSS and shaken for 1 min, pressurized with carrier gas for 12 s, loaded into the sample loop for 12 s, equilibrated for 30 s, and finally injected into the column for 1 min. Loop temperature was 110 °C and the transfer line temperature was 115 °C.

Substances were separated on a polyethylene glycol capillary column (HP-Innowax, 60 m × 0.32 mm i.d.; film thickness, 0.25 μm) and analysed by GC under the following conditions: 45 °C for 7 min, heated at 10 °C/min up to 160 °C, heated at 20 °C/min to 220 °C, and maintained at 220 °C for 8 min. Injector and detector temperatures were set at 250 °C. The carrier gas was helium at a flow rate of 1.8 mL/min. Data acquisition and analysis were performed using software supplied by the manufacturer (Arellano, Gschaedler, & Alcazar, 2011).

Compounds were identified according to their retention times, obtained with ethanol, methanol, ethyl acetate, 3-methylbut-1-yl ethanoate (isoamyl acetate), ethanal (acetaldehyde), 2-methylpropan-1-ol (isobutanol), propan-1-ol (propanol), 2-methylbutan-1-ol and 3-methylbutan-1-ol (amylic alcohols), which were purchased from Sigma–Aldrich Canada (Oakville, ON, Canada). Volatile compounds were quantified with ChemStation software (Agilent), by comparing retention indices with those of pure standard compounds and using calibration curves obtained in hydroalcoholic solution covering the normal concentration range of the substances in tequila.

### 2.8. Consumable nitrogen by Sørensen method

The formol-titration method was used to determine the amino-acid nitrogen in the medium. A 100 mL sample was mixed with 40 mL of neutralized formaldehyde. The solution was titrated with NaOH 0.1 mol/L (Brown, 1922; Sørensen, 1907).

### 2.9. Statistical analyses

The statistical analyses used to compare fermentative performances were one-way Analysis of variance (ANOVA) to test for significant differences between the media, the strains, and the immobilized yeasts. Principal component analysis (PCA) was also carried out on the concentration of volatile compounds, ethanol yield, and yeast population in order to visualize relationships between variables. Statistical analyses were performed using Statgraphics Centurion XVI statistical software.

## 3. Results and discussion

Each strain was cultivated as free cells in both agave juice (JA) and semi-synthetic medium (M11). Because the behaviour of free cells was better in agave juice, this medium was selected for the

study of the influence of immobilization. Figs. 1 and 2 show the growth evolution of the different strains, both free and immobilized, and Fig. 3 depicts sugar concentration throughout the fermentations. In Tables 1 and 2, the final concentrations of ethanol, sugar, yeast population and the main volatile compounds are shown for both media. Table 3 presents the *p*-value results of the ANOVA analysis.

### 3.1. Yeast population

#### 3.1.1. Free cells

Fig. 1 shows the kinetics of growth of the free yeasts. Final populations were found to range from 6.90E+07 cells/mL (AR5 M11) to 3.13E+08 cells/mL (GRO3 JA). In both media, the GRO3 (*P. kluyveri*) strain showed the highest population. For AR5 and GRO3, the final concentration of yeast was higher in JA than in medium M11. These results point out that non-*Saccharomyces* yeast growth is similar to or greater than that of *S. cerevisiae* (AR5). The differences in final population could be statistically attributed to the strain factor (Table 3).

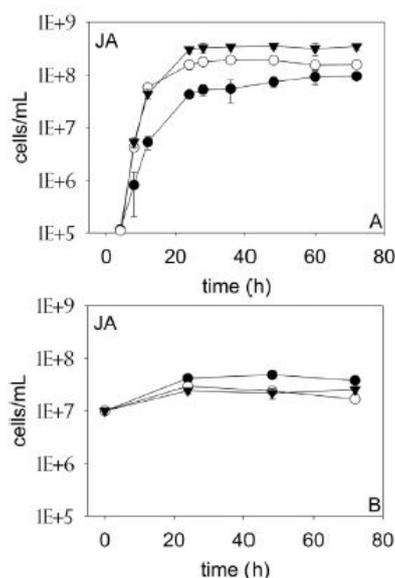


Fig. 2. Growth kinetics of immobilized yeasts in agave juice medium (JA) for AR5 (*Saccharomyces cerevisiae*) ●, DU3 (*Kluyveromyces marxianus*) ○ and GRO3 (*Pichia kluyveri*) ▼ (2A: yeast cells in liquid medium; 2B: yeast cells immobilized in the beads).

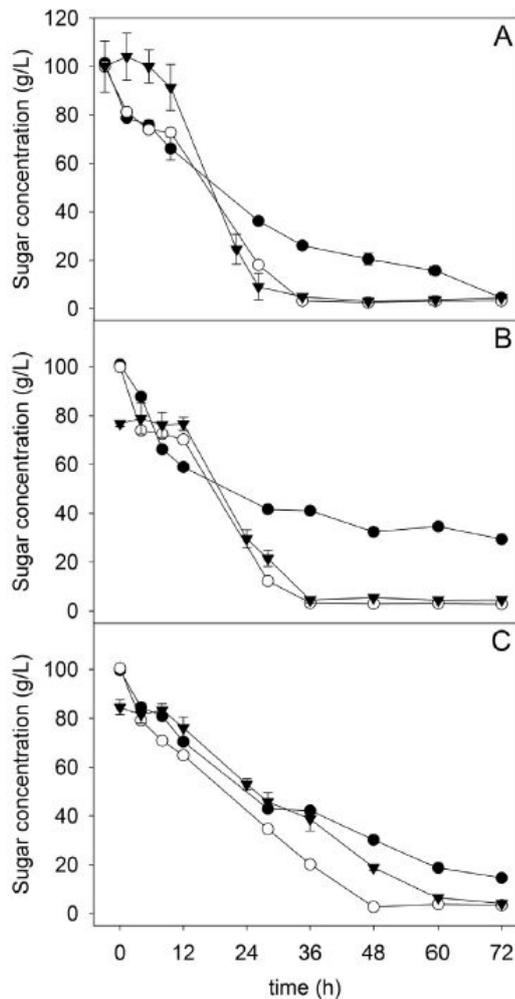


Fig. 3. Sugar consumption kinetics in agave juice medium (JA) and semi-synthetic medium (M11) medium with free and immobilized yeasts. Fig. 3A (AR5, *Saccharomyces cerevisiae*): ● M11 AR5 free, ○JA AR5 free, ▼JA AR5 immobilized. Fig. 3B (DU3, *Kluyveromyces marxianus*): ● M11 DU3 free, ○JA DU3 free, ▼JA DU3 immobilized. Fig. 3C (GRO3 *Pichia kluyveri*): ● M11 GRO3, ○JA GRO3, ▼JA GRO3 immobilized.

Similar behaviour was observed by Sadoudi et al. (2012) for different non-*Saccharomyces* in wine fermentations, with a sugar concentration of 200 g/L. Under this condition, the maximal number of cells obtained with *S. cerevisiae* was  $1.48E+08$  (on day 5), while with non-*Saccharomyces* *C. zemplinina* achieved  $2E+08$  (on day 6). As in our study with free cells, the highest population was obtained with non-*Saccharomyces*.

### 3.1.2. Immobilized cells

Fig. 2 illustrates the kinetics of fermentations inoculated with immobilized cells, and presents the growth of free cells in the medium after the inoculation (Fig 2A) and of immobilized yeast included in the beads (Fig 2B). The non-*Saccharomyces* tended to grow more in the free medium, while *S. cerevisiae* (AR5) grew more inside the beads. As in the free cell culture (Fig. 1), GRO3 presented the highest final population. No significant differences were observed between the final populations with free or immobilized yeast for a given strain.

The initial cell concentration included in the beads of each strain was  $10E+06$  cells/mL and, at the end of the fermentation, the AR5 concentration was  $38E+06$  cells/mL, for DU3  $16.7E+06$  cells/mL and for GRO3  $25E+06$  cells/mL (cell concentrations inside the beads). These results are evidence of yeast cell growth inside the beads, the highest population being detected with *S. cerevisiae* (AR5). Growth was also observed in the liquid medium because the beads were not made with a double layer and the yeast cells at the surface of the beads could thus become free in the medium. This work is, to our knowledge, the first to report the behaviour of non-*Saccharomyces* yeasts immobilized in pure culture, and highlights behaviour very different from that observed with *S. cerevisiae*.

### 3.2. Sugar consumption

Fig. 3 compares for each strain the kinetics of sugar concentration during the free and immobilized fermentations in medium M11 and JA. The sugar consumption after 72 h was always faster in JA with free cells than in M11 medium. After 36 h of fermentation, AR5 and DU3 had consumed nearly all the sugar present in the JA medium, while GRO3 took a further 12 h to achieve this. In contrast, the residual sugar concentrations in M11 were higher, particularly in the case of *Kluyveromyces* DU3 (29.4 g/L).

The observations generally reported in the literature for wine yeasts show that *S. cerevisiae* strains cause faster fermentation than non-*Saccharomyces* strains (Romano et al., 2003). Sadoudi et al.

Table 1

Residual sugar, ethanol, total yeasts and major volatile compounds final concentrations in fermentations with free yeasts, AR5 (*Saccharomyces cerevisiae*), DU3 (*Kluyveromyces marxianus*), GRO3 (*Pichia kluyveri*) in JA and M11.

	M11 AR5	M11 DU3	M11 GRO3	JA AR5	JA DU3	JA GRO3
Acetaldehyde (mg/L)	161 ± 122.2	7 ± 4.3	25 ± 2.79	86 ± 56.19	28 ± 6.63	33 ± 1.8
Ethanol (g/L)	41 ± 2.47	16.6 ± 0.91	33.4 ± 0.48	30 ± 3.38	30.21 ± 0.34	30 ± 2.32
Methanol (mg/L)	5.83 ± 0.5	5.94 ± 0.52	4 ± 5.51	42.74 ± 0.85	45 ± 3.68	47 ± 4
Ethylacetate (mg/L)	13 ± 2.61	138 ± 8.36	658 ± 48.27	2.08 ± 0.87	33.05 ± 1.31	257 ± 29.92
Isoamylacetate (mg/L)	ND	ND	6.67 ± 1.28	ND	ND	3.39 ± 0.48
1-Propanol (mg/L)	20 ± 4.98	18.18 ± 0.54	7.02 ± 0.8	14 ± 2.55	11.34 ± 0.24	5.67 ± 0.53
Isobutanol (mg/L)	20.46 ± 0.32	70.31 ± 0.06	1.72 ± 5.82	19 ± 4.05	107 ± 14.42	123 ± 4.16
1-Butanol (mg/L)	0.21 ± 0.23	ND	ND	0.49 ± 0.04	0.07 ± 0.1	ND
Amylcohols (mg/L)	31 ± 5.06	70.62 ± 1.46	6.27 ± 1.27	72 ± 16.06	188 ± 7.85	15.87 ± 0.54
Initial sugar (g/L)	101.46 ± 0.74	100.94 ± 0.74	99.63 ± 0.37	103.06 ± 0.89	104.53 ± 1.19	100.55 ± 0.89
Final sugar (g/L)	4.48 ± 1.15	29.37 ± 1.4	14.64 ± 0.07	3.25 ± 0.98	2.81 ± 0.18	3.46 ± 0.03
Sugarconsumed (g/L)	96.99 ± 0.41	71 ± 2.14	84.99 ± 0.44	99.81 ± 0.09	102 ± 1.37	97.08 ± 0.92
Final population yeast (cell/mL)	$6.90E+07 ± 1.41E+06$	$1.58E+08 ± 7.78E+06$	$2.69E+08 ± 9.40E+07$	$1.53E+08 ± 3.89E+07$	$1.33E+08 ± 2.47E+07$	$3.13E+08 ± 5.66E+06$
Ethanol yield	0.426 ± 0.02	0.232 ± 0.01	0.392 ± 0.01	0.297 ± 0.03	0.297 ± 0	0.308 ± 0.02

ND = Non detected. JA = agave juice. M11 = semi-synthetic medium.

**Table 2**

Residual sugar, ethanol, total yeasts and major volatile compounds final concentrations in fermentations with the immobilized yeasts, AR5 (*Saccharomyces cerevisiae*), DU3 (*Kluyveromyces marxianus*), GRO3 (*Pichia kluyveri*) in JA.

	JA AR5 <sup>a</sup>	JA DU3 <sup>a</sup>	JA GRO3 <sup>a</sup>
Acetaldehyde (mg/L)	180 ± 38.21	59 ± 5.6	40.08 ± 1
Ethanol (g/L)	33 ± 6.39	31 ± 3.35	31.91 ± 1.18
Methanol (mg/L)	9 ± 2.28	8.62 ± 1.23	9.19 ± 0.44
Ethyl acetate (mg/L)	0.88 ± 1.09	17 ± 3.19	251 ± 71.59
Isoamyl acetate (mg/L)	ND	ND	2.3 ± 1.19
1-Propanol (mg/L)	15 ± 3.78	15.56 ± 1.4	7.59 ± 0.49
Isobutanol (mg/L)	14 ± 5.08	101 ± 22.38	120.64 ± 1.04
1-Butanol (mg/L)	0.55 ± 0.06	ND	ND
Amylic alcohols (mg/L)	64 ± 20.06	148 ± 15.92	10.89 ± 0.26
Initial sugar (g/L)	83 ± 10.59	76.79 ± 1.32	84 ± 3.12
Final sugar (g/L)	4.47 ± 0.2	4.55 ± 0.15	4.13 ± 0.37
Sugar consumed (g/L)	79 ± 12.91	72.25 ± 0.99	80 ± 2.15
Final population yeast (cell/mL)	1.32E+08 ± 1.65E+07	1.73E+08 ± 1.34E+07	3.72E+08 ± 4.19E+07
Ethanol yield	0.412 ± 0.01	0.436 ± 0.04	0.397 ± 0

<sup>a</sup> Immobilized yeast cells. ND = Non detected. JA = agave juice. M11 = semi-synthetic medium.

(2012) also showed that sugar consumption by *S. cerevisiae* was faster than that of non-*Saccharomyces*.

Immobilization of the DU3 and AR5 strains did not affect the consumption of sugar, giving identical sugar consumption profiles on JA. GRO3 immobilization affected the sugar consumption more: it was slightly slower when cells were immobilized but these differences were not statistically significant (Table 3).

In all the strains, the sugar consumption rate proved to be affected by immobilization during the first 12 h and presented a latency stage at the beginning of the fermentation. This may have been due to the limitation of nutrient transfers into the immobilization matrix as reported by Converti, Casagrande, De Giovanni, Rovatti, and Del Borghi (1996) and Verbelen et al. (2006). However, the diameter of the alginate beads played an important role in the transfer of nutrients when immobilized yeast was used. According to the literature, a diameter between 1.5 mm (Abraham & Surender, 1993) and 4 mm (Shiotani & Yamané, 1981) is recommended. In order to avoid nutrient transfer limitation in this study, beads with an average diameter of 2 mm were used.

### 3.3. Ethanol production and yield of sugar conversion to ethanol

Final ethanol concentrations ranged between 16.6 g/L with free DU3 in medium M11 and 41.3 g/L with free AR5 in medium M11 (Table 1). In the M11 medium, each strain had a different final ethanol concentration. In contrast, all the strains presented similar ethanol production in JA (30 g/L).

Because the amount of sugar consumed differed among experiments, the ethanol yield was calculated. The highest yield obtained was 0.426 g/g, given by free *S. cerevisiae* (AR5), and the lowest yield, 0.232 g/g, was for free *K. marxianus* (DU3) in M11 medium (Table 1). Better yields were obtained with immobilized yeasts (Table 2). Non-*Saccharomyces* DU3 and GRO3 showed low yields in M11 medium with free yeast. Thus, if the medium is adequate, non-*Saccharomyces* yeasts are able to exhaust sugar and produce satisfactory levels of ethanol (similar to the concentration obtained in the industry). The significant differences found in the ethanol yield were due to the immobilization effect only (Table 3).

**Table 3**

ANOVA *p*-value (\**p* < 0.05).

Main effects	Residual sugar	Total yeast	Ethanol yield Y p/s	Ethyl acetate	Isoamyl acetate	1-Propanol	Isobutanol	Amylic alcohols	Acetaldehyde
A:strain	0.0806	<b>0.0000*</b>	0.1251	<b>0.0000*</b>	<b>0.0000*</b>	<b>0.0000*</b>	<b>0.0000*</b>	<b>0.0000*</b>	<b>0.0011*</b>
B:immobilization	0.7218	0.9920	<b>0.0148*</b>	0.8896	0.5931	0.1137	0.7217	0.2201	0.1165
C:medium	<b>0.0018*</b>	0.1821	0.0631	<b>0.0081*</b>	0.1222	<b>0.0044*</b>	0.7077	<b>0.0013*</b>	0.5647

Similarly, Mariam, Manzoor, Ali, and Haq (2009) reported that the use of immobilized *Saccharomyces* for bioethanol production gave better results and Babu, Satyanarayana, Balakrishnan, Rao, and Rao (2012) found high fermentation efficiencies (from 91 to 95%) in repeated batch experiments with immobilized *Saccharomyces* (both authors used sugar cane molasses, and Babu et al. sugar cane juice too). Norton, Watsin, and D'amore (1995) suggested that the matrix structure could protect the immobilized *Saccharomyces* against ethanol.

### 3.4. Production of acetaldehyde

Acetaldehyde is the last intermediate compound in the production of ethanol. At high concentrations (more than 40 mg/mL of anhydric alcohol in the final product), it is considered to have a negative impact on aroma (Escalona Buendía et al., 2004). The maximum concentration of acetaldehyde was obtained in JA with immobilized AR5 (180 mg/L). The minimal concentration was 7 mg/L, obtained in M11 with free DU3 (Tables 1 and 2). No significant differences in the acetaldehyde production were detected between immobilized and free cells or between JA and M11 media; significant differences were observed only between strains (Table 3).

### 3.5. Production of higher alcohols

The production of higher alcohols, considering 1-propanol, isobutanol, 1-butanol and amylic alcohols, showed differences in concentration due to the strain factor but no influence of immobilization was detected (Table 3). Production of 1-propanol was also dependent on the medium factor (Table 3). In general, the highest concentrations were observed with the strain AR5 (Tables 1 and 2).

Isobutanol concentrations, in comparison with 1-propanol concentrations, had opposite production profiles, in which the GRO3 strain produced the highest concentration, followed by DU3, and the lowest isobutanol concentration was observed with AR5 strain (Table 1). Isobutanol production was influenced only by the

strain factor (Table 3). In this study, large differences between yeast species were highlighted.

Amylic alcohols were produced at a higher concentration than the other higher alcohols studied. In this case, the DU3 strain provided the highest concentration, followed by AR5, and the GRO3 strain gave the lowest concentration (Table 1). The production of amyl alcohols was always higher in JA than in M11. Statistical significant differences in the amyl alcohols production were found for the factors medium and strain (Table 3).

1-butanol was the higher alcohol that was produced at the lowest concentration in comparison with the other higher alcohols studied. Non-*Saccharomyces* did not produce 1-butanol. It was produced only by the AR5 strain and at a higher concentration in JA (0.49 mg/L) (Table 1).

Higher or fusel alcohol formation takes place by the anabolic and catabolic route. In the anabolic route, the 2-oxo acids are formed via de-novo biosynthesis of amino acids. They are transformed to aldehydes by a decarboxylation, which is termed the catabolic (Ehrlich) route to higher alcohol formation. In the catabolic route, higher alcohol concentration is determined by the amino acid concentration in the medium and the sugar consumption rate. In addition, some higher alcohols could be generated from the reduction of aldehydes and ketones present in the fermentation medium. So the production of higher alcohols is generally correlated with the nitrogen concentration (Brányik, Vicente, Dostálek, & Teixeira, 2008; Carrau et al., 2008; Pires, Teixeira, Brányik, & Vicente, 2014). Assimilable nitrogen concentration in the agave juice, basically in the form of amino acids, was 47.9 mg/L. In M11 medium, it was 40.9 mg/L, brought by the yeast extract (1 g/L). The concentration of inorganic nitrogen, added as  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , was 100 mg/L in agave juice and 200 mg/L in M11 medium. Arrizon and Gschaedler (2007) reported that the ratio of organic/inorganic nitrogen in the medium affected the production of higher alcohols, showing that, when the inorganic nitrogen concentration was higher in relation to the organic nitrogen concentration, the amylic alcohol concentration decreased and the propanol concentration increased. In the present study, the same behaviour was observed, principally in JA. For example, AR5 amylic alcohol concentration was 72.8 mg/L while propanol concentration was 14.0 mg/L. Even with the GRO3 strain, which produced the weakest higher ethanol concentration, this effect was observed in JA.

Regarding immobilization, Smogrovicová and Dömény (1999) observed that the higher-alcohol production increased when yeast was immobilized, especially concerning the production of 1-propanol. In our case, no differences in higher-alcohol concentrations were observed between free and immobilized fermentations. According to Virkajärvi and Pohjala (2000), the low concentration of higher alcohols produced by immobilized yeasts is due to the limitation of mass transfer within the alginate beads. Again, in our case, such a limitation could not be incriminated.

Investigating the strain effect, Sadoudi et al. (2012) found that the non-*Saccharomyces* produced a lower concentration of higher alcohols in Sauvignon Blanc juice for wine production than *S. cerevisiae* did. In our case, the non-*Saccharomyces* GRO3 (*P. kluyveri*), produced a lower concentration of higher alcohols than AR5 (*S. cerevisiae*) in both media studied, but the opposite was found with DU3 (*K. marxianus*), which produced higher concentrations than AR5 (*S. cerevisiae*). It is important to mention that Sadoudi et al. (2012) did not include *K. marxianus* in their study. In fermentations of agave juice, Diaz-Montaña, Délia, Estarrón-Espinosa, and Strehaiano (2008) reported that *S. cerevisiae* produced stronger concentrations of higher alcohols (amyl alcohol, n-propanol, isobutanol) in comparison with strains of the genus *Kloeckera*, which produced more ethyl acetate. In this work, the two non-*Saccharomyces* yeasts tested presented different behaviour;

*K. marxianus* produced stronger concentrations of higher alcohols than *S. cerevisiae*, and *P. kluyveri* showed the lowest production. Thus, the case of non-*Saccharomyces* cannot be generalized. The production of higher alcohols depends directly on the yeast species, some of them producing more higher alcohols than *S. cerevisiae*, as observed with *K. marxianus* strain in this study.

### 3.6. Production of esters

The two non-*Saccharomyces* strains considered in this study showed a great production of esters (ethyl acetate and isoamyl acetate) in comparison with *S. cerevisiae*. The production was greater in M11 medium than that obtained in JA (Table 1). Significant statistical differences in the production of ethyl acetate were observed due to the strain and the medium (Table 3). Isoamyl acetate production was only detected in fermentations with strain GRO3, with higher production in M11 medium (Table 1).

The synthesis of esters has been studied in *S. cerevisiae*. They are formed enzymatically during fermentation and contribute to the fruity and floral sensory properties of the beverages. Flavour-active esters are the products of acetyltransferase activities catalysing the condensation reaction between acetyl-CoA and a higher alcohol or ethanol. The production of acetate esters during fermentation is dependent on the activity of at least three acetyltransferases in *S. cerevisiae*, and is correlated with the C:N ratio, unsaturated fatty acids, and free oxygen concentrations in the medium. It is significantly related to ATF1 and ATF2 gene expression (Saerens et al., 2008; Verstrepen et al., 2003). Non-*Saccharomyces* yeasts are generally considered to be greater ester producers (Ciani et al., 2010), which was confirmed in this study. In wine fermentation *Hanseniaspora* yeasts produce high concentrations of desirable volatile compounds such as ethyl acetate (fruity), phenyl ethyl acetate (floral), phenethylalcohol (rose) and acetoin (butter), which have an impact on the final aroma bouquet of the beverage (Moreira, Mendes, Hogg, & Vasconcelos, 2005; Romano et al., 2003). Other examples include studies performed with Pinot noir grape and Chardonnay juice, which were fermented with the yeasts *Pichia membranaefaciens* and *Kloeckera* in an attempt to increase the number of flavours in the wine.

High concentrations of ethyl acetate, isoamyl acetate, acetaldehyde and ethanol were observed (Mamede, Cardello, & Pastore, 2005). Nevertheless, no research has reported the regulatory mechanisms that allow this high production of esters.

The effect of cell immobilization on ester production was not significant according to the statistical analysis (Table 3) despite slight differences for AR5 and DU3 (Tables 1 and 2). In other studies using *S. cerevisiae* in beer and wine fermentation, cell immobilization was correlated with an increase in the production of esters (Mallouchos, Komaitis, Koutinas, & Kanellaki, 2003; Willaert & Nedovic, 2006). However such behaviour was not observed in this study, in which yeast strains and culture media were shown to be the dominant factors (Table 3).

In our study, non-*Saccharomyces* produced up to 130 times more ethyl acetate than *S. cerevisiae* under the same fermentation conditions, which opens up new perspectives for continuing the study of the non-*Saccharomyces* ester production metabolism.

### 3.7. PCA statistical analysis

Finally, a PCA analysis was carried out in order to observe the correlations between the different variables. Here 84.5% of variance was explained by 3 different components. An interesting finding in the PCA plot (Fig. 4) was that variables grouped the GRO3 strain at the left side and strains AR5 and DU3 on the opposite side. The GRO3 strain had a correlation with high yeast population, and ester

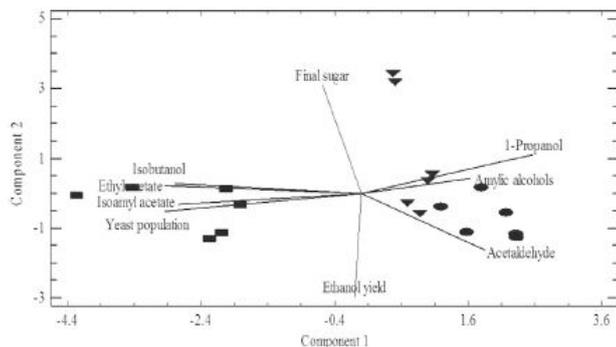


Fig. 4. Principal components plot of the volatile compounds produced and correlated with each yeast strain studied. ●AR5 (*Saccharomyces cerevisiae*), ▼DU3 (*Kluyveromyces marxianus*), ■GRO3 (*Pichia kluyveri*).

and isobutanol concentration. High residual sugar concentration was correlated with the DU3 strain in M11 medium. AR5 and DU3 strains were correlated with acetaldehyde, amylic alcohols and 1-propanol, meaning that these strains had similar profiles in JA. The PC1 explains incomplete fermentation, where less sugar consumption produces a smaller yeast population and high acetaldehyde concentration, but the ethanol yield is not affected.

#### 4. Conclusions

The three strains showed different behaviours. Non-*Saccharomyces* proved to be greater ester producers in pure culture. The GRO3 strain not only produced the highest concentration of ethyl acetate, but also produced the highest concentration of isoamyl acetate and weaker higher-alcohol concentrations. The DU3 strain produced stronger ester concentrations in comparison with AR5, but also stronger higher-alcohol concentrations.

Generally speaking, the strategy of cell immobilization did not have obvious positive effects on the performance of the fermentation, regarding both sugar consumption and ester production.

Comparing the two media, the *S. cerevisiae* (AR5) strain was more robust, since it attained good results in both of the media studied, whereas non-*Saccharomyces* achieved better results in JA than in M11 medium. Thus, in studies with non-*Saccharomyces*, it is important to work with a medium as similar as possible to the natural medium in which the strain was isolated.

The main conclusion is that the non-*Saccharomyces* strains studied in this work were able to ferment the agave juice to produce tequila with an ethanol concentration similar to that of *S. cerevisiae* and with higher concentrations of esters.

#### Acknowledgements

This work (project 2009 05 123157) was supported by the mixed fund of Jalisco (FOMIX JALISCO), by the National Research Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT), and by the Doctoral Training Cooperation Programme (PCP programme, CONACYT) between France and Mexico. PhD student Luis Segura Garcia thanks CONACYT for the scholarship provided.

#### References

Abraham, T. E., & Surender, G. D. (1993). Horizontal rotator bioreactor: effect of rotation and bed characteristics on ethanol fermentation with immobilized yeast cells. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75, 322–324.

Amaya-Delgado, L., Herrera-Lopez, E. J., Arrizon, J., Arellano-Plaza, M., & Gschaedler, A. (2013). Performance evaluation of *Pichia kluyveri*, *Kluyveromyces*

*marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in industrial tequila fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 875–881.

Arellano, M., Gschaedler, A., & Alcazar, M. (2011). Major volatile compounds analysis produced from mezcal fermentation using gas chromatography equipped headspace (GC-HS). In B. Salih, & O. Celikbiçak (Eds.), *Gas chromatography in plant science, wine technology, toxicology and some specific applications* (pp. 73–88). In Tech.

Arrizon, J., & Gschaedler, A. (2007). Effects of the addition of different nitrogen sources in the tequila fermentation process at high sugar concentration. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 1123–1131.

Babu, N. K., Satyanarayana, B., Balakrishnan, K., Rao, T. R., & Rao, G. S. (2012). Study of sugarcane pieces as yeast supports for ethanol production from sugarcane juice and molasses using newly isolated yeast from toddy sap. *Mycobiology*, 40, 35–41.

Brányik, T. A., Vicente, A. A., Dostálek, P., & Teixeira, J. A. (2008). A review of flavour formation in continuous beer fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, 114, 3–13.

Brown, J. H. (1922). The formol titration of bacteriological media. *Journal of Bacteriology*, 8, 245–267.

Carrau, F. M., Medina, K., Farina, L., Boido, E., Schenke, P. A., & Dellacassa, E. (2008). Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Research*, 8, 1196–1207.

Cedeno, M. (1995). Tequila production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 15, 1–11.

Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, L., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research*, 10, 123–133.

Ciani, M., & Picciotti, G. (1995). The growth kinetics and fermentation behavior of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotechnology Letters*, 17, 1247–1250.

Ciesarová, Z., Dömény, Z., Smogrovicová, D., Pátková, J., & Sturdík, E. (1998). Comparison of ethanol tolerance of free and immobilized *Saccharomyces uvarum* yeasts. *Folia Microbiologica*, 43, 55–58.

Converti, A., Casagrande, M., De Giovanni, M., Rovatti, M., & Del Borghi, M. (1996). Evaluation of glucose diffusion coefficient through cell layers for the kinetic study of an immobilized cell bioreactor. *Chemical Engineering Science*, 51, 1023–1026.

Diaz-Montano, D. M., Délia, M. L., Estarrón-Espinosa, M., & Strehaiano, P. (2008). Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from Agave tequilana Weber juice. *Enzyme and Microbial Technology*, 42, 608–616.

Diaz-Montano, D. M., Favela-Torres, E., & Córdova, J. (2010). Improvement of growth, fermentative efficiency and ethanol tolerance of *Kloeckera africana* during the fermentation of Agave tequilana juice by addition of yeast extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 321–328.

Escalona Buendía, H. B., Villanueva Rodríguez, S. J., López Ramírez, J. E., González Herrera, R. M., Martín del Campo Barba, T., Estarrón Espinosa, M., et al. (2004). Calidad del Tequila como producto terminado. In A. Gschaedler (Ed.), *Ciencia y Tecnología del Tequila Avances y perspectivas*, CIATEJ, Mexico (pp. 172–252).

Fleet, G. H., & Heard, G. M. (1993). Yeast: growth during fermentation. In G. H. Fleet (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology* (pp. 27–57). Chur Switzerland: Harwood Academic Publishers.

Lachance, M. A. (1995). Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 68, 151–160.

Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizón-Gaviño, J., Herrera-Suarez, T., García-Mendoza, A., & Gschaedler-Mathis, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic non distilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Research*, 8, 1037–1052.

López-Alvarez, A., Díaz-Pérez, A. L., Sosa-Aguirre, C., Macías-Rodríguez, L., & Campos-García, J. (2012). Ethanol yield and volatile compound content in fermentation of agave must by *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 comparing with *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast used in tequila production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113, 614–618.

Mallouchos, A., Komaitis, M., Koutinas, A., & Kanellaki, M. (2003). Wine fermentations by immobilized and free cells at different temperatures. Effect of immobilization and temperature on volatile by-products. *Food Chemistry*, 80, 109–113.

Mamede, M. E. O., Cardello, H. M. A. B., & Pastore, G. M. (2005). Evaluation of an aroma similar to that of sparkling wine: sensory and gas chromatography analyses of fermented grape musts. *Food Chemistry*, 89, 63–68.

Mariam, I., Manzoor, K., Ali, S., & Haq, I. U. (2009). Enhanced production on ethanol from free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* under stationary culture. *Pakistan Journal of Botany*, 41, 821–833.

Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426–428.

Moreira, N., Mendes, F., Hogg, T., & Vasconcelos, I. (2005). Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 285–294.

Norton, S., Watsin, K., & D'amore, T. (1995). Ethanol tolerance of immobilized brewers' yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 18–24.

Pres, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., & Vicente, A. A. (2014). Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 1937–1949.

- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., & Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavor. *International Journal of Food Microbiology*, *86*, 169–180.
- Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J. J., Ballester, J., et al. (2012). Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeast. *Food Microbiology*, *32*, 1–11.
- Saerens, S. M. G., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., & Delvaux, F. R. (2008). Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*, 454–461.
- SECOFI. (2012). NOM-006-SCFI-2012. *Bebidas Alcohólicas—Tequila, Especificaciones*. Mexico: Norma Oficial Mexicana Diario Oficial 6 de Enero.
- Shiotani, T., & Yamané, T. (1981). A horizontal packed-bead bioreactor to reduce CO<sub>2</sub> gas holdup in the continuous production of ethanol by immobilized yeast cells. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, *13*, 96–101.
- Smogrovicová, Z., & Dömény, Z. (1999). Beer volatile by-product formation at different fermentation temperature using immobilized yeasts. *Process Biochemistry*, *34*, 785–794.
- Sørensen, S. L. P. (1907). *Compte-rendus des Travaux du Lab de Carlsberg. Études enzymatiques* (Vol. 7, p. 1).
- Verbelen, P. J., De Schutter, D. P., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., & Delvaux, F. R. (2006). Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnology Letters*, *28*, 1515–1525.
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S., et al. (2003). Flavor-active ester: adding fruitness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *96*, 110–118.
- Viana, F., Taillandier, P., Vallés, S., Strehaiano, P., & Manzanares, P. (2011). 2-phenylethyl acetate formation by immobilized cells of *Hanseniaspora vineae* in sequential mixed fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, *62*, 122–126.
- Virkjärvi, I., & Pohjala, N. (2000). Primary fermentation with immobilized yeast: some effects of carrier materials on the flavour of the beer. *Journal of Institute of Brewing*, *106*, 311–318.
- Willaert, R., & Nedovic, V. A. (2006). Primary beer fermentation by immobilized yeast – a review on flavor formation and control strategies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *81*, 1353–1367.
- Zhao, J., & Xia, L. (2010). Ethanol production from corn stover hemicellulosic hydrolysate using immobilized recombinant yeast cells. *Biochemical Engineering Journal*, *49*, 28–32.

## **7.5. CAPITULO 5 Efecto de la concentración de nitrógeno, aireación y temperatura en cultivo continuo en reactor con jugo de *Agave*, sobre la producción de etanol y compuestos volátiles son *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* y *Pichia kluyveri*.**

### 7.5.1. INTRODUCCIÓN

El incremento en la productividad volumétrica en sistemas de fermentación continua es alcanzado cuando se controla la concentración de sustrato y la concentración de biomasa activa en la fermentación. El sistema de fermentación en lote causa diferentes estados fisiológicos comparado con el sistema de fermentación en continuo, causado por las condiciones de operación, inmovilización de células y las mutaciones que surgen durante el tiempo que permanece el sistema en continuo (Brányik y col., 2008).

En un cultivo en lote, las levaduras tienen una primera etapa de adaptación al medio, seguida de la fase exponencial de crecimiento y posteriormente la fase estacionaria, donde la concentración de células viables permanece constante, hasta que se termina el sustrato. En la fermentación en continuo al llegar a la fase estacionaria se activa el sistema y se logra mantener la fase estacionaria durante un tiempo prolongado. Esto se logra debido a que comienza a enriquecerse el medio de cultivo con medio fresco y por tanto la concentración de sustrato se ve favorecida. Al mismo tiempo se retira medio con lo que se remueven los metabolitos producidos por la levadura y de esta manera se evita la represión del metabolismo por concentración de producto.

Para el estudio de diferentes condiciones ambientales así como concentración de nutrientes, en este capítulo se realizaron fermentaciones en continuo, manteniendo un estado fisiológico dinámico en equilibrio y atribuyendo cualquier cambio en la producción de metabolitos a un cambio metabólico provocado por el disturbio provocado de manera controlada durante la fase dinámica en equilibrio en cultivo en continuo. El nutriente que se estudió en este sistema fue la concentración de nitrógeno y los factores ambientales fueron la aireación y la temperatura.

### 7.5.2. METODOLOGÍA

Las fermentaciones en continuo se realizaron en fermentadores de 3L marca Applikon con un volumen de trabajo de 1.5L, las tasas de dilución se calcularon de acuerdo a la  $\mu_{max}$  de crecimiento de los cultivos puros en matraz con medio JA. Los reactores se prepararon con 1.7 L de jugo de *Agave* a 100 g/L de azúcar y se enriquecieron con 0.5 g/L de sulfato de amonio, se esterilizaron y posteriormente se inocularon teniendo una concentración inicial de  $1 \times 10^6$  cel/mL y se dejaron crecer por 12 horas en lote, tomando muestras cada 2 horas para el seguimiento del crecimiento en la evolución de la población y

después comenzar la alimentación para la fermentación en continuo. Monitoreando el cambio de pH, pero sin tener una regulación del mismo.

Una vez iniciada la alimentación (Jugo de *Agave* diluido a 100g/L enriquecido con 0.5 g/L de sulfato de amonio y esterilizado 121°C por 30 min) se esperaron 5 tiempos de residencia para lograr un estado fisiológico estable, el cual se comprobó mediante el monitoreo en línea con el que se disponía; los cuales fueron a través de los sensores de gases exhaustos de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, así como el oxígeno disuelto y el pH. Posteriormente se le agregaron 0.75 g de sulfato de amonio como un pulso directamente al reactor, para elevar la concentración de sulfato de amonio a 1 g/L en el jugo de *Agave*. Pasados 5 tiempos de residencia se comenzó a airear durante 5 tiempos de residencia, después se quitó la aireación y se esperaron 5 tiempos de residencia para lograr nuevamente un estado fisiológico estable en la levadura y continuar con los cambios de temperatura, comenzando con 5 tiempos de residencia a 25°C seguido de 5 tiempos de residencia a 20°C.

Todas las muestras que se tomaron a lo largo de la fermentación en continuo se les realizó conteo al microscopio directo en cámara de Neubauer, se centrifugaron y congelaron para posteriormente realizar la medición de la concentración de azúcares residuales por DNS y la concentración de nitrógeno amoniacal por el método colorimétrico con fenol. También se preparó un vial para la medición de compuestos volátiles mayoritarios por Headspace acoplado a un cromatógrafo de gases.

Los flujos de alimentación que se utilizaron para cada una de las cepas fueron diferentes, debido a que mostraron tener velocidades de crecimiento distintas, siendo para AR5 4.46 mL/min con un valor de  $\mu_{\max}=0.1786 \text{ h}^{-1}$ , DU3 3.9 mL/min con un valor de  $\mu_{\max}=0.1563 \text{ h}^{-1}$  y GRO3 5.95 mL/min con un valor de  $\mu_{\max}=0.2381 \text{ h}^{-1}$ .

### 7.5.3. RESULTADOS DE LAS FERMENTACIONES EN CONTINUO

Se siguió con el estudio de las cepas AR5 (*S. cerevisiae*), DU3 (*K. marxianus*) y GRO3 (*P. kluyveri*). Encontrando que las perturbaciones en la mayoría de los casos provocan un cambio en el metabolismo, los cuales pueden llegar a hacer más lento o bien potenciar el mismo.

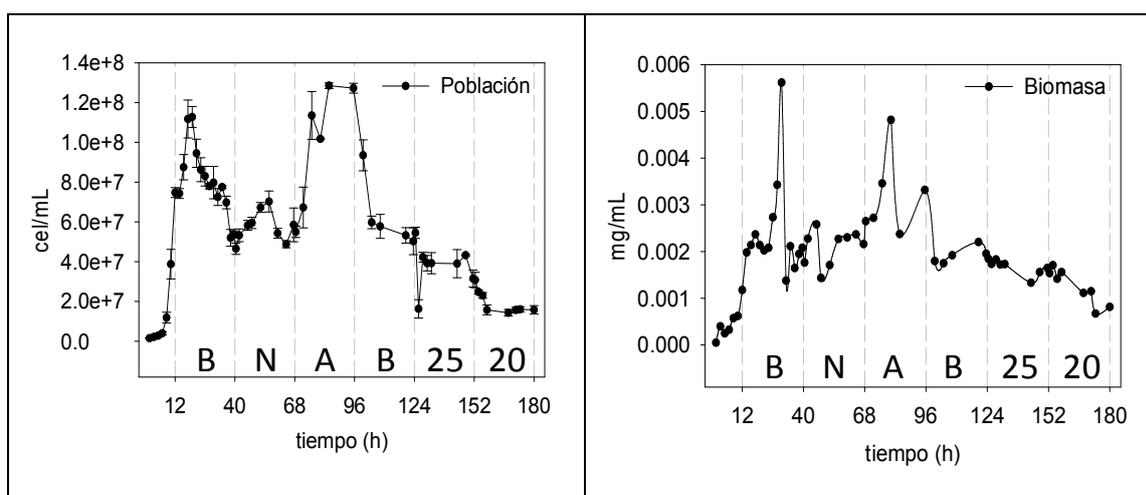
#### 7.5.3.1. FERMENTACIÓN EN CONTINUO AR5

Las gráficas que a continuación se presentan corresponden a la fermentación en continuo con la cepa AR5 (*S. cerevisiae*), la escala de tiempo se modificó de acuerdo a los cambios realizados durante la fermentación, teniendo que a las 12 horas comenzó el continuo, a las 40 horas se le adicionó el sulfato de amonio para aumentar la concentración de nitrógeno, a las 68 se comenzó la aireación a 0.5 vvm, a las 96 se quitó la aireación para permitir que la levadura en el cultivo regresara al mismo estado fisiológico de inicio, a las

124 horas se cambio la temperatura a 25°C, a las 152 h se cambio la temperatura a 20°C para finalmente terminar a las 180 horas. Las escalas en la concentración no son las mismas para todas las fermentaciones, se dejaron escalas diferentes para poder apreciar los cambios que ocurren con cada una de ellas.

En la **figura 7.5.1.** se muestran las concentraciones de células y biomasa durante la fermentación en continuo con la cepa AR5 (*S. cerevisiae*), observando un incremento en las primeras 12 horas, lo que corresponde a la fase exponencial de crecimiento del sistema en lote, una vez comenzado el sistema de alimentación de jugo fresco, la levadura sigue creciendo durante las primeras horas, pero después comienza a disminuir la concentración lentamente hasta estabilizarse, esto ayudado también debido a que se saca medio de cultivo a la misma velocidad que la alimentación, sacando no solo medio sino también células vivas, lo cual favorece a que se mantenga constante la población celular. A las 40 horas cuando se agrega el nitrógeno, se observa un efecto positivo en el crecimiento, aumentando la concentración celular y por tanto la biomasa. A las 68 h, se comenzó a airear, observando un efecto positivo en el crecimiento, por lo que la concentración celular aumentó alcanzando los niveles más altos durante la fermentación en continuo. A las 96 horas cuando se quitó la aireación para regresar al estado basal, la concentración celular nuevamente comenzó a bajar llegando al mismo nivel que se tenía a las 40 horas. El cambio de temperatura a 25°C afecto a las células durante las primeras horas, después de esto las células de levaduras lograron mantenerse en una concentración estable, un poco por debajo de la concentración que se tenía a 30°C. La disminución en la temperatura hace que el metabolismo de las levaduras sea más lento, por lo que la temperatura que mas afecto el crecimiento fue a 20°C donde se observó que la concentración disminuyó considerablemente, pero lograron mantenerse estables en un nivel bajo de concentración.

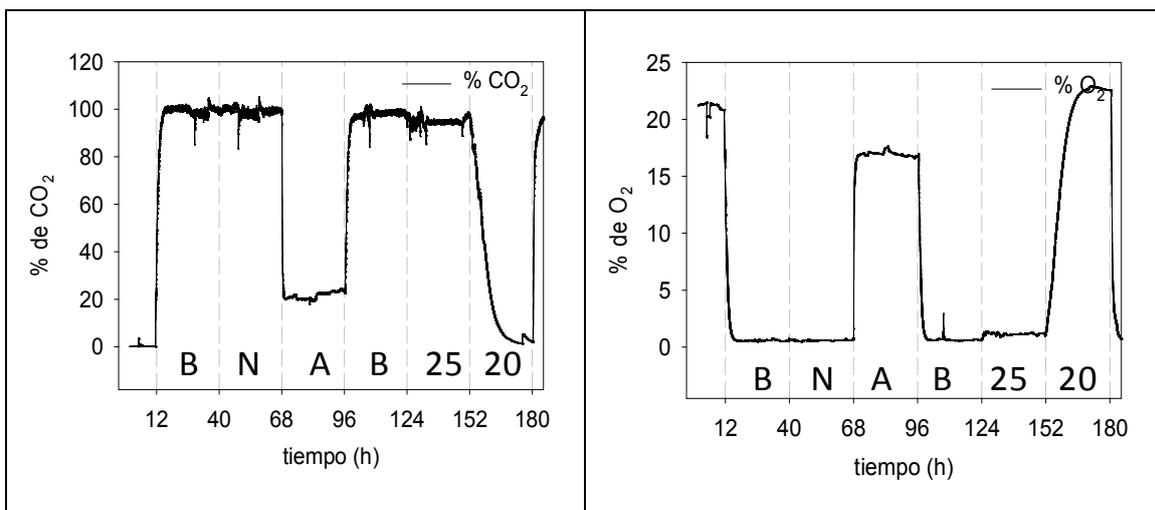
**Figura 7.5.1.** Cinética de la concentración de células y biomasa en la fermentación en continuo con la cepa AR5 (*S. cerevisiae*). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).

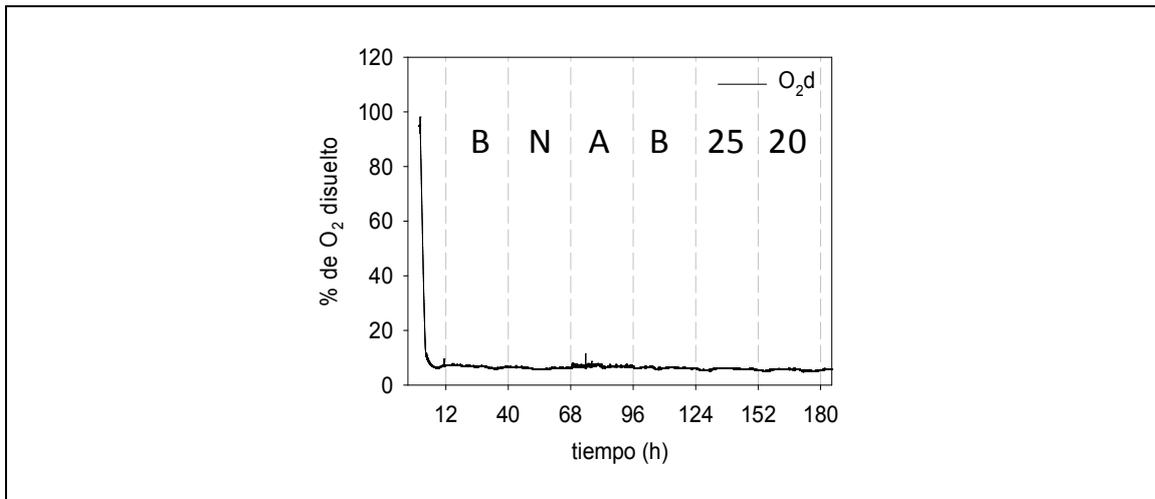


La producción de  $\text{CO}_2$  se mantuvo estable en cada una de las etapas estudiadas, observando que se logra una estabilidad metabólica con los 5 tiempos de residencia esperados en cada una de ellas (**Figura 7.5.2.**). La disminución de la concentración de  $\text{CO}_2$  observado de las 68 a las 96 horas corresponde a la etapa donde se airea el reactor, por lo que el  $\text{CO}_2$  fue diluido con el aire administrado, la temperatura de  $25^\circ\text{C}$  disminuye un poco la concentración de  $\text{CO}_2$  producida, sin verse una afectación como con la temperatura de  $20^\circ\text{C}$  donde se observa que la producción fue disminuyendo lentamente hasta llegar a cero, lo que demuestra una disminución de la actividad metabólica a  $20^\circ\text{C}$ , terminados los 5 tiempos de residencia a  $20^\circ\text{C}$  y para comprobar que las células no estaban muertas, se regreso la temperatura a  $30^\circ\text{C}$ , con lo que la actividad metabólica subió nuevamente hasta el nivel antes observado. Por otro lado la concentración de oxígeno en los gases exhaustos, muestra un comportamiento inverso al observado con el  $\text{CO}_2$ .

La concentración de oxígeno disuelto disminuye por efecto del consumo del mismo por parte de las levaduras (**Figura 7.5.2.**). Se observa una disminución de la concentración de este durante las primeras horas que corresponden a la etapa de crecimiento, hasta que llega a un nivel bajo, donde se mantiene durante todo el experimento, a pesar de haber aireado el medio de las 60 a las 96 horas, el oxígeno disuelto no vuelve a subir su concentración, lo que nos dice que el oxígeno administrado que va quedando en el medio es utilizado por las levaduras, teniendo un efecto positivo en el crecimiento. Durante las demás etapas es normal que el oxígeno disuelto este en cero, debido a que no existe una aireación del medio de cultivo.

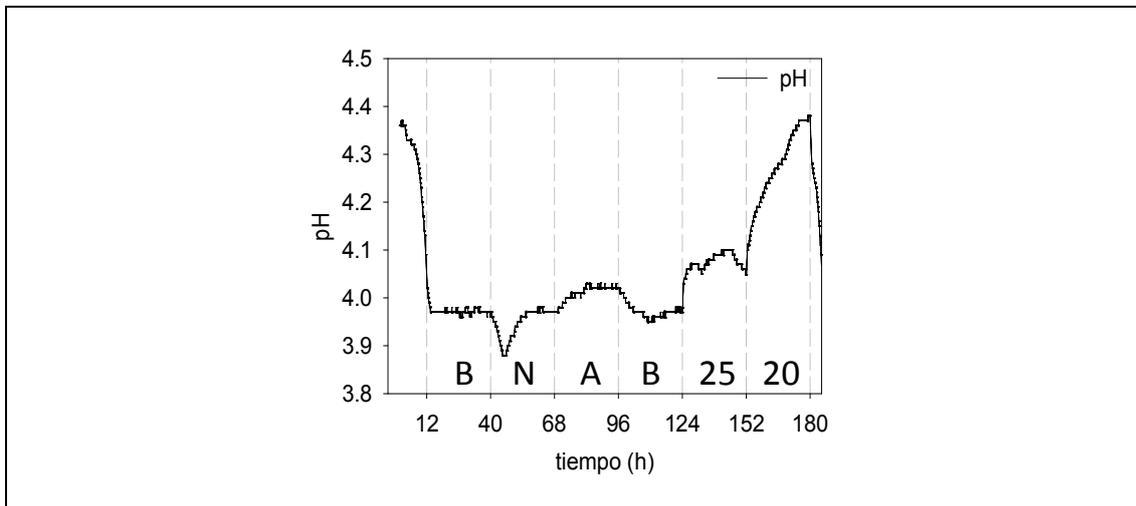
**Figura 7.5.2.** Cinética de la concentración de gases exhaustos y oxígeno diuelto en el reactor de la fermentación en continuo con la cepa AR5 (*S. cerevisiae*). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de  $25^\circ\text{C}$ ), 20 (Temperatura de  $20^\circ\text{C}$ ).





El pH muestra un comportamiento diferente en cada una de las fases estudiadas durante la fermentación en continuo (**Figura 7.5.3.**). El jugo de *Agave* es ácido de manera natural, comenzando la fermentación a un pH de 4.4 el cual disminuye hasta 4.0 y se mantiene estable en los primeros 5 tiempos de residencia. La adición de nitrógeno, causó una disminución de pH lo cual puede deberse a la producción de ácidos orgánicos por parte de la levadura hacia el medio, o bien, la asimilación de  $\text{NH}_4$  con la liberación de  $\text{H}^+$ , debido a que el nitrógeno fue administrado en forma de pulso, durante el sistema en continuo se va lavando la concentración de nitrógeno por efecto del consumo por parte de las levaduras y por efecto del mismo sistema donde se administra medio nuevo con una concentración de 0.5 g/L de sulfato de amonio. La aireación de las 68 a las 96 horas produce un aumento del pH, debido a que el metabolismo se desvía hacia el crecimiento celular en lugar de producción de metabolitos, habiendo una menor concentración de  $\text{CO}_2$  en el medio. La temperatura a 25°C provocó un aumento de pH, lo que demuestra que el metabolismo de la levadura se ve afectado, pero logra mantener una estabilidad durante los 5 tiempos de residencia, por otro lado, a 20°C se ve fuertemente afectado el metabolismo observando que el pH va aumentado lentamente hasta llegar al pH inicial del jugo, lo que nos muestra que el metabolismo de la levadura se hace muy lento, y con la temperatura tan baja, queda activo solo el metabolismo basal para mantenimiento celular, por lo que no hay producción de metabolitos secundarios, o bien, el metabolismo es muy lento en comparación al que se tiene a 30°C y como el flujo de alimentación y salida están calculados para la temperatura de 30°C.

**Figura 7.5.3.** Evolución del pH a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa AR5 (*S. cerevisiae*). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).



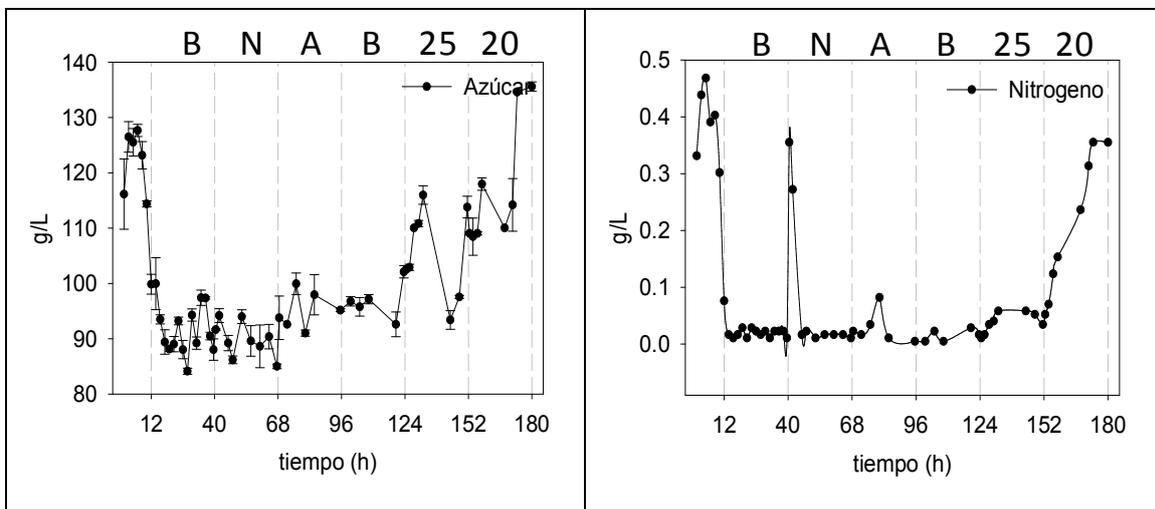
La concentración de azúcar se justo en el medio de cultivo a 100 g/L diluyendo el jugo con agua destilada, al inicio se observa un efecto de aumento de la concentración, lo cual se había observado previamente en los cultivos en matraz y en los reactores en lote. Además este efecto también es reportado en la fermentación de medio de extracto de malta para la producción de cerveza con las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida tropicalis*, donde en las primeras 4 horas la concentración de maltosa aumenta y después a las 8 horas baja, para terminar a las 16 horas la concentración en el medio (Alloue-Boraud y col., 2015).

Durante los primeros 5 tiempos de residencia se observa una disminución hasta 90 g/L, lo que demuestra que se consumen alrededor de 10g/L con la velocidad del flujo con el que se opero el sistema continuo. La adición de nitrógeno, causa una disminución de la concentración de azúcar, debido a que el metabolismo se acelera por efecto del aumento de la concentración de nitrógeno por lo que hay una mayor demanda de azúcar. Durante la aireación se observó que la concentración celular aumentó y se esperaba que la concentración de azúcar disminuyera, pero se mantiene constante al mismo nivel que se tenía durante la estabilidad. Al realizar el cambio de temperatura a 25°C, la concentración de azúcar aumenta durante las primeras horas mientras que la levadura se adapta a las nuevas condiciones y después disminuye, lo que demuestra que tiene la capacidad de poder adaptarse a la temperatura de 25°C, por otro lado cuando la temperatura del fermentador se programa a 20°C, la concentración de azúcar aumenta sin lograr adaptarse la levadura a esta

temperatura, observando un cambio progresivo durante los 5 tiempos de residencia, sin lograr llegar a una estabilidad.

La concentración de nitrógeno disminuye, lo que demuestra que se consume totalmente, el aumento a las 40 horas corresponde al pulso que se le administra al reactor de manera intencional (**Figura 7.5.4.**). Durante las primeras horas de la aireación se observa que aumenta un poco la concentración de nitrógeno, lo que se puede atribuir a una adaptación y modificación del metabolismo, debido a que durante esta etapa se observó una preferencia por el crecimiento celular. Con la temperatura de 25°C se observa un aumento de la concentración de nitrógeno, el cual se estabiliza, por lo que la levadura logra estabilizar su metabolismo a esta temperatura, pero a 20°C la concentración va aumentando lentamente hasta regresar a la concentración inicial, lo cual demuestra que el metabolismo de la levadura se va haciendo cada vez más lento sin lograr estabilizarse, por lo que la temperatura de 20°C, provoca un estrés y cambios metabólicos grandes en la levadura. Si bien la levadura hace un gran esfuerzo por mantenerse viva, no logra observarse una estabilidad en concentración celular en 5 tiempos de residencia.

**Figura 7.5.4.** Evolución de la concentración de azúcar y nitrógeno a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa AR5 (*S. cerevisiae*). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).



El etanol es el principal metabolito que se desea producir durante una fermentación alcohólica, teniendo que la concentración de etanol aumenta durante la etapa de crecimiento y logra estabilizarse su producción a lo largo de la fermentación en continuo, en la **figura 7.5.5.a** se muestra la evolución de la concentración de etanol total en el reactor

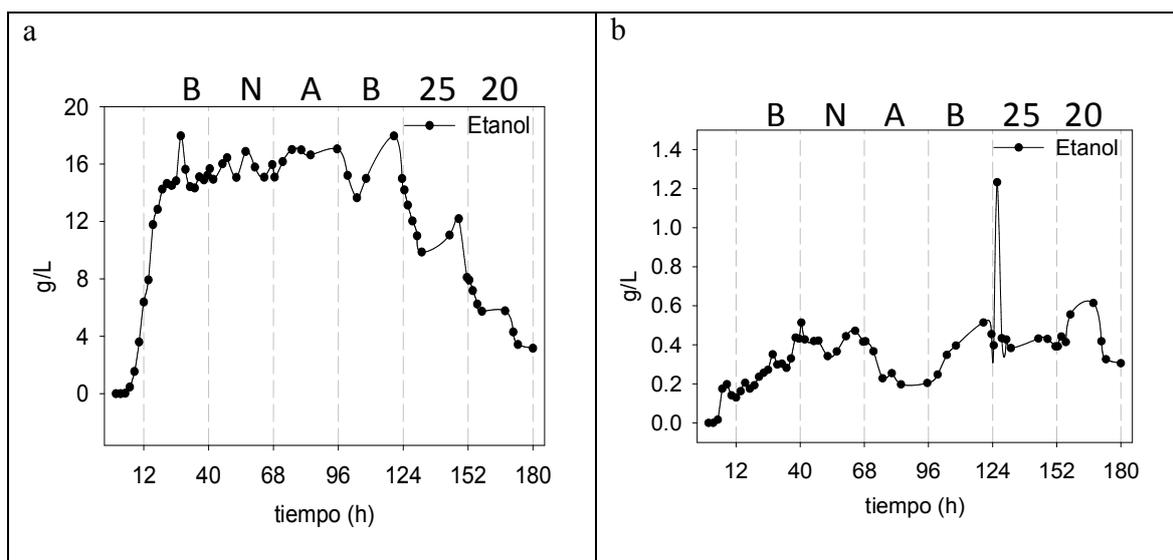
en continuo, mientras que en la **figura 7.5.5.b** se realizó una normalización en base al número de células, para observar si los cambios observados eran provocados por un cambio en el metabolismo celular o si estos correspondían a una modificación de la concentración celular. De esta manera se puede tener una visión más clara del metabolismo celular y no llegar a realizar conclusiones erróneas, debido a que el objetivo es revisar el metabolismo celular, la normalización nos ayuda a ver la cantidad de metabolito producido por cada millón de células.

La adición de nitrógeno al medio parece no tener un efecto en la producción de etanol, mientras que la aireación muestra un ligero aumento al inicio y después se estabiliza, pero la concentración producida por célula es menor. El aumento en la concentración de etanol que se observa con la aireación es efecto del aumento de la cantidad de células en el medio. Una vez que se quita la aireación a las 96 horas para regresar al nivel inicial, se observa una disminución de la concentración de etanol en el medio, provocado por la disminución de la cantidad de levaduras en el reactor, pero la concentración que produce cada una de las células aumenta, al pasar a un estado de anaerobiosis.

La temperatura de 25°C muestra una disminución de la concentración de etanol en el medio, la cual es causada por la disminución de la cantidad de levaduras en el reactor, debido a que la concentración producida por célula se mantiene estable. Por otro lado a 20°C se observa que la concentración total de etanol en el medio disminuye hasta llegar a los niveles más bajos registrados durante la fermentación en continuo, pero la concentración que produce cada célula a 20°C es mayor durante las primeras horas, y después disminuye.

**Figura 7.5.5.** Evolución de la concentración producida de etanol a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa AR5 (*S. cerevisiae*). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).

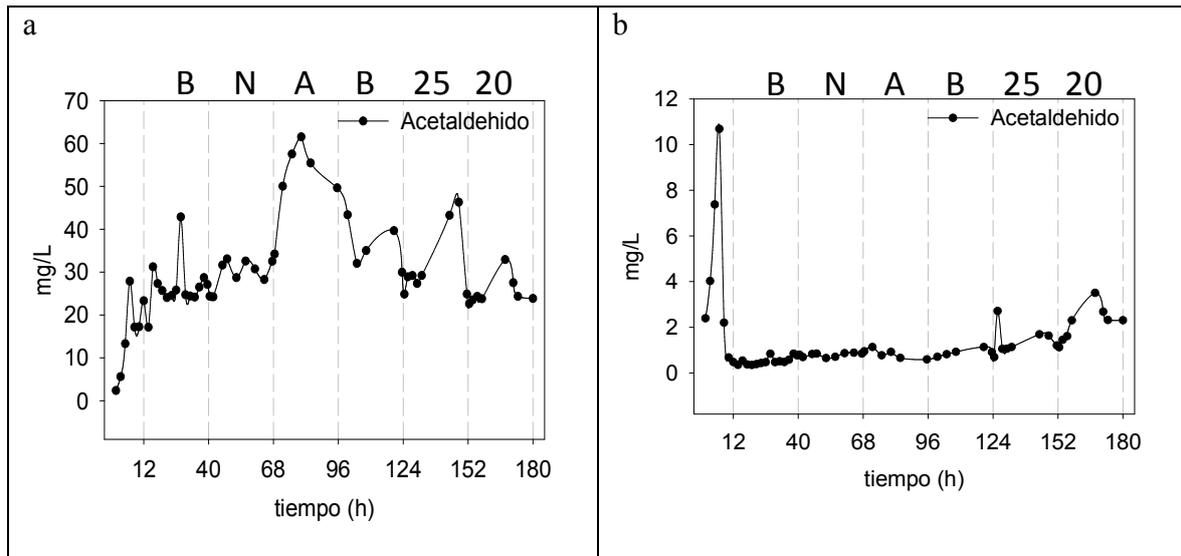
(a:concentracion en el reactor, b: normalizado a 1 millon de células)



La concentración de acetaldehído producida por la levadura muestra una evolución de la concentración en el reactor variable (**Figura 7.5.6.**), lo que corresponde a los cambios de concentración de células, debido a que la concentración producida por célula se mantiene estable, tanto con la adición de nitrógeno como con la aireación y el regreso al nivel inicial. La temperatura es la única que muestra un ligero aumento de la producción de acetaldehído por parte de las células, el cual es más notorio a 20°C.

**Figura 7.5.6.** Evolución de la concentración producida de acetaldehído a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa AR5 (*S. cerevisiae*). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).

(a:concentracion en el reactor, b: normalizado a 1 millon de células)



Los ésteres se producen en concentraciones pequeñas, pero sensorialmente aportan un carácter de olor bastante alto, pues estas concentraciones son suficientes para que puedan ser detectados y contribuyan al sabor y aroma de las bebidas alcohólicas. En el tequila el acetato de etilo es el que se produce en una concentración mayor en comparación a los demás ésteres, es por esto que se utiliza como indicador de la concentración de ésteres totales.

En la fermentación se observa que el acetato de etilo comenzó a producirse durante los primeros 5 tiempos de residencia donde se buscaba la estabilidad metabólica, teniendo un aumento en la producción por célula. La adición de nitrógeno disminuyó la producción de este éster, mientras que durante la aireación se observó que fue la etapa donde se logró hasta cierto punto una estabilidad en la producción por parte de las células,

La producción de ésteres se vio afectada por cada uno de los cambios que se produjeron en el sistema de manera intencional, sin lograr una estabilidad en su producción, debido a que se ha observado que la producción de ésteres depende mucho del estrés al que está sometida la célula, lo que se ve reflejado en un aumento en la concentración de ésteres en el reactor. La concentración de ésteres observada en el reactor se debe a un aumento de la concentración de células, pero también a la cantidad que cada célula produce, la cual

aumenta con cada perturbación. Si bien los cambios de temperatura reflejan una disminución en la concentración de ésteres que se tiene en el reactor, la capacidad que se produjo por cada célula aumenta ante el cambio de temperatura y después disminuye con una tendencia a ir aumentado. Por lo que se puede decir que la temperatura baja si provoca un aumento en la producción de ésteres por parte de la célula, pero como la concentración de células es baja, la concentración final que se observa en el reactor es baja.

El caprato de etilo muestra oscilaciones en su concentración en el reactor, pero la producción por célula es relativamente estable, teniendo un ligero aumento por efecto de la temperatura, el cual se observa más a 20°C.

El caprilato de etilo se ve afectado por efecto de la aireación, mientras que la temperatura favorece positivamente la producción del mismo. Siendo nuevamente la temperatura de 20°C donde más se produce, al igual que lo observado con el caprato de etilo.

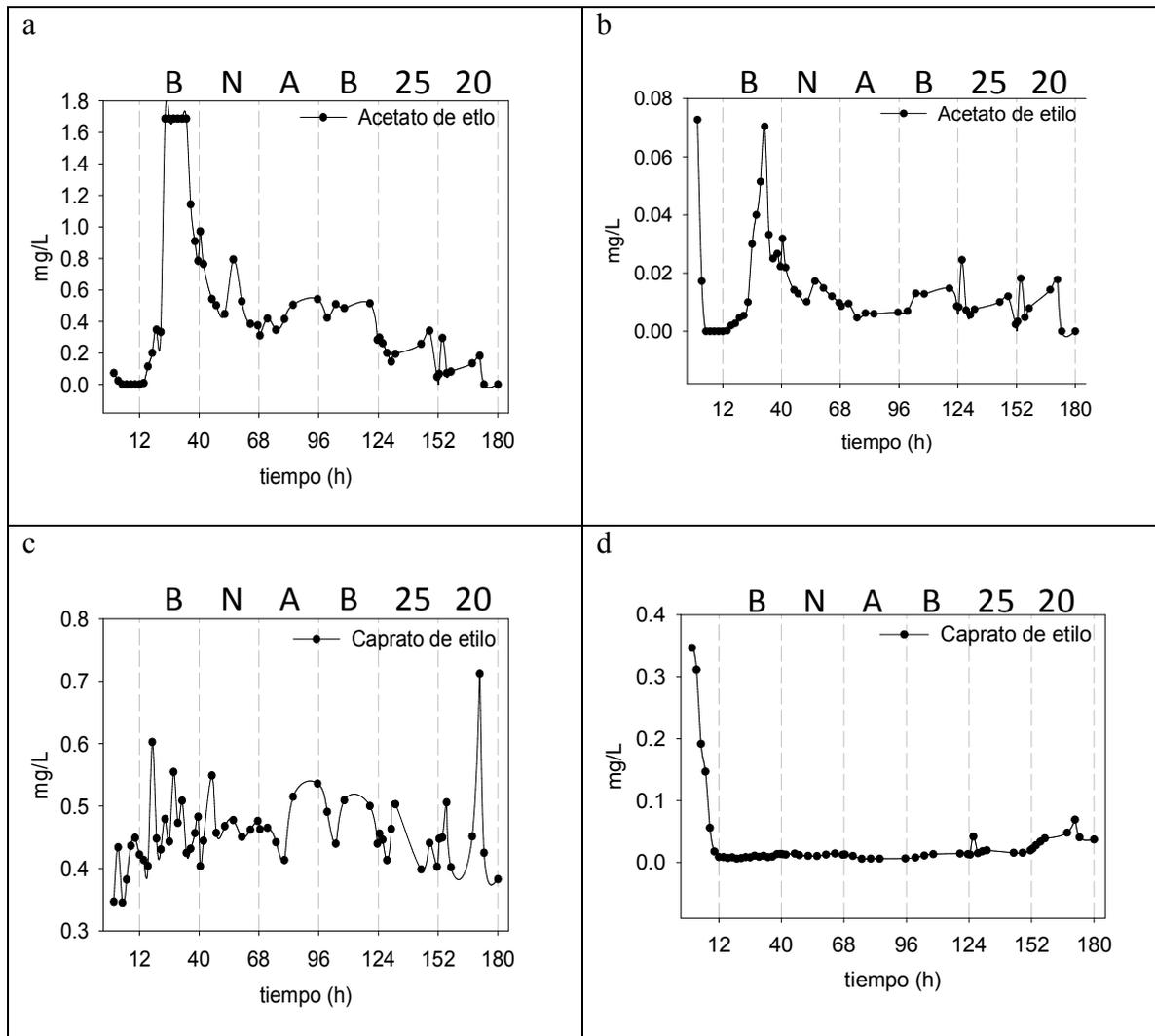
[Espinosa Vidal y col., \(2013\)](#) reportan que la concentración de ésteres de acetato es mejorada con la mitad de la concentración de sulfato de amonio que se utilizó para disminuir la concentración de alcoholes superiores, mientras que nosotros no observamos un cambio en la producción de ésteres al añadir el sulfato de amonio a las 40 horas. El aumento que nosotros observamos en la concentración de caprato y caprilato de etilo se debe a un aumento en la concentración de células, pero seguimos teniendo la misma cantidad producida por cada célula.

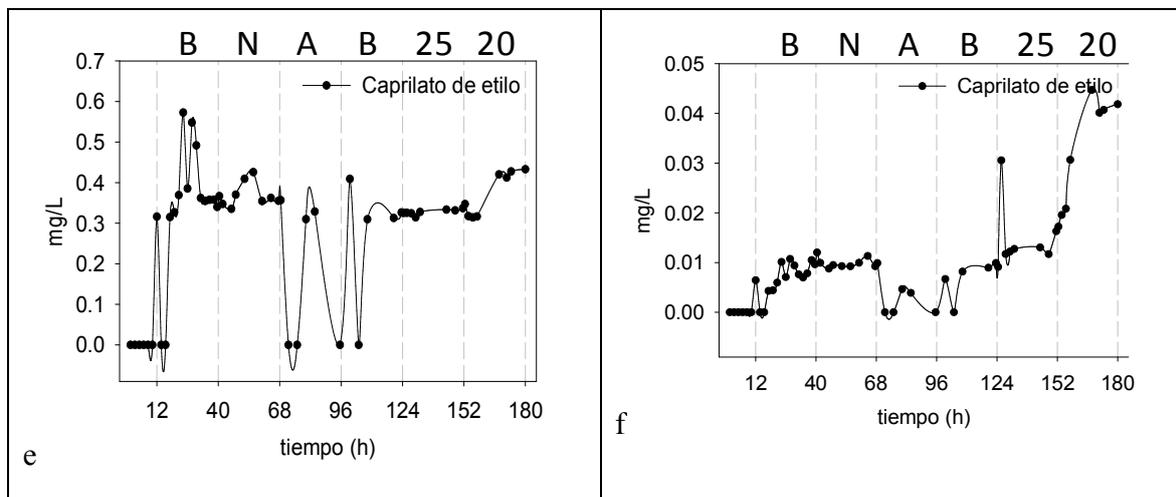
Los estudios que se realizan normalmente son en sistemas en batch, teniendo al final un aumento o disminución de la concentración de los compuestos aromáticos, que en ocasiones se debe a un efecto de la inhibición o favorecimiento del crecimiento de las levaduras durante el proceso de fermentación. Por lo que es más recomendable el estudio de los efectos en el metabolismo mediante un sistema en continuo, donde se puede tener una estabilidad en el metabolismo durante la fase estacionaria, y de esta manera poder atribuir cualquier cambio en concentración, a la perturbación realizada en el sistema.

Fermentar a bajas temperaturas aumenta el tiempo de fermentación del proceso total, se ha reportado que la producción de ésteres de etilo es favorecida a 28°C aumentando el aroma del vino ([Gamero y col., 2013](#)). Cuando nosotros disminuimos la temperatura observamos una disminución en la concentración de ésteres en el reactor, provocado por la disminución de la concentración de células, pero si realizamos el análisis de la cantidad producida por cada una de las células, tenemos que la cantidad de ésteres aumenta, siendo favorecida por la disminución de la temperatura, observándose este efecto de una manera más clara con el caprilato de etilo al disminuir la temperatura a 20°C. La fermentación a bajas temperaturas no solo aumenta la formación de aromas, también provoca la retención de aromas en la bebida.

**Figura 7.5.7.** Evolución de la concentración producida de ésteres (acetato, caprato y caprilato de etilo) a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa AR5 (*S. cerevisiae*). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).

(a,c,e:concentracion en el reactor, b,d,f: normalizado a 1 millon de células)



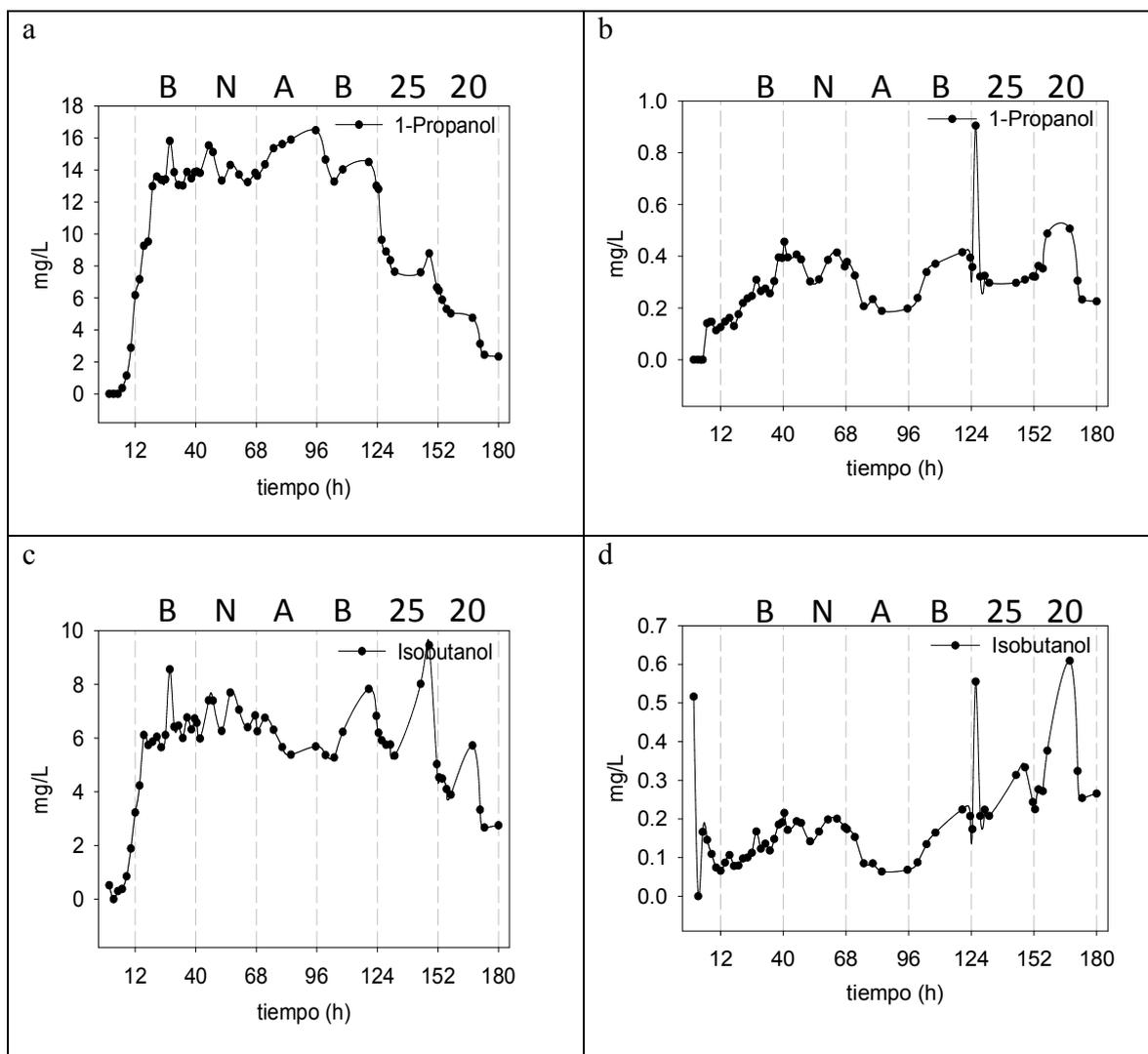


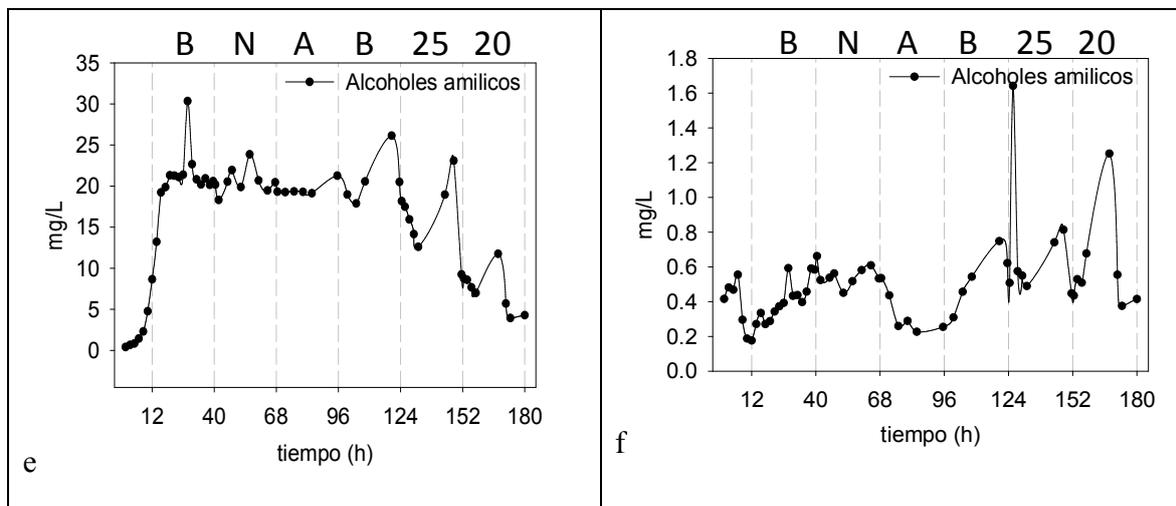
La producción de alcoholes superiores tiene una estrecha relación con el etanol, por lo que se observa que el 1-propanol muestra un comportamiento idéntico al observado que con el etanol, mientras que el isobutanol y los alcoholes amílicos muestran cinéticas similares. Pero mantienen el mismo comportamiento que el etanol.

[Gamero y col., \(2013\)](#) reportan que la temperatura no muestra un efecto en la producción de alcoholes superiores y más bien estos tienen relación con la especie de levadura utilizada durante la fermentación. Observando nosotros que cinéticas de producción diferentes para cada uno de los alcoholes medidos en este trabajo. Cada uno de los alcoholes superiores depende de la concentración de aminoácidos presentes en el medio, pues son los precursores para su formación, como en este trabajo no se realizaron enriquecimientos de nitrógeno orgánico, no se observan cambios en la producción de alcoholes superiores que se puedan llegar a relacionar directamente.

**Figura 7.5.8.** Evolución de la concentración producida de alcoholes superiores (1-propanol, isobutanol y alcoholes amilicos) a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa AR5 (*S. cerevisiae*). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).

(a,c,e:concentracion en el reactor, b,d,f: normalizado a 1 millón de células)





Espinosa Vidal y col., (2013) reportan que la producción de alcoholes superiores es reducida al enriquecer el medio con sulfato de amonio, observando nosotros que los alcoholes superiores aumentan para nuestro caso con la levadura AR5 (*S. cerevisiae*) en medio de jugo de *Agave*.

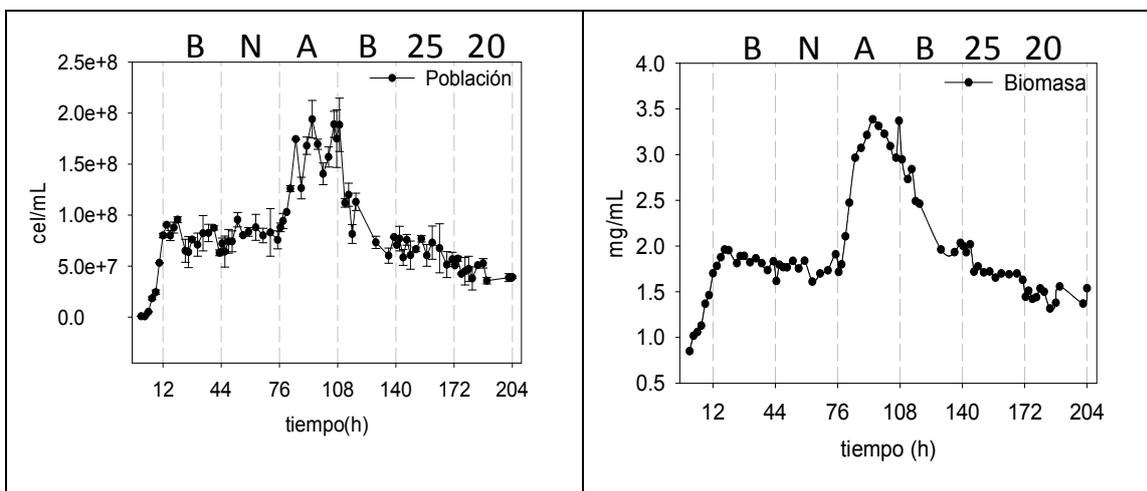
La ventaja de realizar una fermentación en continuo para analizar el efecto metabólico de cada uno de los factores, permite observar el efecto al momento de realizar la perturbación, a diferencia de las fermentaciones en lote, donde se mide la acumulación a lo largo de fermentación, por lo que no es directamente un cambio en el estado fisiológico al momento de la perturbación.

### 7.5.3.2. FERMENTACIÓN EN CONTINUO DU3

Las graficas que a continuación se presentan corresponden a la fermentación en continuo con la cepa DU3 (*K. marxianus*), donde a las 12 horas se cambio de batch a continuo, a las 44 horas se adiciono una solución de sulfato de amonio para aumentar la concentración de este en el jugo de *Agave*, a las 76 horas se comenzó a airear a 0.5 vvm, a las 108 horas se quitó la aireación y se esperó a que regresara la cepa al mismo estado fisiológico de inicio, a las 140 horas se cambio la temperatura a 25°C y a las 172 horas se cambio la temperatura a 20°C para terminar a las 204 horas.

Durante las primeras 12 horas se observa un crecimiento correspondiente a la fase exponencial del sistema en lote, al iniciar la alimentación para el sistema continuo se observa que se mantiene una concentración celular estable durante los primeros 5 tiempos de residencia (**Figura 7.5.9.**). La adición de nitrógeno a las 44 horas parece no afectar significativamente el crecimiento celular. A las 76 horas con la adición de aire se observa un efecto positivo con un crecimiento, que corresponde a un aumento de biomasa, la cual al quitar la aireación regresa a su estado de inicio. El efecto que tiene la temperatura sobre el crecimiento es muy poca observando que tanto a 25°C como a 20°C la concentración celular se mantiene, disminuyendo ligeramente, a diferencia con lo observado con AR5 (*S. cerevisiae*) donde la temperatura a 20°C le afecto gravemente.

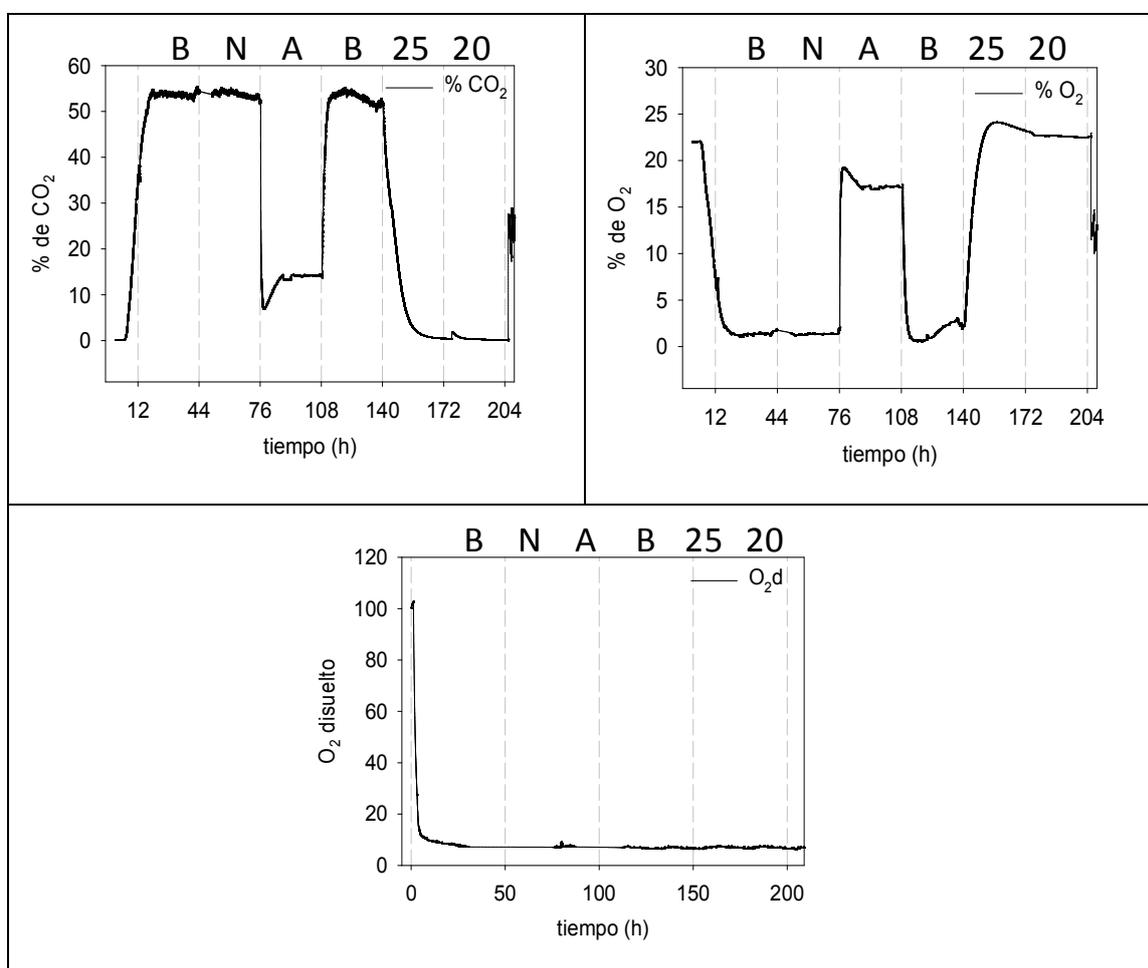
**Figura 7.5.9.** Cinética de la concentración de células y biomasa en la fermentación en continuo con la cepa DU3 (*K.marxianus*). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).



La producción de CO<sub>2</sub> es un reflejo del metabolismo de la célula (**Figura 7.5.10.**), observando una estabilidad de la producción del mismo durante los primeros 5 tiempos de residencia, la concentración que logran medir los sensores es de 55% máximo, lo que se debe a que el CO<sub>2</sub> se difunde fácilmente a través las mangueras de silicón que se utilizaron,

la adición de nitrógeno no afecta la producción de  $\text{CO}_2$  y durante la aireación la concentración detectada disminuye por efecto de la dilución con el aire que se administra, una vez que se quita la aireación se regresa al estado inicial, pero la temperatura a pesar de no observar en el crecimiento y biomasa un cambio significativo, en la producción de  $\text{CO}_2$  si se observa que este disminuye, por lo que se puede decir que la célula solo realiza mantenimiento celular y crecimiento, pero las rutas metabólicas se comienzan a apagar lentamente a  $25^\circ\text{C}$  y a  $20^\circ\text{C}$  llegando a un nivel mínimo basal para el mantenimiento celular al no detectar producción de  $\text{CO}_2$ . El oxígeno disuelto es consumido al inicio de la fermentación y este se mantiene en una concentración de cero durante todo el experimento.

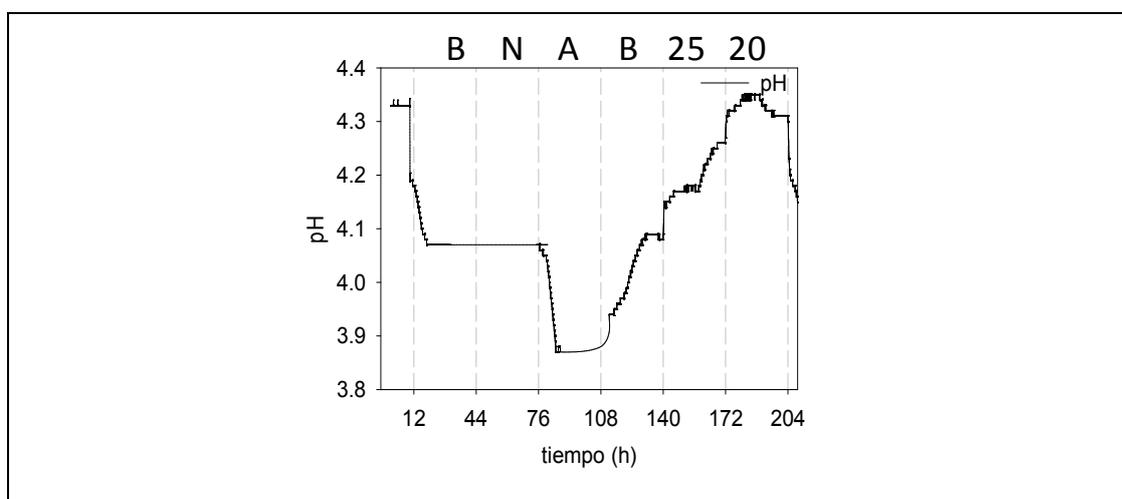
**Figura 7.5.10.** Cinética de la concentración de gases exhaustos y oxígeno disuelto en el reactor de la fermentación en continuo con la cepa DU3 (*K. marxianus*). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de  $25^\circ\text{C}$ ), 20 (Temperatura de  $20^\circ\text{C}$ ).



El efecto que tienen los factores estudiados sobre el pH se observan en la **figura 7.5.11**, donde se comienza con un pH de 4.35 y disminuye hasta 4.1 manteniéndose en este nivel durante los primeros 5 tiempos de residencia. La adición de nitrógeno extra no

muestra efecto alguno sobre el pH, por otro lado, la aireación provoca no solo un aumento en la concentración celular si no que también se observa una disminución del pH, la cual al quitar la aireación el pH comienza a regresar lentamente al mismo nivel. Si bien con la temperatura el crecimiento celular parece no afectarse, el pH comienza a subir lentamente a 25°C y continua subiendo a 20°C hasta llegar al valor inicial.

**Figura 7.5.11.** Evolución del pH a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa DU3 (*K. marxianus*).AR5 (*S. cerevisiae*). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).



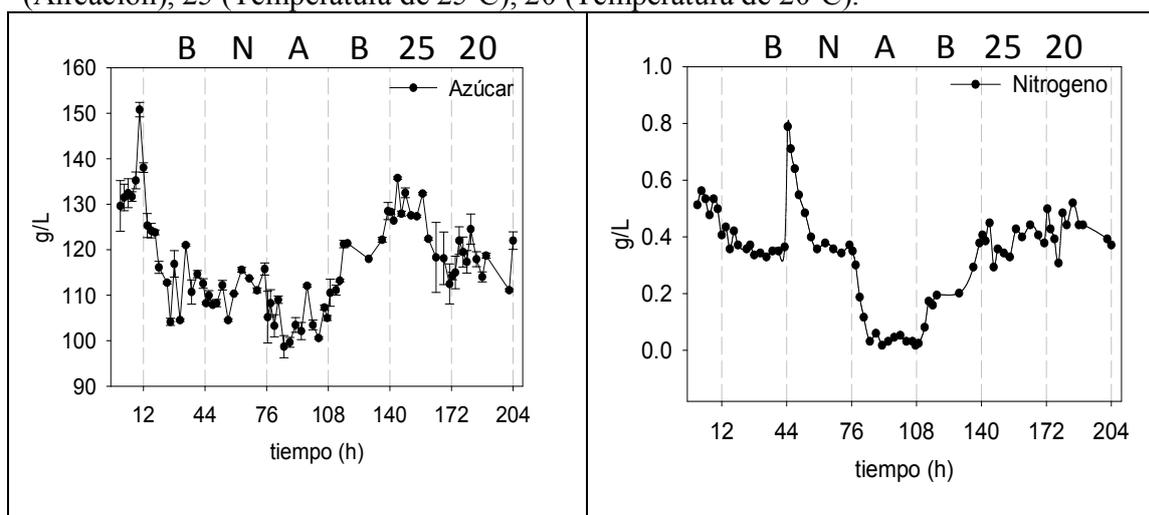
La concentración de azúcar comenzó en 130g/L disminuyendo hasta un promedio de 110g/L durante los primeros 5 tiempos de residencia (**Figura 7.5.12.**), la adición de nitrógeno provocó una ligera disminución en la concentración de azúcar a las 50 horas. La aireación con motivo del aumento de la concentración celular provocó una disminución en la concentración de azúcar la cual regreso nuevamente a su nivel al quitar la aireación, pero también se observa que la concentración de azúcar sigue subiendo y se estabiliza en una concentración ligeramente mayor a la inicial. La temperatura de 25°C al inicio muestra una estabilidad pero después comienza a bajar y a 20°C se mantiene estable.

La concentración de nitrógeno comienza a disminuir durante las primeras horas y se mantiene estable durante los primeros 5 tiempos de residencia, pero cabe resaltar que la levadura no consume todo el nitrógeno, manteniéndose en una concentración estable a 0.4 g/L, a las 44 horas la adición de nitrógeno provoca un aumento en la concentración el cual se va lavando hasta llegar nuevamente a la concentración de estabilidad. La aireación con motivo del aumento de la concentración celular, provoca una disminución de la concentración de nitrógeno hasta llegar a consumir todo el nitrógeno presente, una vez que se quita la aireación, la concentración de nitrógeno regresa a la concentración inicial, y con la temperatura la concentración de nitrógeno tiene oscilaciones con una tendencia a

disminuir justo en el momento del cambio y regresa rápidamente a la concentración de estabilidad.

Se atribuye que las levaduras no-*Saccharomyces* no están presentes durante toda la fermentación, debido a su baja tolerancia al etanol y que los nutrientes se van terminando lentamente (Albergaria y Arneborg 2016), pero con este experimento, podemos ver que la cepa DU3 (*K. marxianus*) no presenta una limitación del nitrógeno. Además también fue reportado que *T. delbrueckii* no está presente durante toda la presentación debido a su demanda de nitrógeno que compite con *S. cerevisiae*, realizando fermentación secuencial, observando que *T. delbrueckii* consume el nitrógeno y no le deja a *S. cerevisiae*, por lo que se debe de aumentar más las concentración de nitrógeno, incluso en fermentaciones secuenciales (Taillandier y col., 2014). Con esto nosotros podemos ver que el nitrógeno no es una limitante para *K. marxianus*, pero depende mucho de cada una de las cepas estudiadas y no podemos generalizar que todas las cepas de la misma especie tendrán el mismo comportamiento, o bien que todas las no-*Saccharomyces* llegan a tener ese comportamiento.

**Figura 7.5.12.** Evolución de la concentración de azúcar y nitrógeno a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa DU3 (*K. marxianus*). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).



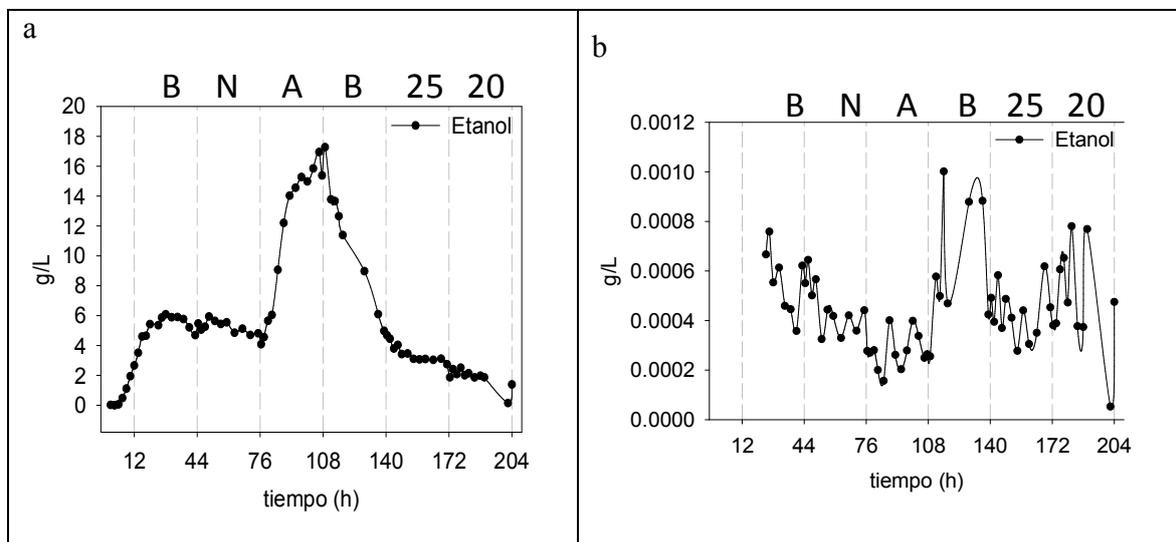
La producción de etanol se observa en la **figura 7.5.13**, donde se aprecia tanto la concentración total producida como la concentración producida por unidad de célula. Durante las primeras horas y junto con el crecimiento se observa que la concentración de etanol comienza a aumentar. Al iniciar el sistema en continuo se aprecia una estabilidad en la producción de etanol ligado a una producción por célula estable, con pequeñas oscilaciones causadas por errores de la propia técnica de medición, puesto que los valores reportados son muy pequeños. La adición de nitrógeno parece no tener efecto en la producción de etanol, mientras que la aireación causa un aumento en la concentración total de etanol en el reactor causada por el incremento de células, pero la cantidad de etanol producida por célula fue incluso un poco menor que la que se tenía sin aireación. La

temperatura a 25°C muestra una ligera disminución en la concentración de etanol en el reactor, sin embargo, la concentración de etanol que fue producida por célula, se mantuvo en el mismo nivel, por otro lado, durante las primeras horas a 20°C, pareciera que se mantiene la producción de etanol y solo al final se observa una caída en la producción del mismo. Lo que nos demuestra que DU3 (*K. marxianus*) es una levadura que esta mas adaptada al medio y a los cambios de nutrientes y temperatura que lo observado con AR5 (*S. cerevisiae*).

Se ha reportado que *S. cerevisiae* es una levadura que está presente en todos los procesos de fermentación debido a su buena capacidad de adaptación a los medios y condiciones ambientales (Albergaria y Arneborg 2106), pero con esto podemos demostrar que en fermentaciones con jugo de *Agave* la levadura *K. marxianus* esta mas adaptada que *S. cerevisiae*, existen diversos estudios que demuestran la presencia del genero *Kluyveromyces* en todos los procesos fermentativos con diferentes especies de *Agave* (Lappe-Oliveras y col., 2008) a pesar de utilizar una levadura *S. cerevisiae* aislada de proceso de fermentación de tequila, que se supone está adaptada a ese medio de fermentación, *K. marxianus* muestra ser una levadura más robusta para este medio.

**Figura 7.5.13.** Evolución de la concentración producida de etanol a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa DU3 (*K. marxianus*). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).

(a:concentracion en el reactor, b: normalizado a 1 millon de células)

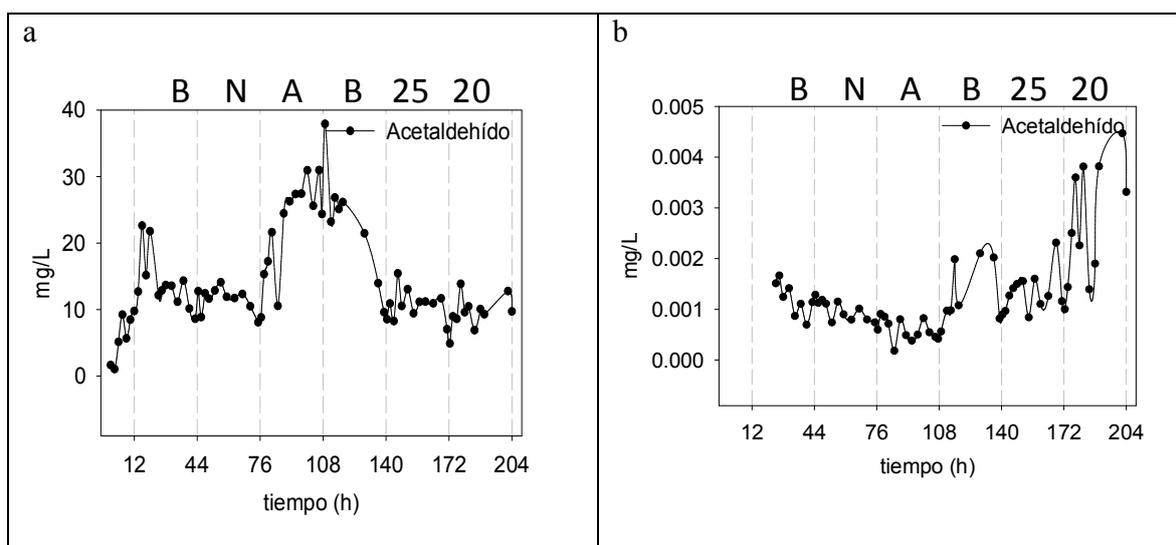


El acetaldehído es un reflejo de una conversión incompleta a etanol, en este experimento la levadura DU3 (*K. marxianus*) muestra un incremento en su producción durante las primeras horas (Figura 7.5.14.), logrando la estabilidad durante los primeros 5 tiempos de residencia, el nitrógeno parece no afectar la producción del mismo, mientras que la aireación refleja un aumento en la concentración del reactor el cual es causado por el

aumento de la concentración celular por que la concentración producida por célula fue la misma. Al retirar la aireación la concentración en el reactor disminuye debido a que la concentración de células disminuye también, pero la concentración de acetaldehído producida por unidad de célula aumenta, por el cambio de metabolismo al pasar de aerobio a anaerobio. La temperatura mantiene una concentración en el reactor estable, pero la cantidad de acetaldehído producida por unidad de célula aumenta, tanto a 25°C como a 20°C, siendo más marcado este efecto a 20°C, lo que demuestra que el metabolismo de la levadura se concentra en realizar un mantenimiento celular, dejando de lado los metabolitos secundarios, reflejado en una fermentación incompleta al aumentar la concentración de acetaldehído.

**Figura 7.5.14.** Evolución de la concentración producida de acetaldehído a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa DU3 (*K. marxianus*). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).

(a: concentración en el reactor, b: normalizado a 1 millón de células)



El acetato de etilo muestra oscilaciones en la concentración de este éster en el reactor (**Figura 7.5.15**), mas sin embargo la concentración del mismo por unida de célula se mantiene estable tanto con la adición de nitrógeno como con la aireación. El cambio de sistema entre aerobio y anaerobio provoca un aumento más marcado tanto en la concentración de acetato de etilo en el reactor como en la producción por unidad de célula. La temperatura como se tenía previamente reportado para *Saccharomyces* se observa un aumento en la concentración de ésteres, siendo más marcado este efecto a 20°C.

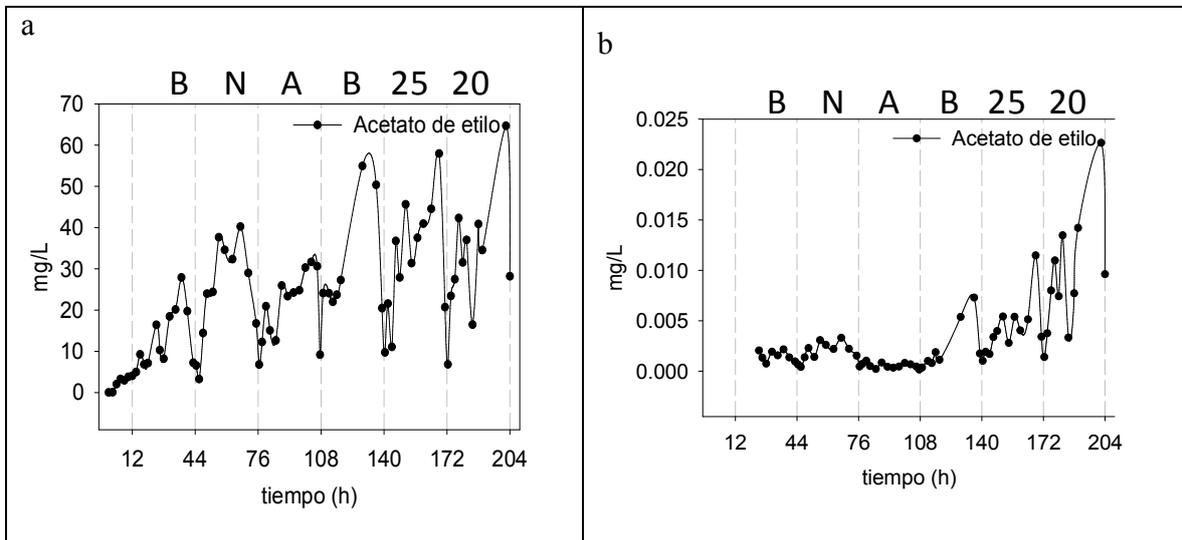
El acetato de etilo se utiliza en la industria del tequila como indicador de la concentración de ésteres, para el caso del acetato de isoamilo, no fue detectado durante las primeras horas, sino hasta que se quito la aireación y la concentración de acetato de etilo

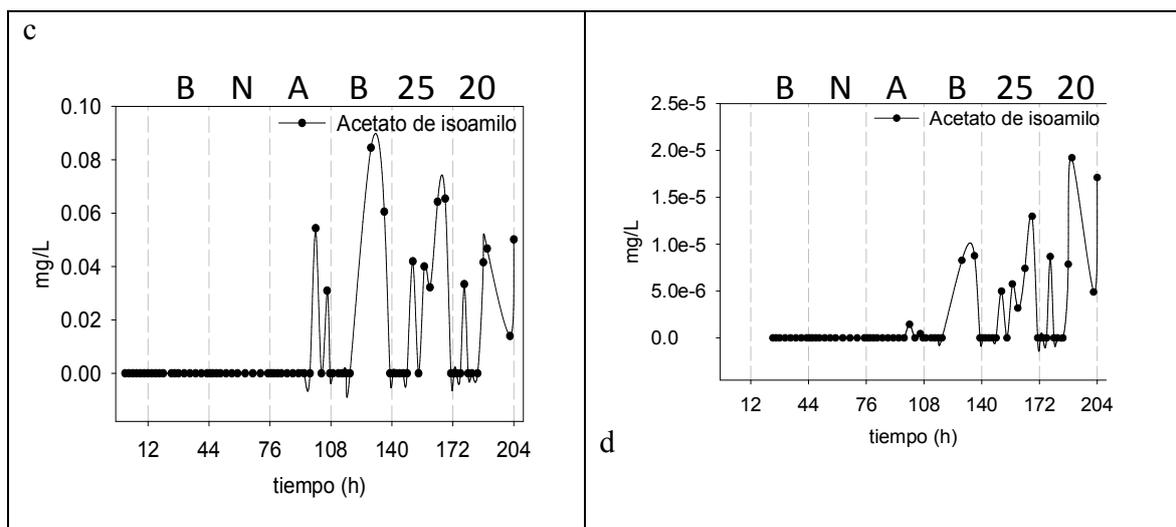
aumento, también la del acetato de isoamilo aumenta hasta un nivel donde puede llegar a detectarse. La temperatura favorece la producción de ésteres, observando que la levadura DU3 (*K. marxianus*) logra tener una producción hasta un nivel detectable. Con esto podemos comprobar que la temperatura baja favorece la producción de ésteres y se confirma que las vías de producción de ésteres están ligadas, por lo que puede seguir utilizándose la medición del acetato de etilo como indicador de la concentración de ésteres totales.

Se ha reportado que la fuente de nitrógeno tiene un efecto pronunciado en el metabolismo de *Kluyveromyces*, donde el alcohol isoamilico puede aumentarse cuando el medio se enriquece con extracto de levadura, mientras que el 2-fenil-etil-acetato deja de producirse con la adición de sulfato de amonio, sin tener efecto para la producción de acetato de isoamilo y acetato de etilo. Además la fuente de carbono también influye en la producción de ésteres, sabiendo que la lactosa disminuye la producción de ésteres de acetato mientras que la glucosa y la fructosa aumentan la producción de estos (Gethins y col., 2015). En este trabajo se muestra que el acetato de etilo si tiene un efecto positivo por la adición de sulfato de amonio, por lo que el efecto de la fuente de nitrógeno, tiene mucho que ver con la cepa de levadura que se éste analizando.

**Figura 7.5.15.** Evolución de la concentración producida de ésteres (acetato de etilo y acetato de isoamilo) a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa DU3 (*K. marxianus*). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).

(a,c:concentracion en el reactor, b,d: normalizado a 1 millon de células)





Los alcoholes superiores que se produjeron en mayor concentración fueron los alcoholes amílicos con la cepa DU3 (*K. marxianus*) (**Figura 7.5.16.**). La cepa de *Saccharomyces* (AR5) que es la más ampliamente utilizada en la industria del tequila, también produce una alta concentración de este alcohol superior comparando con los demás que también se producen durante la fermentación. Debido a esto, por norma en el tequila se utiliza como indicador de la concentración de alcoholes superiores. Sin embargo, con la cepa DU3 (*K. marxianus*) también es producido el 1-propanol en concentraciones similares a las obtenidas por los alcoholes amílicos. El isobutanol fue producido en una concentración baja comparada con los otros 2 alcoholes antes mencionados que fueron los que se midieron en este trabajo.

Los alcoholes amílicos y el isobutanol presentan un comportamiento similar al que se obtuvo con el etanol, mientras que el 1-propanol es el que muestra un comportamiento diferente, teniendo una producción estable durante los primeros 5 tiempos de residencia, con una ligera disminución en la concentración al final de los 5 tiempos de residencia donde se adicionó nitrógeno, y durante la aireación la concentración en el reactor se mantiene estable y en la misma concentración que la inicial pero una producción por unidad de célula menor, siendo la más baja registrada. La temperatura provoca una disminución en la concentración en el reactor, pero la producción por unidad de célula se mantiene estable pero a un nivel bajo.

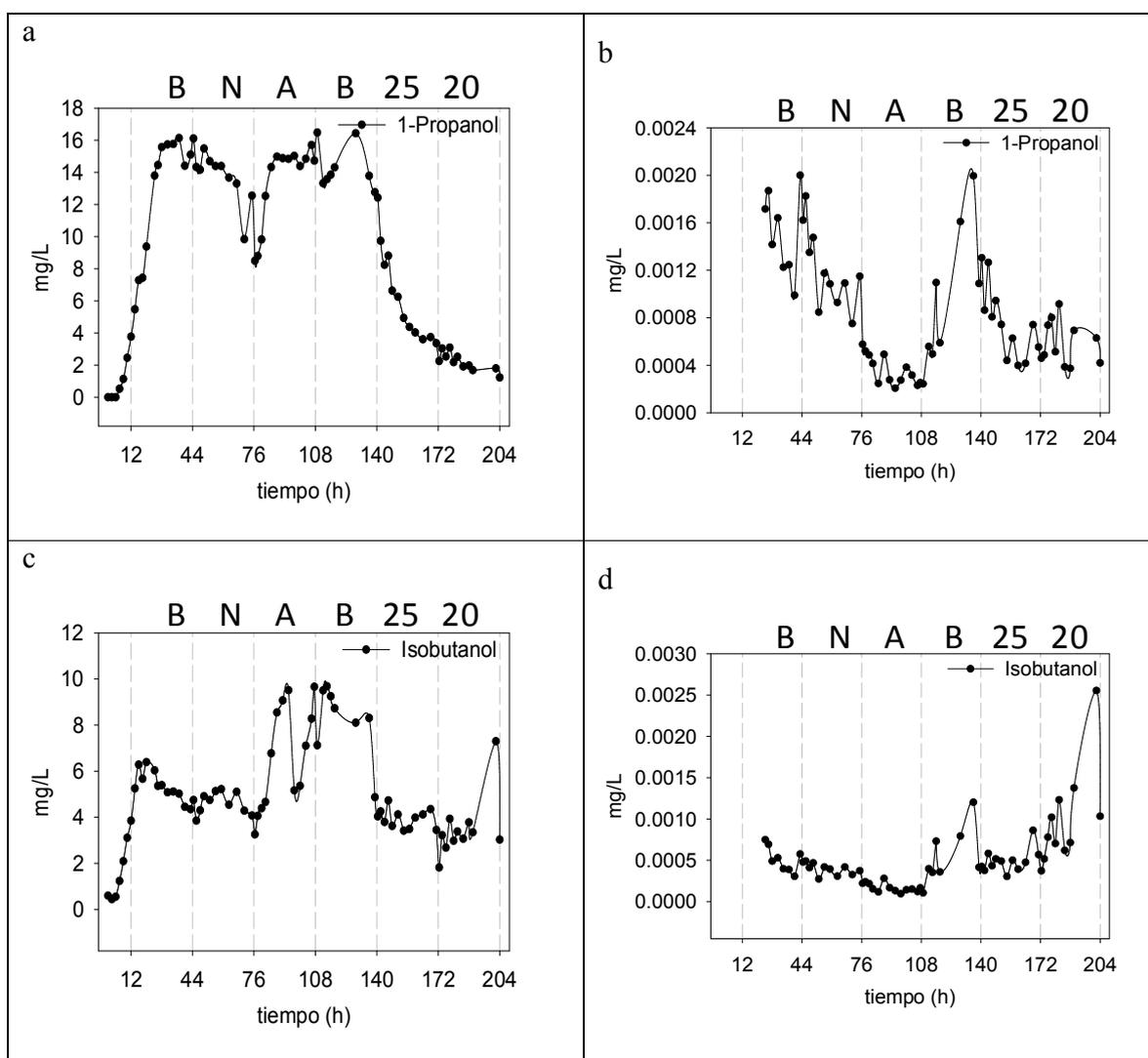
Mientras que la temperatura disminuye la producción de 1-propanol, estimula la producción de isobutanol y alcoholes amílicos, por lo que las rutas metabólicas de cada alcohol superior no están ligadas y depende del metabolismo de la propia célula. Debido a esto no deberían de utilizarse solo los alcoholes amílicos como indicadores de la concentración de alcoholes superiores.

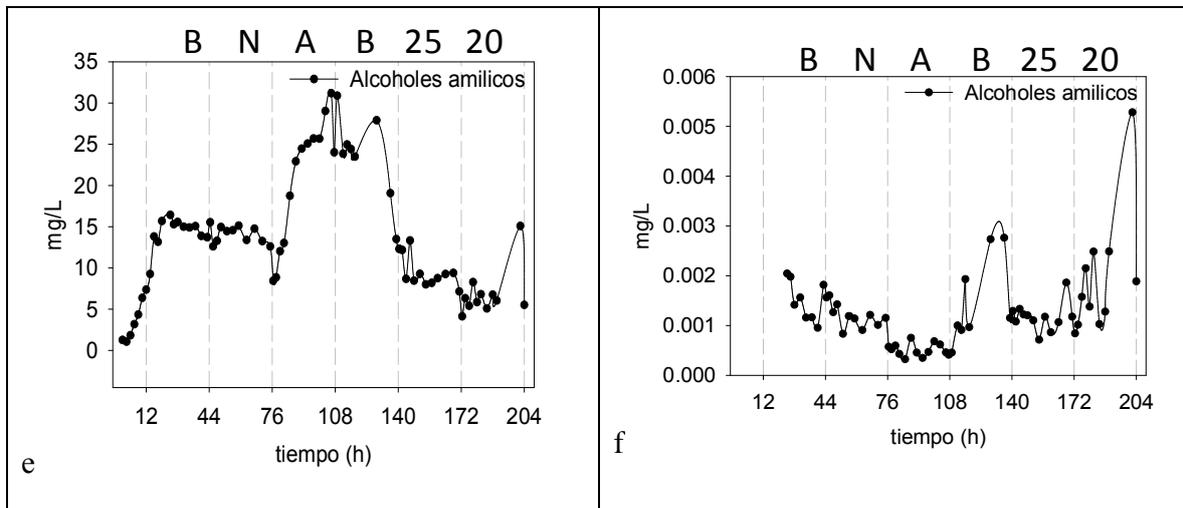
Actualmente existe la tendencia por el uso de levaduras no-*Saccharomyces* en la fermentación de bebidas alcohólicas y si continuamos solamente con la medición alcoholes

amílicos como indicativo de alcoholes superiores, sería un gran error, pues esto aplica solo para la *S. cerevisiae*, pero en las no-*Saccharomyces* puede observarse que este se produce en bajas concentraciones, pero los demás alcoholes superiores aumenta su concentración. Para garantizar la salud de los consumidores y ofrecer un producto adecuado, se recomienda la medición de los alcoholes superiores y no solo de alcoholes amílicos, como lo marca la norma.

**Figura 7.5.16.** Evolución de la concentración producida de alcoholes superiores (1-propanol, isobutanol y alcohol amílico) a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa DU3 (*K. marxianus*). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).

(a,c,e:concentracion en el reactor, b,d,f: normalizado a 1 millón de células)





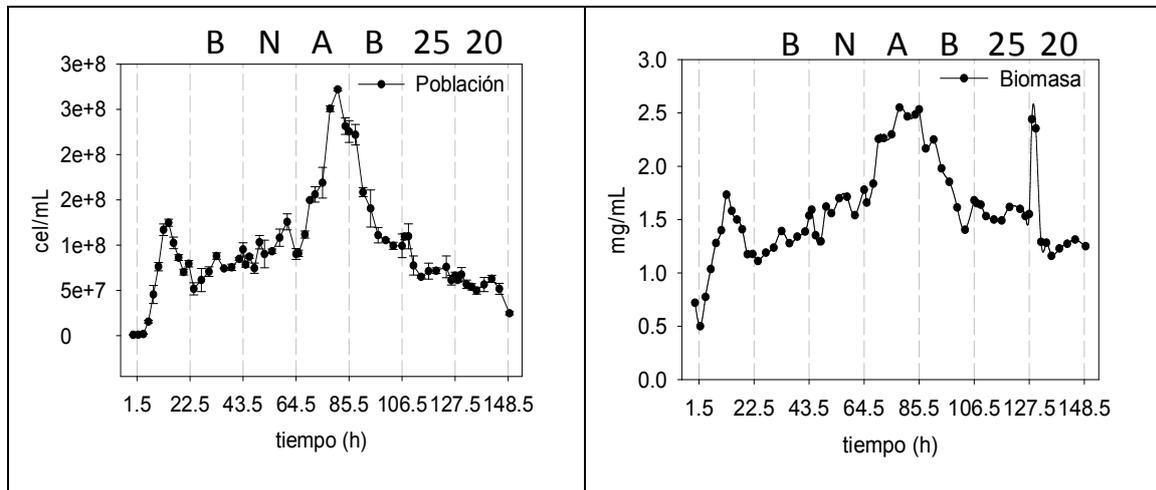
La cepa DU3 (*K. marxianus*) es fuertemente afectada por la temperatura, favoreciendo la producción de esteres por unidad de célula, por lo que el realizar fermentaciones a bajas temperaturas, puede llegar a aumentar el perfil aromático del tequila en una fermentación en cultivo puro con la cepa DU3 (*K. marxianus*). Adicionalmente a esto, para no bajar la concentración de etanol producida, se pudiera llegar a combinar con una aireación que favorezca la cantidad de células en el medio, con lo que se elevaría de manera global la concentración de etanol y compuestos volátiles al mismo tiempo.

### 7.5.3.3. FERMENTACIÓN EN CONTINUO GRO3

Las gráficas que a continuación se presentan corresponden a la fermentación en continuo de GRO3 (*P. kluyveri*), como se había visto en la fermentación en batch que esta cepa requería de una aireación inicial para su óptimo crecimiento a nivel de reactor, se comenzó con una aireación de 0.5 vvm durante las primeras 12 horas, después de esto, se retiró la aireación y se comenzó con la alimentación, observando que el reactor comenzó a lavarse, por lo que a las 22.5 horas se volvió a colocar la aireación a 0.5 vvm la cual se dejó durante toda la fermentación, a las 43.5 horas se colocó la solución de sulfato de amonio para elevar la concentración en el medio a 1 g/L, a las 64.5 horas se aumentó la aireación a 1 vvm, a las 85.5 se regresó a la aireación de 0.5 vvm, a las 106.5 horas se cambió la temperatura a 25°C y a las 127.5 se bajó la temperatura a 20°C para terminar a las 148.5 horas.

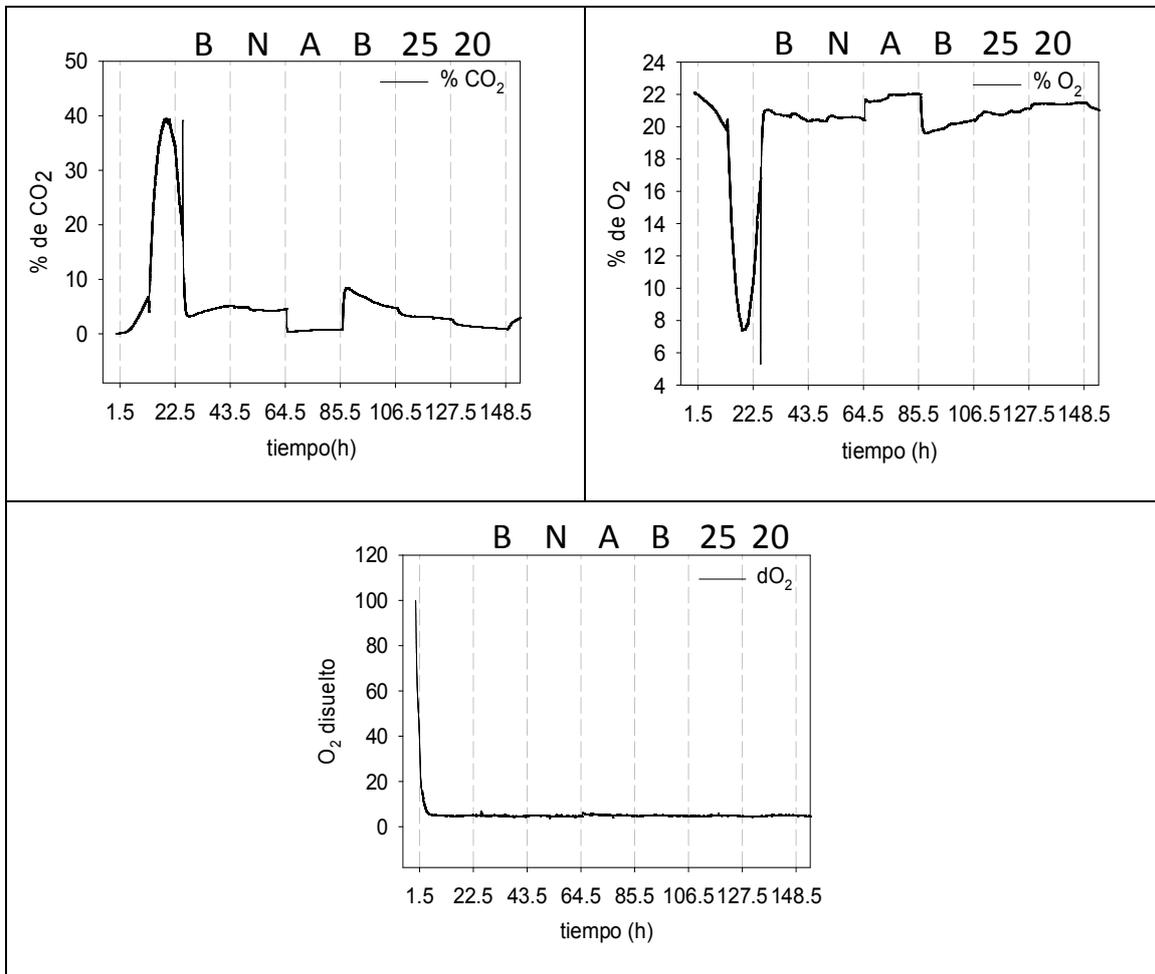
Durante la etapa de crecimiento celular, se observa que llega un máximo y después disminuye, por lo que al comenzar el sistema en continuo con la alimentación y extracción del medio fermentado se colocó la aireación y se logra tener una estabilización de la concentración celular durante los primeros 5 tiempos de residencia, también se observa una correlación de la cantidad de células contadas al microscopio con la biomasa producida, por lo que las células mantuvieron un tamaño y peso estable durante todo el experimento (**Figura 7.5.17.**). La cepa GRO3 (*P. kluyveri*) al igual que en el reactor en lote, fue la que mostró las poblaciones celulares más altas y por tanto se trabajó con un flujo de medio más rápido para el sistema en continuo. El nitrógeno parece tener un efecto positivo en el crecimiento, pero sigue la misma tendencia que se observa en los 5 tiempos de residencia previos, por lo que puede no atribuirse directamente a la adición del nitrógeno, sino más bien, a una adaptación al medio en sistema en continuo. La aireación como era de esperarse y como se había observado con las 2 cepas antes mostradas favorece el crecimiento de las levaduras. La temperatura a 25°C afecta un poco la concentración celular y a 20°C se afecta un poco más que lo observado a 25°C, pero en ambas temperaturas se logra mantener el cultivo estable. Por lo que se puede decir que las cepas no-*Saccharomyces* estudiadas en este trabajo son más robustas en comparación con AR5 (*S. cerevisiae*) que es fuertemente afectada a 20°C.

**Figura 7.5.17.** Cinética de la concentración de células y biomasa en la fermentación en continuo con la cepa GRO3 (*P. kluyveri*). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).



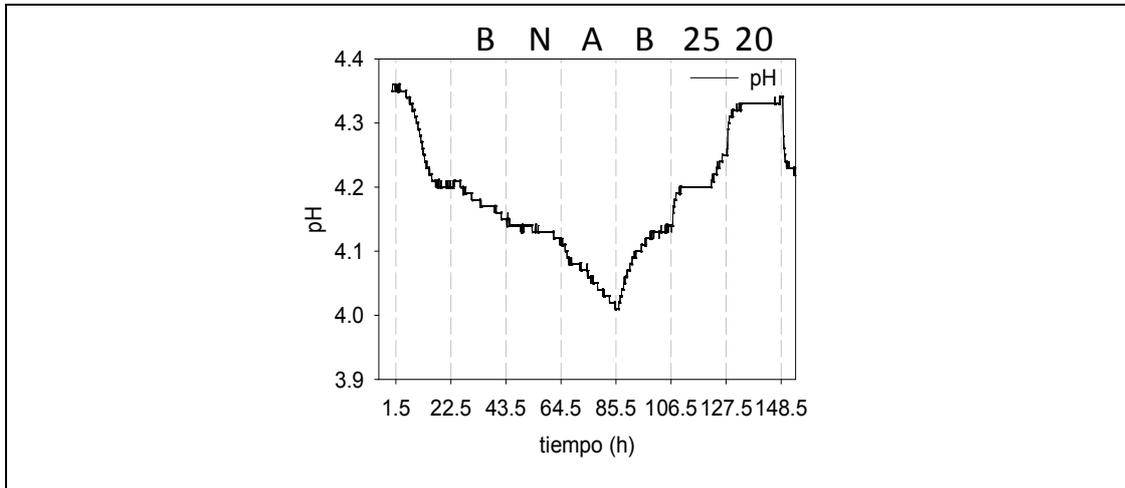
La concentración de  $\text{CO}_2$  que se observa en la **figura 7.5.18.** corresponde a la producida por la cepa GRO3 (*P. kluyveri*), donde se aprecia que la concentración aumenta en las primeras horas y después disminuye, esto fue debido a que se colocó la aireación en todo momento, por lo que la concentración de  $\text{CO}_2$  producida por las células fue diluido, aun así, se logra observar que la adición de nitrógeno parece no tener efecto en la producción de  $\text{CO}_2$ . De las 64.5 a las 85.5 que fue cuando se aumentó la aireación se observa una dilución mayor del  $\text{CO}_2$  y las temperaturas de 25°C y 20°C, muestran una disminución en la producción de  $\text{CO}_2$ . Las concentraciones de oxígeno son inversamente proporcionales a las de  $\text{CO}_2$  y el oxígeno disuelto se consume al inicio y se mantiene en una concentración baja durante todo el experimento.

**Figura 7.5.18.** Cinética de la concentración de gases exhaustos y oxígeno disuelto en el reactor de la fermentación en continuo con la cepa GRO3 (*P. kluyveri*). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).



Los valores de pH registrados durante la fermentación en continuo con la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) se muestran en la **figura 7.5.19**, observando un valor de 4.35 al inicio, el cual fue disminuyendo durante la etapa de crecimiento, en los 5 primeros tiempos de residencia el pH continuo disminuyendo y la adición de nitrógeno parece no afectar la producción de ácidos orgánicos por lo que el pH se mantuvo estable. El aumento en la aireación provocó también un aumento de la concentración celular y por tanto una disminución del pH, al regresar la aireación al nivel en que se estuvo realizando, el pH aumenta. La temperatura de 25°C causó un aumento en el pH manteniéndose estable a 4.2, pero al final de los 5 tiempos de residencia este comenzó a aumentar nuevamente. La temperatura a 20°C hace que el pH regrese al valor inicial, lo que demuestra que dejan de producirse ácidos orgánicos.

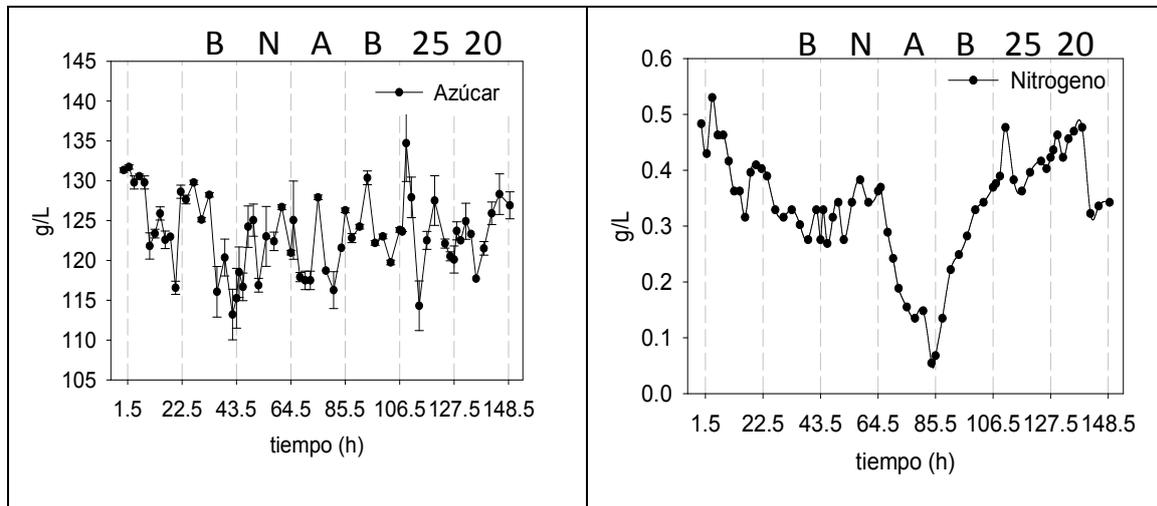
**Figura 7.5.19.** Evolución del pH a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa GRO3 (*P. kluyveri*). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).



La concentración de azúcar muestra oscilaciones a lo largo de la fermentación en continuo (**figura 7.5.20.**), observando que la adición de nitrógeno provoca un aumento de la concentración de azúcar, durante la etapa de más aireación se observa una disminución en la concentración y durante las etapas de temperatura a 25°C y 20°C, se observa que al inicio disminuye, pero después aumenta la concentración.

En el caso de la concentración de nitrógeno esta se mantiene estable durante los primeros 5 tiempos de residencia y durante la adición del mismo. El aumento en la aireación provoca una disminución de la concentración hasta llegar a una concentración de cero al final de los 5 tiempos de residencia. El cambio de temperatura a 25°C causa un aumento ligero a lo largo de los 5 tiempos de residencia, mientras que la temperatura a 20°C al inicio la concentración de nitrógeno se mantiene estable y al final disminuye.

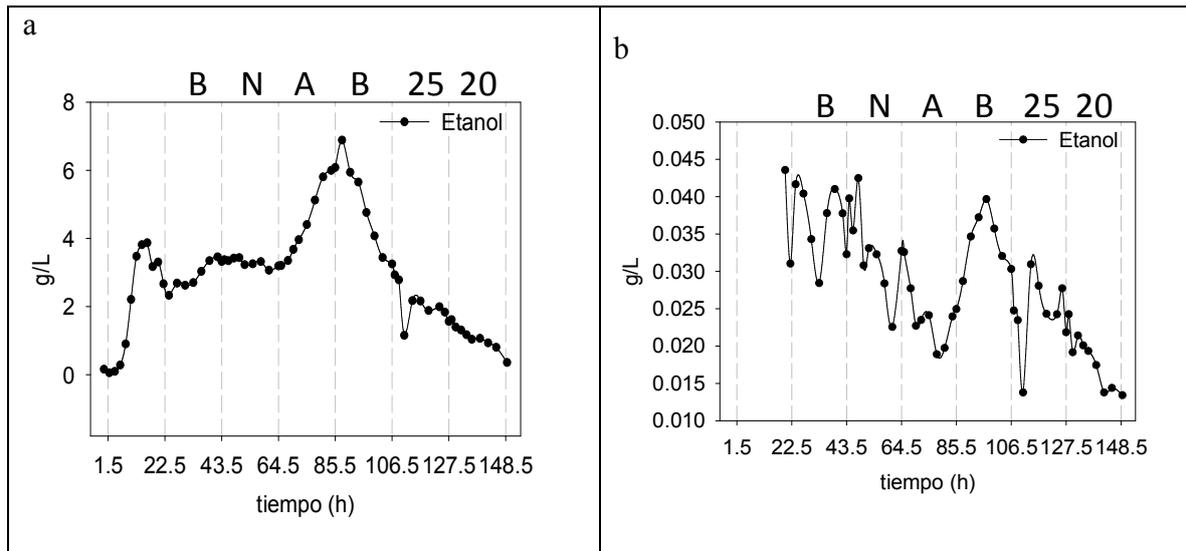
**Figura 7.5.20.** Evolución de la concentración de azúcar y nitrógeno a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa GRO3 (*P. kluyveri*). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).



La concentración de etanol producida a lo largo de la fermentación en continuo se mantiene estable durante los primeros 5 tiempos de residencia y la adición de nitrógeno no tiene efecto en la producción de etanol, mientras que el aumento en la aireación refleja un aumento en la concentración de etanol en el reactor, la producción por unidad de célula disminuye, y al contrario al regresar la aireación al nivel inicial donde la concentración total en el reactor disminuye, pero la cantidad de etanol producida por unidad de célula aumenta. La temperatura baja afecta el metabolismo de la cepa de levadura GRO3 (*P. kluyveri*) observando una disminución de la concentración de etanol tanto en el reactor como en la producción por unidad de célula.

**Figura 7.5.21.** Evolución de la concentración producida de etanol a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa GRO3 (*P. kluyveri*). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).

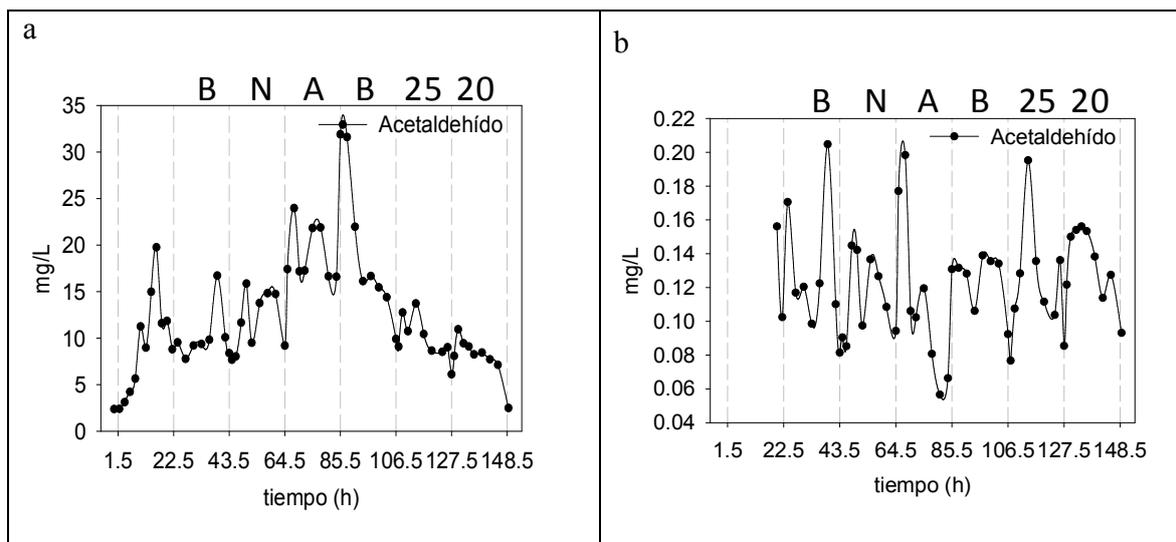
(a:concentracion en el reactor, b: normalizado a 1 millon de células)



La concentración de acetaldehído en el medio muestra oscilaciones, observando que ante cualquier cambio de condiciones, la levadura tiende a producir una mayor concentración de este metabolito y por tanto, aumenta la concentración en el reactor (**Figura 7.5.22.**), observando este efecto para cualquier cambio realizado, teniendo después una disminución en su producción y al final de los 5 tiempos de residencia con la aireación mayor es donde se observa la menor concentración de acetaldehído producido por unidad de célula, siendo este punto el más eficiente en la conversión a etanol.

**Figura 7.5.22.** Evolución de la concentración producida de acetaldehído a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa GRO3 (*P. kluyveri*). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).

(a:concentracion en el reactor, b: normalizado a 1 millon de células)

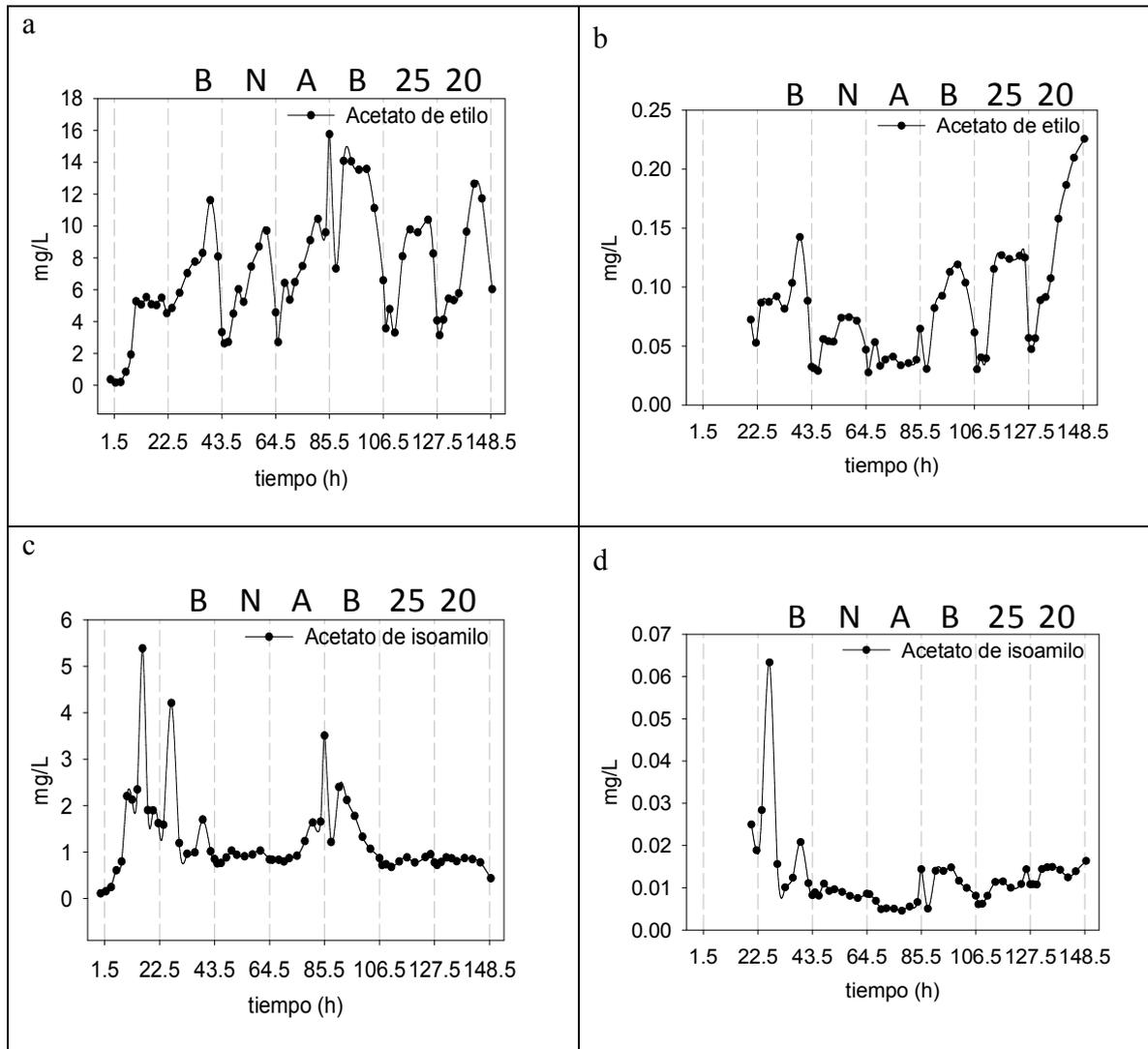


Al igual que con la concentración de acetaldehído, el acetato de etilo muestra oscilaciones que corresponden a un aumento en la concentración y producción por parte de las células después de cada cambio de condiciones (**Figura 7.5.23.**). Al finalizar los 5 tiempos de residencia de cada etapa se observa una disminución en la producción y la temperatura baja estimula a las células a una producción mayor de ésteres, obteniendo las concentraciones más altas registradas durante la fermentación en continuo.

La producción de acetato de isoamilo muestra una estabilidad en su producción, con un ligero aumento al adicionar el nitrógeno a las 43.5 horas. Al final de la aireación se observa un aumento no solo de la concentración sino también de la producción por unidad de célula, seguido de una disminución del mismo al regresar al nivel de aireación inicial. Si bien, la concentración de acetato de isoamilo en el reactor no se ve aumentada a 25°C y 20°C, la producción por unidad de célula si muestra un efecto favorable, por lo que la temperatura baja, si favorece positivamente la producción de ésteres.

**Figura 7.5.23.** Evolución de la concentración producida de ésteres (acetato de etilo y acetato de isoamilo) a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa GRO3 (*P. kluyveri*). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).

(a,c:concentracion en el reactor, b,d: normalizado a 1 millón de células)

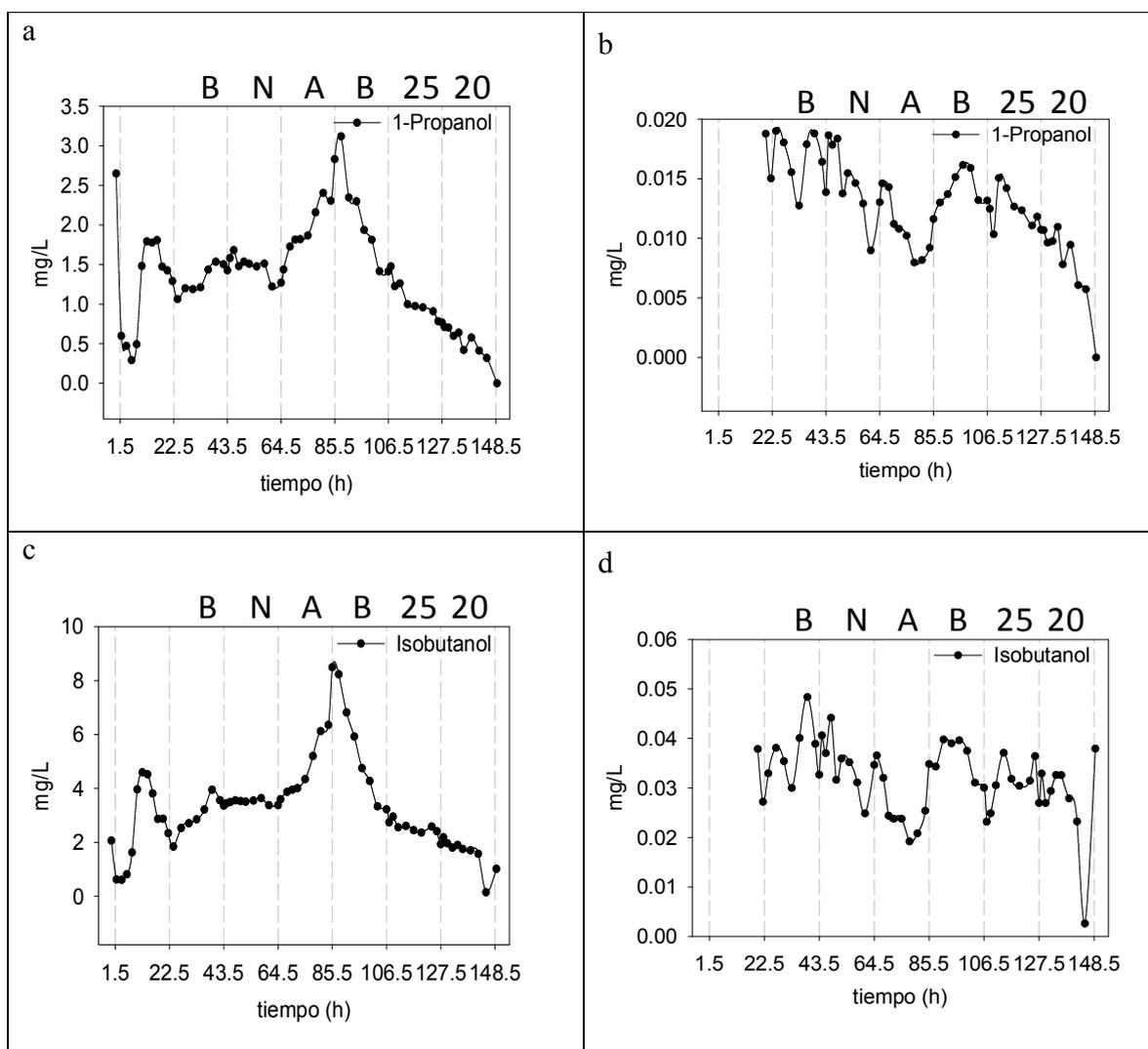


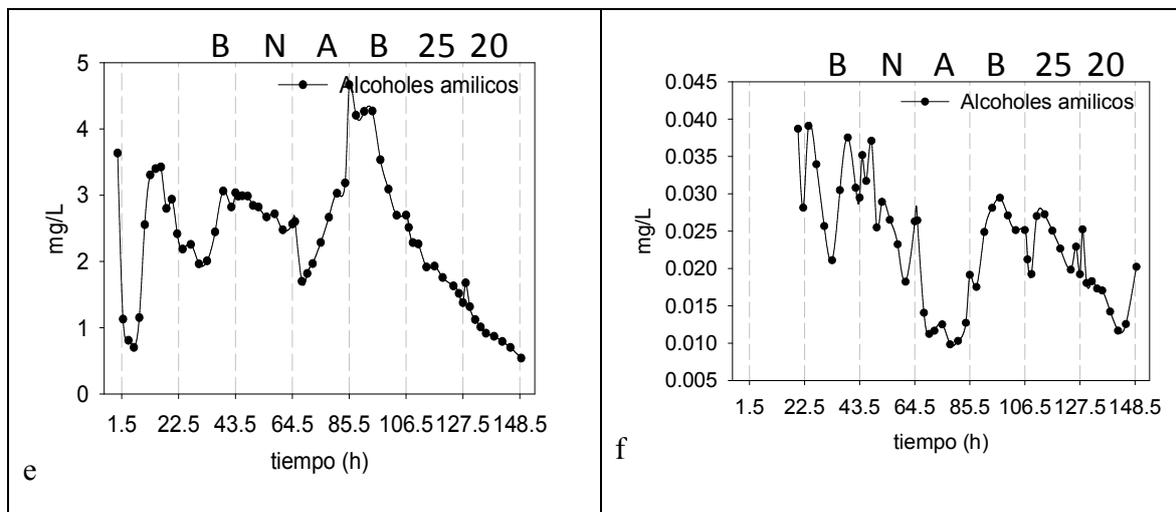
Los alcoholes superiores muestran una evolución en la concentración similar a la observada con el etanol (**Figura 7.5.24.**), por lo que la producción de alcoholes superiores está más relacionada con la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) a diferencia de AR5 (*S. cerevisiae*). Cabe resaltar también que la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) produce una menor concentración de alcoholes superiores lo cual es bueno desde el punto de vista toxicológico, pero hace falta

realizar una evaluación sensorial, para determinar de qué manera impacta en el sabor y olor de la bebida.

**Figura 7.5.24.** Evolución de la concentración producida de alcoholes superiores (1-propanol, isobutanol y alcohol amílico) a lo largo de la fermentación en continuo con la cepa GRO3 (*P. kluyveri*). B (Basal), N (Nitrógeno), A (Aireación), 25 (Temperatura de 25°C), 20 (Temperatura de 20°C).

(a,c,e:concentracion en el reactor, b,d,f: normalizado a 1 millón de células)





El estudio de las condiciones nutrimentales y ambientales puede llegar a favorecer la producción de los compuestos de nuestro interés, el estudio de una cepa de *S. cerevisiae* para la fermentación de cerveza, logro aumentar la concentración de ésteres, simplemente con el suplemento de los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo metabólico, así como el ajuste de las condiciones ambientales en torno a la levadura (Hiralal y col., 2014). No es necesario el uso de levaduras no-*Saccharomyces* cuando se conoce bien el funcionamiento de las levaduras que se utiliza normalmente.

Debemos considerar que las levaduras son seres vivos y que si queremos que produzcan tal o cual compuesto, debemos de favorecer las condiciones en las cuales las ponemos a crecer. No llega a ser necesario el uso de otro microorganismo para tener un producto diferente, siempre y cuando tengamos el conocimiento de la levadura que estamos utilizando. Por lo que el estudio de las condiciones optimas para cada una de ellas es imprescindible en todos los procesos fermentativos en caso de querer mejorar el proceso o bien realizar alguna modificación. (Jolly y col., 2014; Tristezza y col., 2014).

En la fermentación de cerveza con *S. pastorianus* una levadura tipo Lager. Los alcoholes superiores aumentan cuando el medio se suplementa con aminoácidos, reduciendo la concentración de ésteres, especialmente acetato de etilo (Procopio y col., 2015). Resultado en la modificación del aroma del producto final, cuando se conocen las características de la levadura en el proceso pueden realizarse modificaciones en la composición de nutrientes, llegando al resultado deseado, sin el cambio de la levadura utilizada para realizar la fermentación. Por otro lado en la producción de Cidra, el alto contenido de aminoácidos en el mosto de manzana es esencial para la producción de alcoholes superiores y ésteres que contribuyen al aroma final de la cidra y son producidos

por las levaduras durante la fermentación a partir de los aminoácidos que están naturalmente en el jugo (Eleutério dos Santos y col., 2015), debido a esto podemos decir que cada uno de los procesos fermentativos es diferente, los jugos o mostos proporcionan diferentes nutrientes a las levaduras y estas se adaptan para poder seguir creciendo y realizando su metabolismo, por tanto, debemos de estudiarlas para saber qué es lo que son capaces de hacer y simplemente colocarlas en el proceso correcto para salir nosotros beneficiados con el trabajo que ellas realizan de manera natural.

#### 7.5.4. CONCLUSIÓN

El cultivo continuo nos permitió detectar los cambios que provoca cada uno de los factores en cada cepa.

La aireación no tiene una relación con la producción de ésteres, como se había reportado.

La producción de cada uno de los compuestos depende de la cepa de levadura utilizada así como de los nutrientes de los que dispone en el medio y las condiciones ambientales a las que es expuesta la levadura.

Se pone en evidencia la necesidad de la caracterización de las cepas individualmente. Debido a que cada cepa presenta un perfil de producción de compuestos diferente.

## **7.6. CAPITULO 6. Relación entre la producción de ésteres y la expresión de genes ATF1 y ATF2 en *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación en continuo en jugo de *Agave*.**

### 7.6.1. INTRODUCCIÓN

Diversos estudios demuestran la relación que existe entre la expresión de genes ATF1 y ATF2 y la concentración de ésteres obtenidos al final de la fermentación. Más sin embargo, también se ha demostrado que al quitar estos genes del genoma de las levaduras, estas son capaces de seguir produciendo una concentración menor de ésteres. Además de que en el medio de fermentación se pueden llegar a dar las condiciones que favorecen la formación química de los mismos. Es por esto que en este trabajo se monitoreo la evolución de la concentración de compuestos volátiles incluyendo los ésteres que se produjeron en mayor concentración durante la fermentación en un sistema en continuo con cultivos puros de la cepa AR5 (*S. cerevisiae*) y DU3 (*K. marxianus*).

Esta tesis se realizó en el marco del proyecto FOMIX-JAL 123157, en el cual se desarrollo en conjunto la tesis de maestría de la IAI Laura Elena Iñiguez Muñoz, quien contribuyó al desarrollo de la metodología y procesamiento de muestras para la elaboración de este capítulo de la tesis.

### 7.6.2. METODOLOGÍA

La metodología seguida fue la reportada en la tesis de [Iñiguez Muñoz \(2014\)](#), donde se logro montar la técnica, así como la determinación y estandarización de los genes tanto de referencia como de interés para este trabajo.

Se utilizó como gen de referencia el gen ACT1, y los genes de interés ATF1, ATF2 y EHT1, para la cepa AR5 (*S. cerevisiae*); mientras que para la cepa DU3 (*K. marxianus*) se utilizó el gen de referencia ACT1 y el gen de interés ATF1. Esto debido a la poca información que se tiene acerca del genoma y en especifico de los genes de *K. marxianus* relacionados con la producción de ésteres. Respecto a la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) no se cuenta con información de los genes relacionados con la expresión de enzimas relacionadas con la producción de ésteres y mucho menos con información acerca de su genoma, por lo que en este capítulo no se tomara en cuenta.

### 7.6.3. RESULTADOS

La medición de la expresión genética fue posible realizarla para la cepa AR5 (*S. cerevisiae*) debido a que se cuenta con información bibliográfica suficiente para realizarla, mientras que para la cepa DU3 (*K. marxianus*) la información es poca. Respecto a la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) es nula.

#### 7.6.3.1. Correlación entre el nivel de la expresión de genes ATF1, ATF2, EHT1 y la concentración de etanol y ésteres de la cepa AR5 (*S. cerevisiae*).

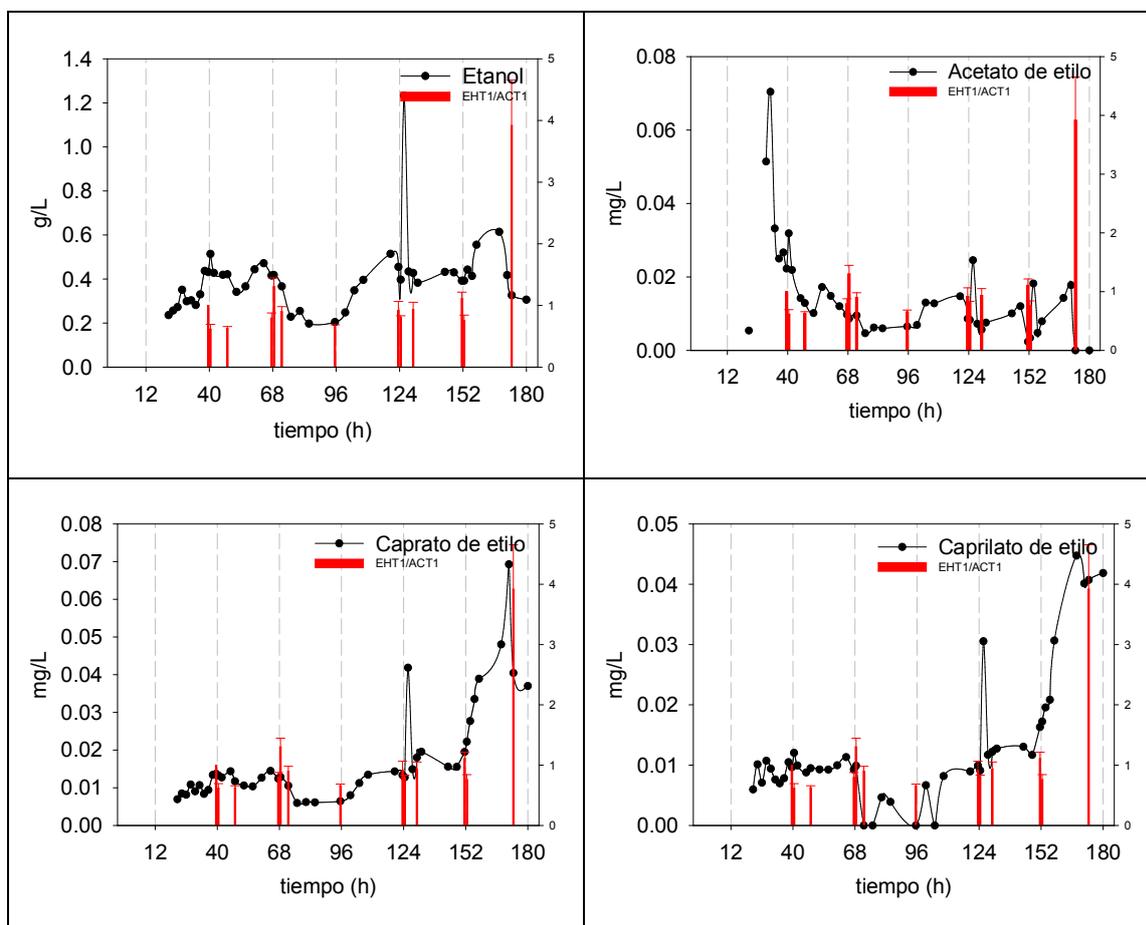
Después de realizar la medición de la expresión genética de los genes ATF1, ATF2 y EHT1 de la cepa AR5 (*S. cerevisiae*) y compararlo con la concentración de ésteres producidos se encontró una correlación tanto para el caprato de etilo como para el caprilato de etilo, mientras que el éster producido en mayor concentración, el acetato de etilo, no mostro correlación entre la concentración producida y el nivel de expresión de estos genes, por lo que para este trabajo se puede decir que el nivel de expresión de estos genes no está directamente relacionado con la concentración de acetato de etilo producida tanto para los genes ATF1 y ATF2 como para el gen EHT1 (**Tabla 7.6.1.**), por lo que podría pensarse que existe otra vía de síntesis, o bien, puede estarse produciendo de manera química en el medio, cosa que hará falta comprobar en otro estudio posterior.

**Tabla 7.6.1.** Valor del coeficiente de correlación que existe entre cada uno de los genes de interés y la concentración de ésteres producida.

Compuesto	EHT1	ATF1	ATF2
Acetato de etilo	Sin correlación	Sin correlación	Sin correlación
Caprato de etilo	0.88	0.93	0.97
Caprilato de etilo	0.86	0.91	0.96

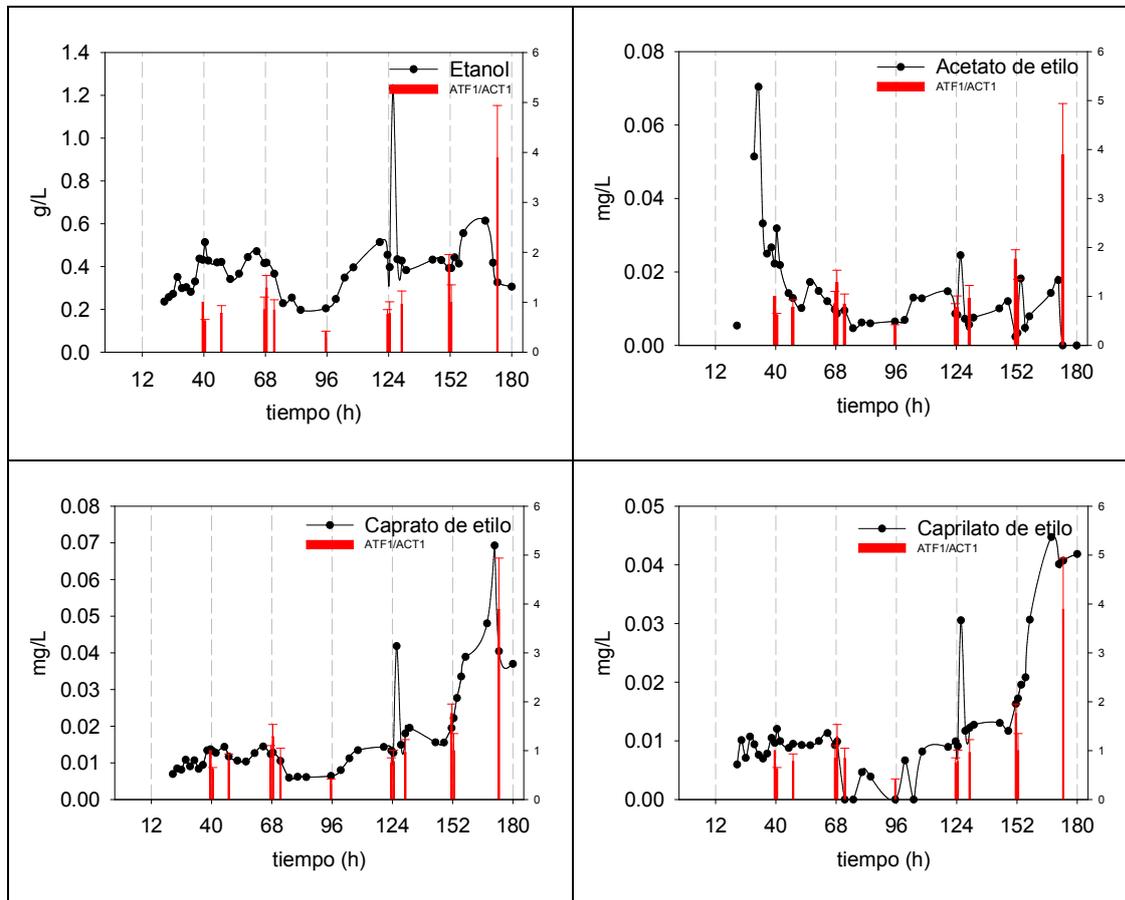
Además de realizar las comparaciones puntuales entre la expresión génica y la concentración de ésteres, se realizó la comparación de toda la cinética de la concentración de ésteres y las mediciones puntuales de la expresión génica del gen EHT1, observando de manera grafica la correlación que existe entre el caprato y caprilato de etilo (**Figura 7.6.1.**), también se realizó una comparación de manera grafica entre la concentración de etanol y el nivel de expresión de los genes, sin observar una correlación, debido a que los genes han sido relacionados con la expresión de ésteres.

**Figura 7.6.1.** Comparación entre la cinética de concentración de etanol y ésteres (acetato de etilo, caprato de etilo y caprilato de etilo) con el nivel de expresión del gen EHT1 con respecto al gen ACT1 de la cepa AR5 (*S. cerevisiae*).

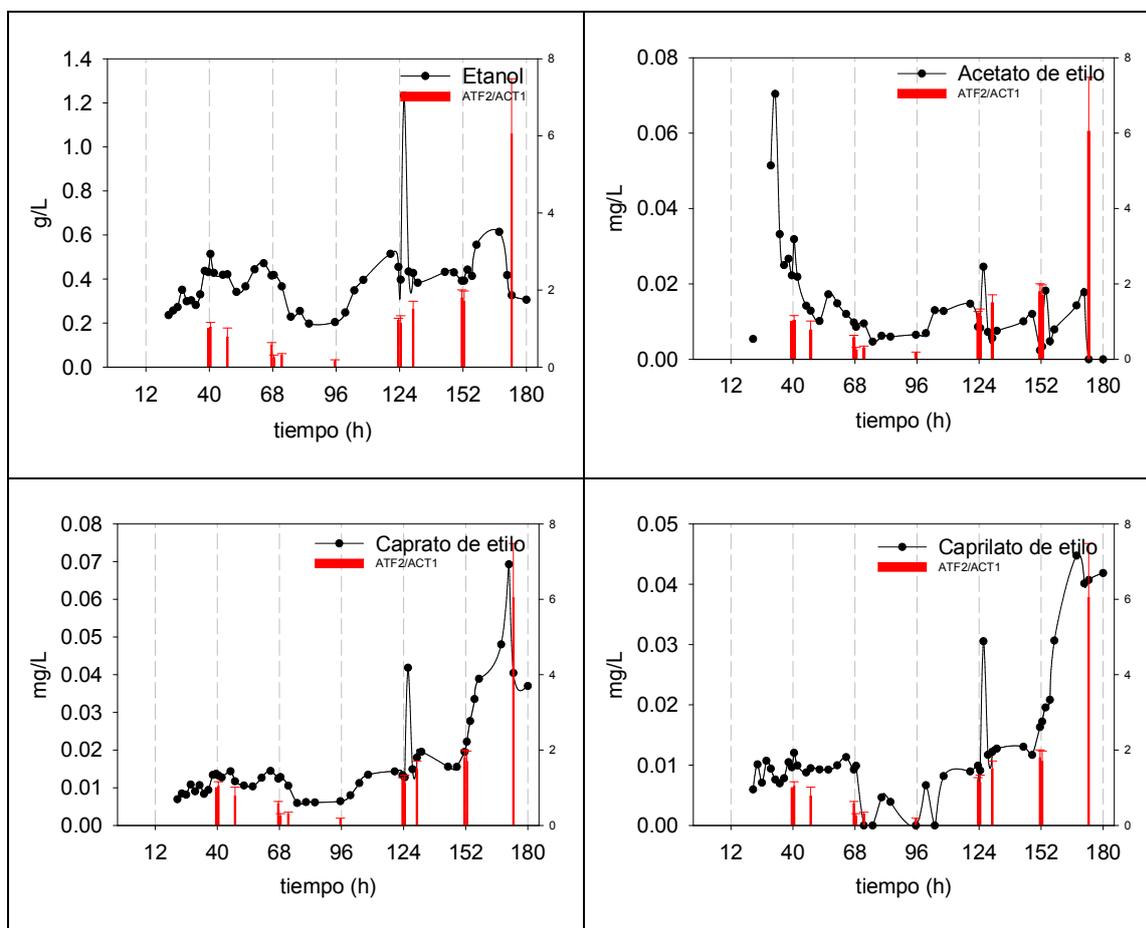


De la misma manera se realizó la comparación grafica de la cinética de concentración de etanol y ésteres con los genes ATF1 con respecto al gen ACT1 (**Figura 7.6.2.**) y el gen ATF2 con respecto al gen ACT1 (**Figura 7.6.3.**), observando el mismo efecto que con el gen EHT1 donde solo hay una correlación entre el caprato y caprilato de etilo con la expresión de genes ATF1 y ATF2.

**Figura 7.6.2.** Comparación entre la cinética de concentración de etanol y ésteres (acetato de etilo, caprato de etilo y caprilato de etilo) con el nivel de expresión del gen ATF1 con respecto al gen ACT1 de la cepa AR5 (*S. cerevisiae*).



**Figura 7.6.3.** Comparación entre la cinética de concentración de etanol y ésteres (acetato de etilo, caprato de etilo y caprilato de etilo) con el nivel de expresión del gen ATF2 con respecto al gen ACT1 de la cepa AR5 (*S. cerevisiae*).



### 7.6.3.2. Correlación entre el nivel de la expresión del gen ATF1 y la concentración de etanol y ésteres de la cepa DU3 (*K. marxianus*).

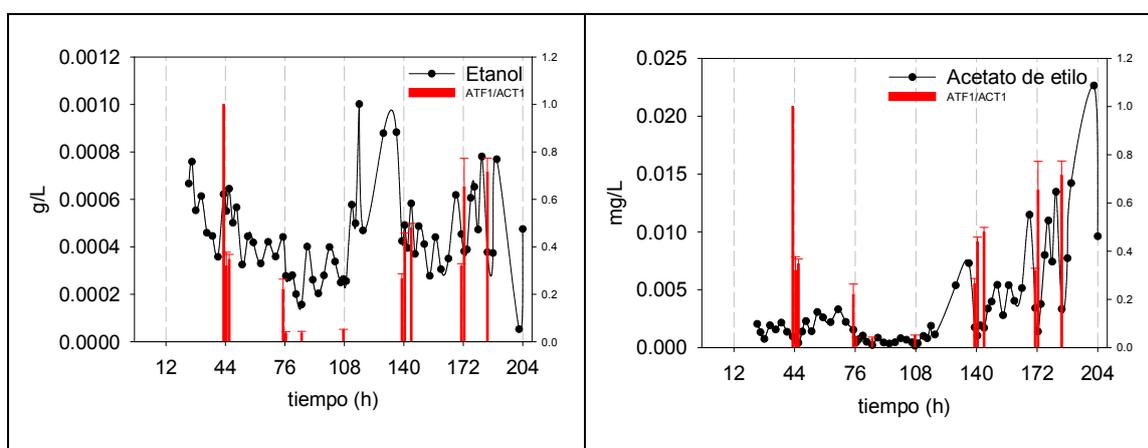
Al realizar una comparación entre la concentración de acetato de etilo y acetato de isoamilo con el nivel de expresión del gen ATF1 no se encontró correlación mientras que la comparación con la concentración de caprato de etilo mostro una correlación con un valor muy bajo de 0.7 (**Tabla 7.6.2.**).

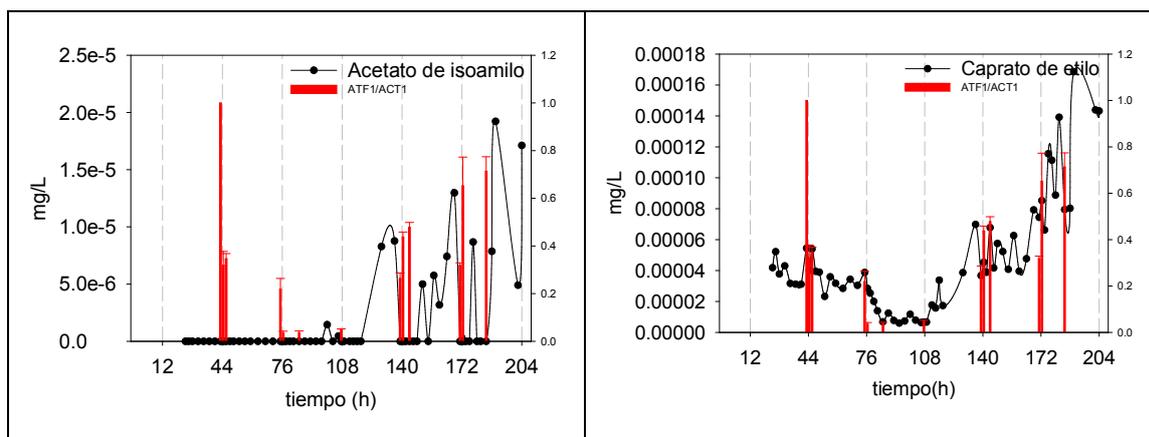
**Tabla 7.6.2.** Valor del coeficiente de correlación que existe entre cada uno de los genes de interés y la concentración de ésteres producida.

Compuesto	ATF1
Acetato de etilo	Sin correlación
Caprato de etilo	0.70
Acetato de isoamilo	Sin correlación

Después de realizar la comparación grafica de la cinética de producción de etano y ésteres con el nivel de expresión del gen ATF1 (**Figura 7.6.4.**), sigue sin observarse una correlación directa durante toda la cinética.

**Figura 7.6.4.** Comparación entre la cinética de concentración de etanol y ésteres (acetato de etilo, acetato de isoamilo y caprato de etilo) con el nivel de expresión del gen ATF1 con respecto al gen ACT1 de la cepa GRO3 (*P. kluyveri*).





Se ha reportado que *Saccharomyces cerevisiae* muestra una baja actividad genética y metabólica cuando está en co-cultivo con *Hanseniaspora guilliermondii* (Barbosa y col., 2015). En nuestro caso el estudio fue de manera independiente, observando diferencias en el metabolismo entre las 2 levaduras estudiadas. Y posteriormente poder hacer experimentos de la expresión en co-cultivos.

Benito y col., (2015) reportan no haber encontrado una mayor producción de ésteres en vino, pero sensorialmente si detectaron que los vinos producidos por levaduras no-*Saccharomyces* resultaron con un perfil aromático mas frutal, detectado por los catadores. Contrario a lo que se ha reportado anteriormente, donde el bouquet de los vinos esta dado por la concentración de los esterres en las bebidas alcohólicas (Rapp y Mandery 1986). Las levaduras no-*Saccharomyces* son buenas productoras de esterres de acetato en vino (Rojas y col., 2001; Plata y col., 2003). Por lo que el sabor final de las bebidas alcohólicas depende de la combinación de todos los compuestos presentes. El disminuir la concentración de etanol en vino, permite que los demás sabores puedan ser percibidos, por lo que, los vinos con bajo contenido de etanol, resultan ser mas aromáticos por si solos, sensorialmente, sin modificar la concentración de ésteres.

En la fermentación de jugo de azúcar de caña para la elaboración de cachaça en Brazil con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se logro encontrar una correlación entre el efecto que tienen el nitrógeno (sulfato de amonio) en la expresión de los genes reguladores de la producción de alcoholes superiores y esterres. Teniendo que con el aumento en la concentración de sulfato de amonio se observó una disminución en la regulación de los genes que codifican para las descarboxilasas y dehidrogenasas en la ruta de Ehrlich. Por otro lado con un poco de sulfato de amonio fueron incrementados los esterres de acetato y con una concentración mayor de sulfato de amonio los acetil-esterres encontrando una correlación la expresión de acohol-acil-transferasa EEB1 y acil-esterasa

IAH1 (Espinosa-Vidal y col., 2013). En nuestro caso, no encontramos correlación de los ésteres producidos con la perturbación al adicionar nitrógeno.

La mejor correlación entre la expresión de genes y producción de ésteres la encontramos cuando realizamos modificaciones en la temperatura. Cuando las levaduras se adaptan a las temperaturas bajas para realizar la fermentación resulta en la producción de una bebida alcohólica con un perfil aromático diferente que por lo general es más rica en ésteres. Incluso las cepas del género *Saccharomyces* llegan a presentar una concentración mayor de esterres al fermentar a temperaturas bajas (Gamero y col., 2014).

Estudios con diferentes cepas de *S. cerevisiae* demuestran que existen diferencias entre la regulación de ésteres de acetato, etil esterres y alcoholes superiores, sugiriendo que la concentración de ácidos grasos es la que más influye en la concentración final de etil esterres, mientras que la producción de esterres de acetato depende de la acción de la enzima alcohol-acil-transferasa. Además de encontrar 2 cepas atípicas que no presentaron el mismo comportamiento de regulación para la síntesis de aromas obteniendo una concentración mayor de de lo que se esperaba (Rollero y col., 2015). Por lo que cada una de las cepas de levaduras lleva a cabo una regulación propia, de acuerdo al proceso adaptativo del medio en el que se encuentra. En nuestro trabajo al no encontrar una correlación directa entre la concentración de esterres y los genes de la enzimas estudiadas, demuestra que las levaduras llevan a cabo proceso de adaptación y metabólicos que aun no llegamos a elucidar por completo.

La producción de ésteres está regulada por acción de las enzimas que está ligada a la expresión de los genes que las codifican, pero también a la concentración de precursores en el medio que son los que activan a los genes para que estos produzcan las enzimas. El alto contenido de aminoácidos en jugo de manzana para la producción de cidra es esencial para la producción de alcoholes superiores y esterres que son biotransformados por las levaduras durante el proceso de fermentación (Eleutério dos Santos y col., 2015).

También se ha observado que no solo la actividad enzimática es la responsable del cambio en la concentración de compuestos volátiles que repercuten en el perfil aromático de las bebidas alcohólicas. Se ha reportado que la utilización de *Geotrichum* en producto terminado disminuye la concentración de alcoholes superiores debido a una absorción de los mismos por las células del hongo además de procesos enzimáticos que realiza. También se modifica la concentración de ésteres, pero estos si son únicamente por procesos enzimáticos que realiza el hongo (Zhu y col., 2015).

#### 7.6.4. CONCLUSIÓN

No se logro establecer una correlación de los ésteres producidos con la perturbación al adicionar nitrógeno.

La mejor correlación encontrada entre la expresión de genes y producción de ésteres es cuando realizamos modificaciones en la temperatura.

Cada una de las cepas de levaduras lleva a cabo una regulación del metabolismo para la producción de ésteres diferente, de acuerdo al proceso adaptativo del medio en el que se encuentra. Debido a que no encontramos una correlación directa entre la concentración de esteres y los genes de la enzimas estudiadas.

Las levaduras no-*Saccharomyces* llevaron a cabo proceso de adaptación y tienen rutas metabólicas de producción y regulación que aun no llegamos a elucidar por completo.

## **7.7. CAPITULO 7. Comparación de capacidades fermentativas de las cepas AR5, DU3 y GRO3 entre nivel reactor y nivel matraz, en condiciones controladas en el laboratorio.**

### 7.7.1. INTRODUCCIÓN

El escalamiento a nivel industrial de las condiciones probadas en el laboratorio, resulta en un proceso complejo, debido a que es difícil repetir las mismas condiciones físicas y químicas en volúmenes mayores. Existen diversas etapas para poder realizar un correcto escalamiento. Iniciando con las pruebas a nivel matraz, donde la agitación, control de temperatura y homogeneidad del medio son relativamente sencillo. Después se continúa con llevar las mismas condiciones probadas en matraz a un biorreactor que controla la velocidad de agitación y temperatura, buscando tener condiciones similares a las que se tienen en el matraz.

En este capítulo se compararon los resultados obtenidos entre los niveles de matraz y biorreactor, debido a que se desea en un futuro poder llevar estas condiciones a un nivel industrial y reproducir los resultados, aumentando la concentración de ésteres y etanol producidos.

### 7.7.2. METODOLOGÍA

Se realizaron fermentaciones a nivel reactor de 3L con un volumen de trabajo de 2L en jugo de *Agave*. Los reactores se inocularon con  $1 \times 10^6$  cel/mL de un cultivo de 18 a 20 h crecido en YPD a 30°C y 250 rpm. Durante las fermentaciones se controló la temperatura a 30°C y la agitación axial a 250 rpm. Los resultados mostrados son duplicados de fermentador en paralelo y se comparan con los resultados de las fermentaciones a nivel matraz mostrados en el capítulo 4 para los cultivos puros y los resultados de las fermentaciones a nivel matraz que se detallan en el capítulo 9 para los cultivos mixtos.

De la fermentación del cultivo puro de GRO3 en fermentador se realizaron 4 replicas, debido a que se observó que en las primeras 2 replicas en paralelo la cepa no mostro un crecimiento, se repitió nuevamente con 2 fermentadores en paralelo para lo cual se sacó una alícuota del congelador de la cepa, esto para descartar un estrés fisiológico de la cepa por su conservación en refrigeración a 4°C, mostrando nuevamente los mismos resultados.

Debido a que se observó que la cepa GRO3 no creció y no fermentó como se había observado en matraz, se decidió realizar una fermentación con aireación en las primeras horas de crecimiento en el reactor. De esta fermentación solo se monitoreo la población y el

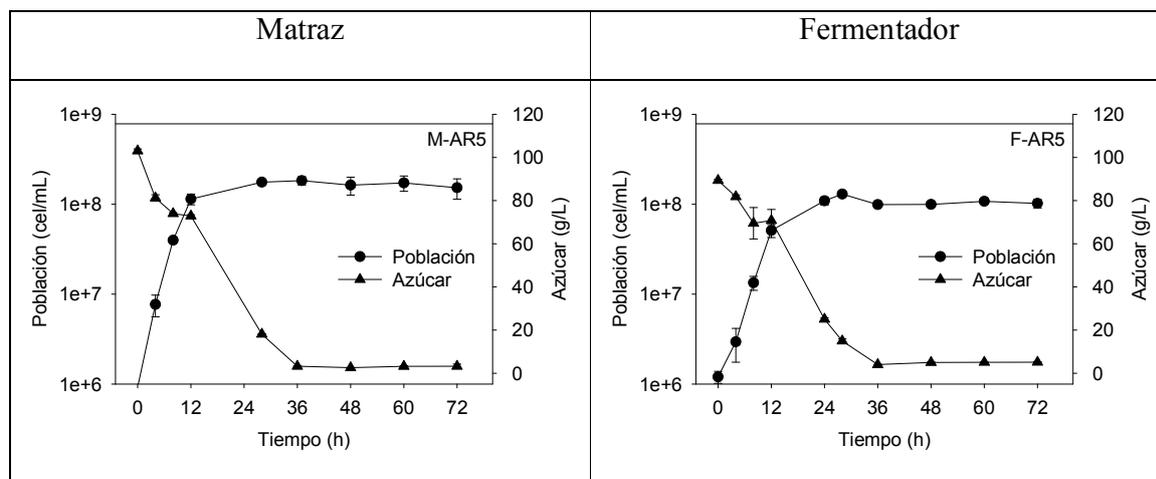
azúcar, no se midieron compuestos volátiles, con lo que obtuvieron cinéticas similares a las que se habían obtenido a nivel matraz, por lo que se realizaron 2 fermentaciones en paralelo donde se administró aireación a 0.5 vvm durante las primeras 12 horas para favorecer el crecimiento y posteriormente se retiró la aireación para permitir que se llevara a cabo la fermentación. Los resultados que se muestran a continuación corresponden a los obtenidos cuando se aireo el reactor las primeras 12 horas. Al igual que para el cultivo puro, el cultivo mixto de AR5/GRO3 se aireo durante las primeras 12 horas y son los resultados que se muestran.

### 7.7.3. RESULTADOS

#### 7.7.3.1. Fermentación del cultivo puro de AR5

La evolución de la población de levaduras tanto en matraz como en fermentador, presenta un comportamiento similar, al igual que el consumo de azúcar (**Figura 7.7.1.**). El consumo de azúcar, es casi total a las 36 horas en ambas fermentaciones.

**Figura 7.7.1.** Evolución de la población de levaduras y concentración de azúcar a lo largo de la fermentación con la cepa AR5 (*S. cerevisiae*) en cultivo puro a nivel matraz y nivel biorreactor de 3L.



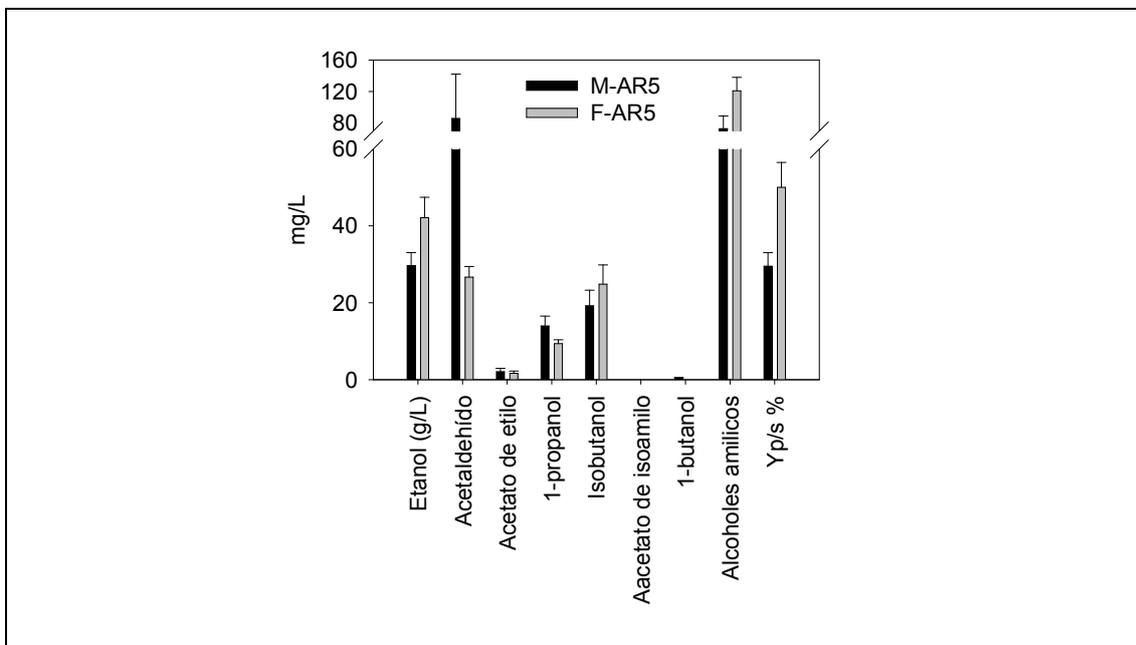
En la **figura 7.7.2.** se observa una mayor producción de etanol a nivel biorreactor de 3L que lo que se obtuvo en matraz, y el acetaldehído a la inversa, siendo a nivel matraz donde se presentó una mayor concentración.

Ésteres como acetato de etilo presentan concentraciones similares, y los alcoholes superiores 1-propanol y 1-butanol se produjeron en mayor concentración a nivel matraz, mientras que el isobutanol y los alcoholes amílicos presentaron una mayor concentración a nivel biorreactor.

El rendimiento de la producción de etanol respecto al consumo de azúcar ( $Y_{p/s}$ ) obtenido fue mejor a nivel biorreactor, puesto que el consumo de azúcar fue similar mientras que la concentración de etanol fue mayor en el biorreactor.

Debido a esto se puede decir que las condiciones no se lograron reproducir al 100% con la cepa AR5 (*S. cerevisiae*) entre el nivel matraz y el nivel biorreactor pero, el cambio de nivel favoreció a la cepa teniendo mejores rendimiento de producción de etanol en el biorreactor con similares concentraciones de ésteres.

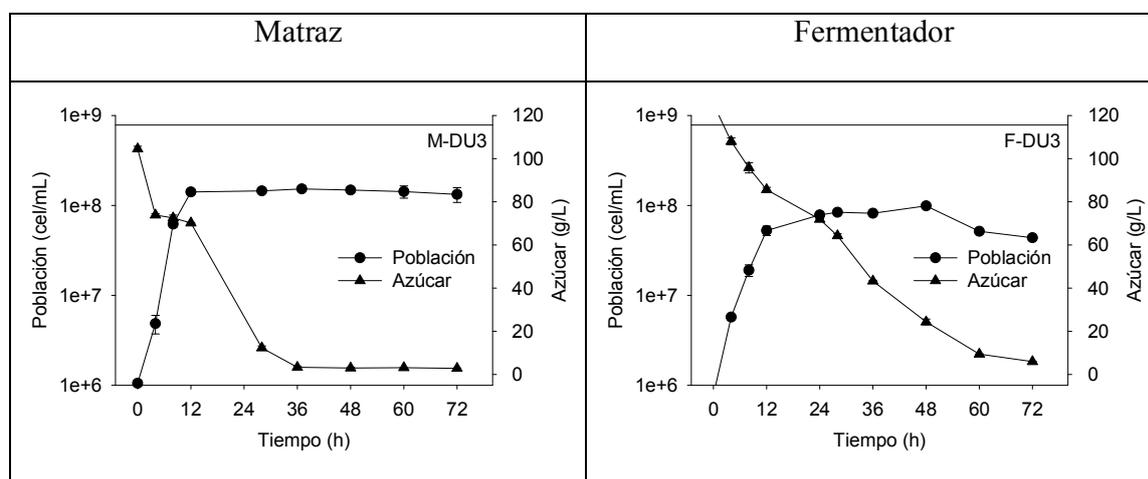
**Figura 7.7.2.** Concentración de los principales compuestos volátiles y rendimiento de alcohol respecto al sustrato ( $Y_{p/s}$ ) producidos por la cepa AR5 (*S. cerevisiae*) en cultivo puro a nivel matraz y nivel biorreactor de 3L.



### 7.7.3.2. Fermentación del cultivo puro de DU3

Tanto la evolución de la población como de consumo de azúcar fue mejor a nivel matraz, observando en la **figura 7.7.3.** que la concentración de levaduras se mantiene estable hasta las 72 horas a nivel matraz, mientras que a nivel biorreactor se observa un decaimiento después de las 48 horas. El consumo de azúcar es casi total a las 36 horas a nivel matraz, mientras que a nivel biorreactor es hasta las 60-72 horas cuando se llega a los niveles más bajos.

**Figura 7.7.3.** Evolución de la población de levaduras y concentración de azúcar a lo largo de la fermentación con la cepa DU3 (*K. marxianus*) en cultivo puro a nivel matraz y nivel biorreactor de 3L.

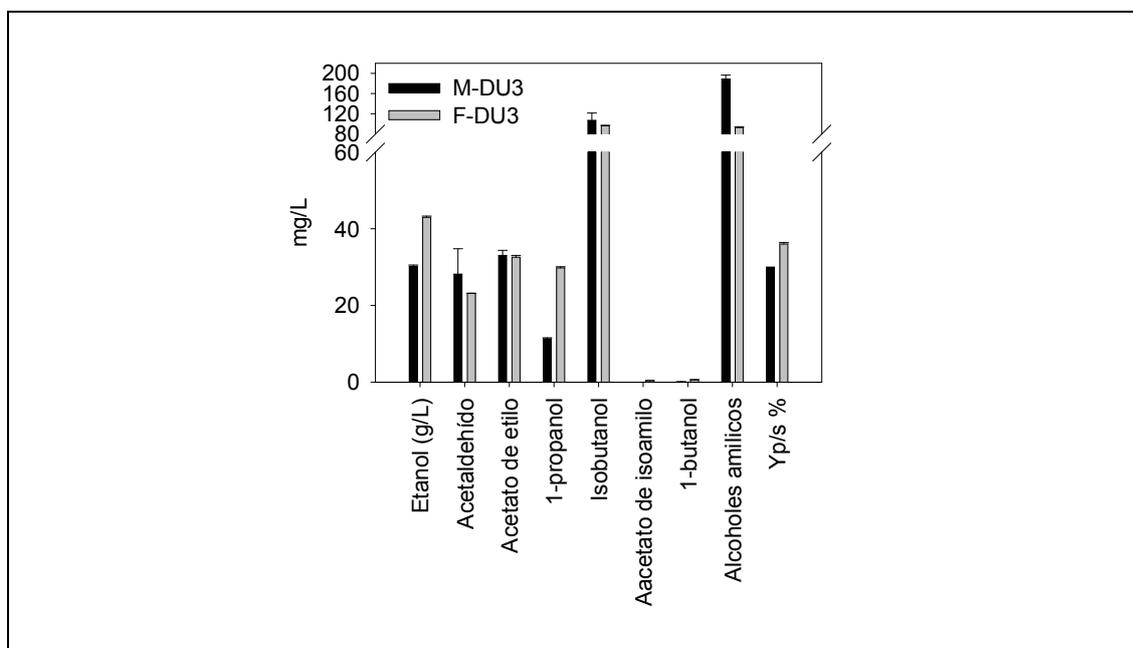


Al igual que con la cepa AR5 (*S. cerevisiae*) se observa una mayor concentración de etanol producida por la cepa DU3 (*K. marxianus*) entre el nivel matraz y el nivel biorreactor, siendo mayor en el nivel biorreactor y por tanto se observa que el rendimiento de la producción de etanol es mayor en el biorreactor y respecto a la concentración de acetaldehído obtenida es menor en el biorreactor (**Figura 7.7.4.**).

Respecto a los ésteres producidos se observan concentraciones similares de acetato de etilo, mientras que el acetato de isoamilo en el biorreactor se logra una producción muy pequeña. Los alcoholes superiores muestran concentraciones diferentes observando que el 1-propanol se produce más en el biorreactor, mientras que el isobutanol presenta concentraciones similares y finalmente los alcoholes amílicos que son los que se producen en mayor concentración muestran una concentración menor en el biorreactor en comparación con la concentración obtenida a nivel matraz (**Figura 7.7.4.**).

Si bien no se obtuvieron concentraciones similares entre ambos niveles estudiados con la cepa DU3 (*K. marxianus*), se observa que el llevarla a un nivel mayor de trabajo logra aumentar el rendimiento en la producción de etanol, sin que se vea afectada la concentración de ésteres, y por otro lado, se disminuye la concentración de alcoholes superiores que si bien son deseados en la bebida y contribuyen al sabor y olor, también son regulados por la norma debido a su toxicidad.

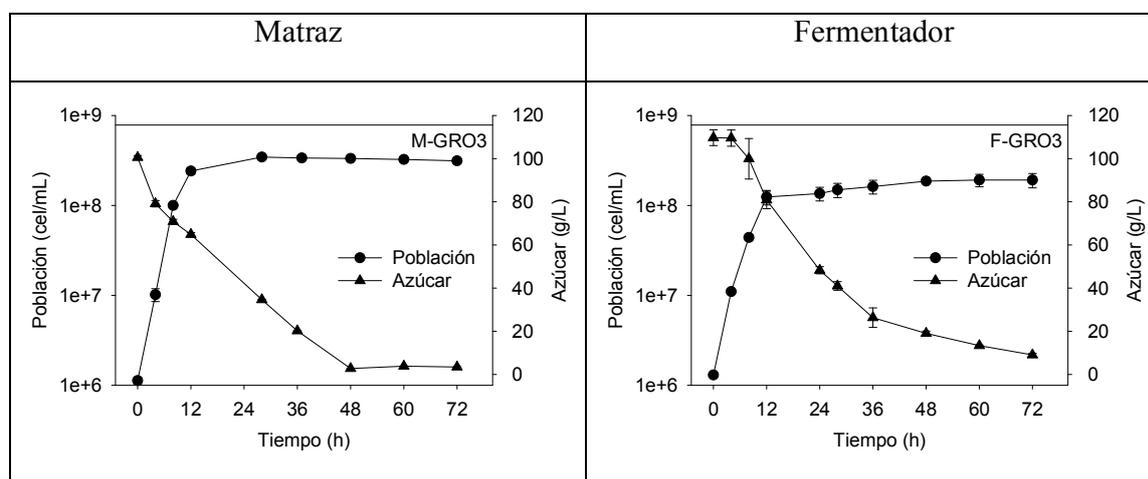
**Figura 7.7.4.** Concentración de los principales compuestos volátiles y rendimiento de alcohol respecto al sustrato ( $Y_{p/s}$ ) producidos por la cepa DU3 (*K. marxianus*) en cultivo puro a nivel matraz y nivel biorreactor de 3L.



#### 7.7.3.4. Fermentación del cultivo puro de GRO3

Después de la aireación del biorreactor durante las primeras 12 horas para favorecer el crecimiento de la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) se observa en la **figura 7.7.5.** cinéticas de la evolución de la población de levaduras similares, mientras que el consumo de azúcar es menor a nivel biorreactor, en comparación a lo obtenido a nivel matraz, debido a que en el nivel matraz se tiene un consumo casi total del azúcar a las 48 horas mientras que en el biorreactor se presenta hasta las 72 horas.

**Figura 7.7.5.** Evolución de la población de levaduras y concentración de azúcar a lo largo de la fermentación con la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) en cultivo puro a nivel matraz y nivel biorreactor de 3L.



Si bien, la cepa fue afectada al llevarla a nivel biorreactor, se observa que la aireación durante las primeras 12 horas, favorece no solo el crecimiento sino también la producción de todos los metabolitos, teniendo como resultado una concentración de etanol superior en el biorreactor en comparación a la obtenida a nivel matraz (**Figura 7.7.6.**).

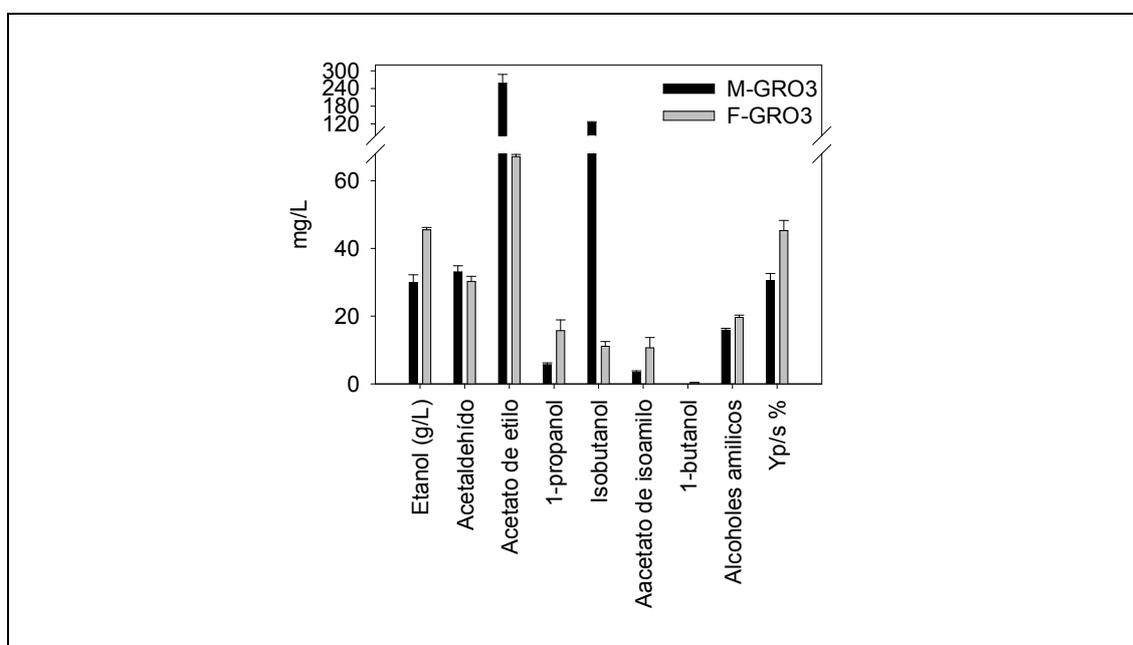
La concentración de acetaldehído no muestra diferencias en cuanto a la producción en ambos niveles. No siendo así para los ésteres, donde se observa que el acetato de etilo presenta una mayor concentración a nivel matraz, mientras que el acetato de isoamilo se produjo en una concentración mayor a nivel biorreactor (**Figura 7.7.6.**). Como ya se había observado en el biorreactor en continuo (capítulo 5), los cambios observados en la producción de acetato de etilo, no siempre corresponden a los cambios en acetato de isoamilo, por lo que no son sintetizados por la misma enzima.

Los alcoholes superiores como el 1-propanol fue producido en mayor concentración a nivel biorreactor, mientras que el isobutanol se produjo en una concentración mayor a nivel matraz con una diferencia muy grande y finalmente los alcoholes amílicos presentan una concentración mayor a nivel fermentador, pero esta diferencia no es significativa entre el nivel matraz y el nivel biorreactor (**Figura 7.7.6.**).

El rendimiento de la producción de etanol obtenido al final de la fermentación es mayor a nivel biorreactor, al igual que se había observado anteriormente con la cepa AR5 (*S. cerevisiae*) y la cepa DU3 (*K. marxianus*) (**Figura 7.7.6.**).

Si bien no se logra reproducir los resultados al 100% entre el nivel matraz y el nivel biorreactor, con la cepa GRO3 (*P. kluyveri*), fue la cepa que presentó los mayores problemas para lograr que los resultados obtenidos fueron lo más parecidos posibles, comenzando con tener que colocar aireación al inicio para favorecer el crecimiento. Pero estas diferencias favorecen positivamente el rendimiento de etanol y disminuyen un poco la concentración final de alcoholes superiores totales, aunque negativamente debido a que la concentración de ésteres como acetato de etilo, disminuyen significativamente, pero por otro lado se aumenta un poco la concentración de acetato de isoamilo.

**Figura 7.7.6.** Concentración de los principales compuestos volátiles y rendimiento de alcohol respecto al sustrato ( $Y_{p/s}$ ) producidos por la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) en cultivo puro a nivel matraz y nivel biorreactor de 3L.



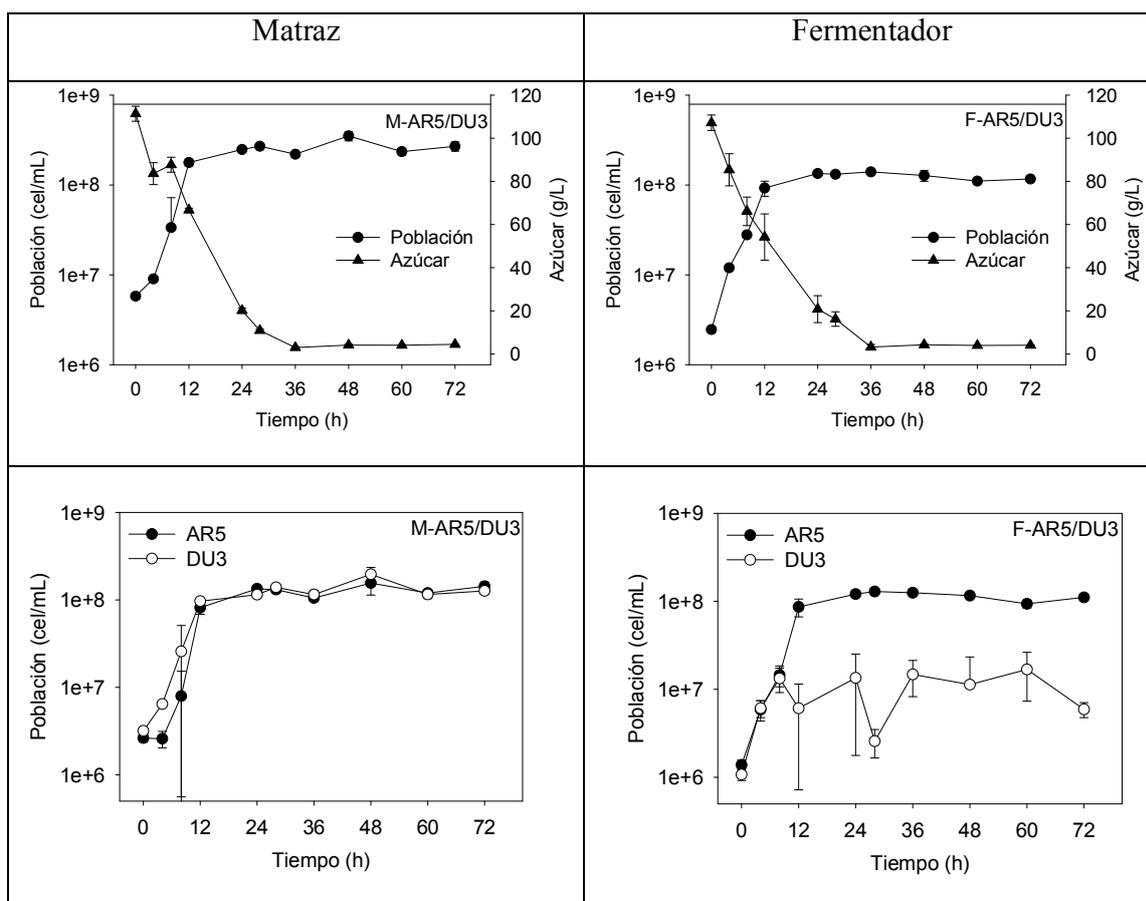
#### 7.7.3.5. Comparación de las capacidades fermentativas de las cepas en cultivo mixto entre el nivel matraz y el nivel biorreactor.

Al igual que con los cultivos puros, se estudio la producción de compuestos volátiles en cultivo mixto, teniendo siempre presente la cepa AR5 (*S. cerevisiae*) en co-cultivo con una cepa no-Saccharomyces, que para este caso fueron las cepas DU3 (*K. marxianus*) y GRO3 (*P. kluyveri*).

### 7.7.3.5.1. Fermentación AR5/DU3

En la **figura 7.7.7.** se observa la evolución de la población total de levaduras siendo mayor la concentración de las mismas en nivel matraz en comparación con la obtenida a nivel biorreactor. También se puede apreciar que a pesar de que el crecimiento no fue igual, el consumo de azúcar si es similar para ambos casos. Por otro lado al hacer una comparación de la concentración de cada una de las poblaciones se puede apreciar que en la fermentación a nivel matraz la relación de concentración entre AR5 (*S. cerevisiae*) y DU3 (*K. marxianus*) se mantiene en un 50% durante todo el transcurso de la fermentación. Pero no es el caso para el nivel biorreactor, donde AR5 (*S. cerevisiae*) es la que predomina durante toda la fermentación, si bien, DU3 (*K. marxianus*) no llega a presentar una concentración similar a la de *Saccharomyces*, cabe resaltar que ésta se mantiene a lo largo de la fermentación.

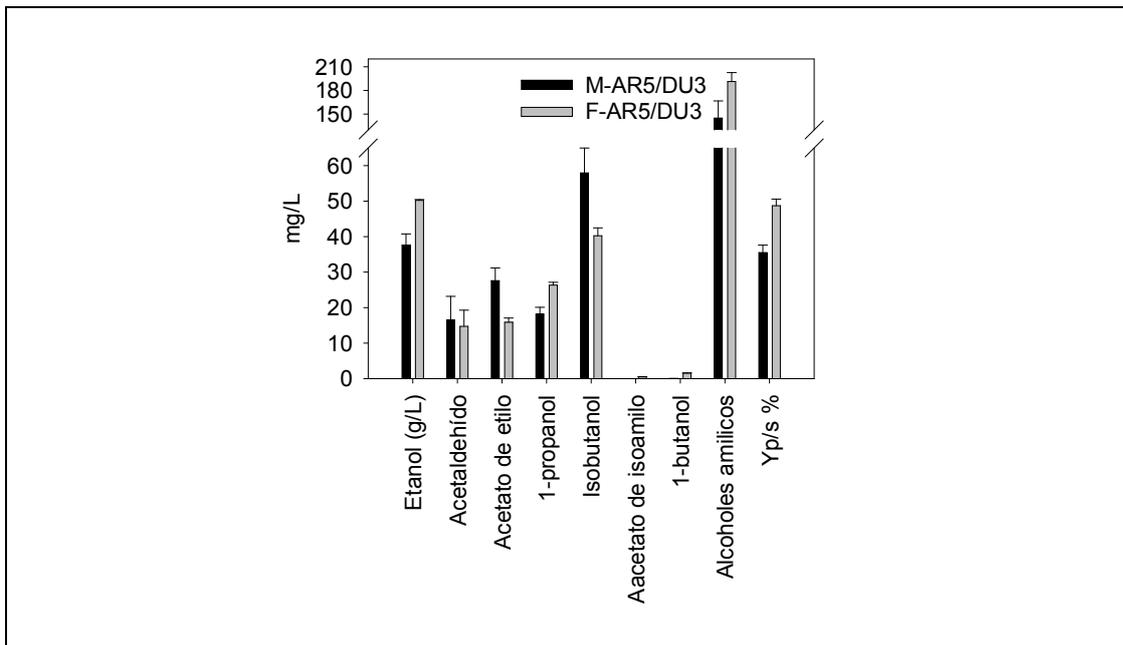
**Figura 7.7.7.** Evolución de la población de levaduras y concentración de azúcar a lo largo de la fermentación en cultivo mixto con las cepas AR5 (*S. cerevisiae*) y DU3 (*K. marxianus*) a nivel matraz y nivel biorreactor de 3L.



La concentración de etanol producida fue mayor a nivel biorreactor, lo que corresponde a un rendimiento de etanol mayor, el acetaldehído no presenta diferencias entre ambos niveles, mientras que los ésteres como el acetato de etilo fue producido en mayor concentración a nivel matraz y el acetato de isoamilo se logró detectar una pequeña concentración en el biorreactor. Los alcoholes superiores como 1-propanol y alcoholes amílicos presentaron una mayor concentración a nivel biorreactor mientras que el isobutanol fue menor su concentración (**Figura 7.7.8.**).

En comparación con las fermentaciones en cultivo puro, la fermentación mixta muestra un parecido mas a la cepa DU3 (*K. marxianus*). Si bien a nivel matraz se mantuvieron en una relación del 50%, el aporte por parte de la cepa DU3 (*K. marxianus*) fue positivo y a pesar de que en el biorreactor la cepa DU3 (*K. marxianus*) se mantuvo en una concentración menor se logra una mayor producción tanto de acetato de etilo como de los alcoholes superiores isobutanol y alcoholes amílicos, en comparación a las concentraciones que se obtienen con AR5 (*S. cerevisiae*) en cultivo puro.

**Figura 7.7.8.** Concentración de los principales compuestos volátiles y rendimiento de alcohol respecto al sustrato ( $Y_{p/s}$ ) producidos por las cepas AR5 (*S. cerevisiae*) y DU3 (*K. marxianus*) en cultivo mixto a nivel matraz y nivel biorreactor de 3L.

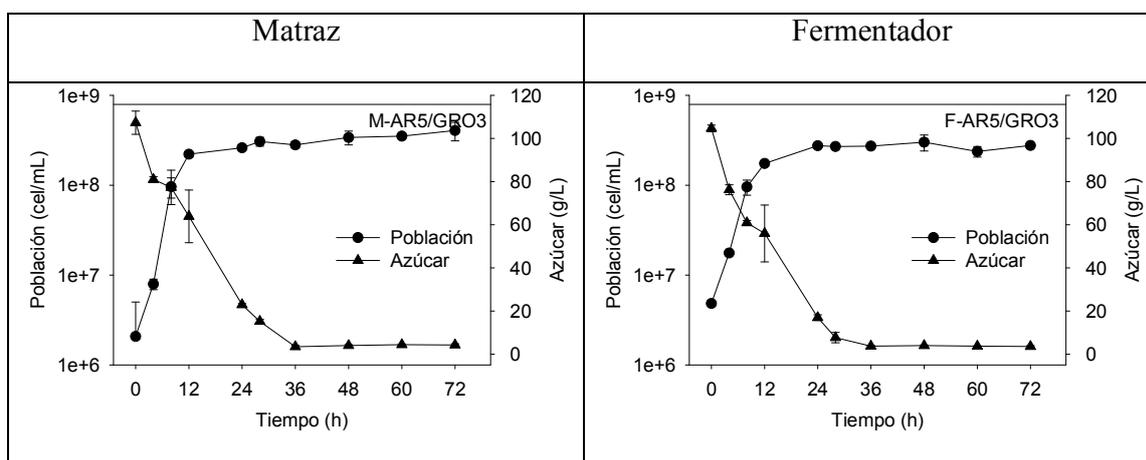


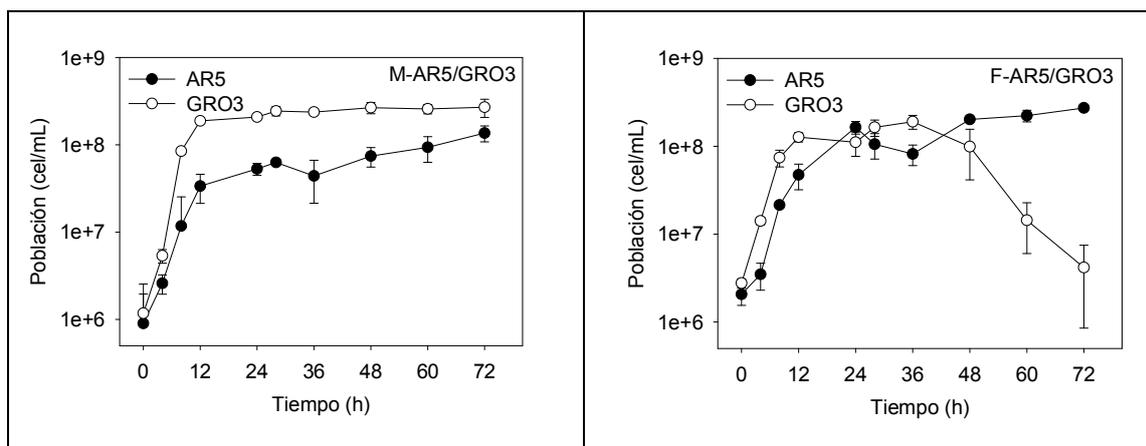
### 7.7.3.5.2. Fermentación AR5/GRO3

En la **figura 7.7.9.** se logra apreciar que tanto la evolución de la población como la concentración azúcar es similar en ambos niveles, esto debido a que a nivel biorreactor se airea durante las primeras 12 horas. Respecto a la relación en la concentración de cada una de las cepas en el cultivo mixto, se aprecia que a nivel matraz se tiene una mayor concentración de la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) siendo la cepa predominante durante la fermentación. Por otro lado a nivel biorreactor, hasta las 40 horas se logra mantener una relación de la concentración de cada cepa en un 50% y después de este tiempo es la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) la que entra en una fase de muerte, quedando al final la cepa AR5 (*S. cerevisiae*) como la cepa predominante.

En las fermentaciones tradicionales se ha reportado que las cepas no-Saccharomyces solo están al inicio de las fermentaciones y después estas mueren por su baja tolerancia al etanol, otros estudios han demostrado que es por falta de nutrientes, pero en un este trabajo se podría plantear la hipótesis de que es la falta de aireación la que provoca que la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) no muestre un óptimo de crecimiento, puesto que a nivel matraz ya se había observado que tiene la capacidad de tolerar y producir altas concentraciones de etanol y no presenta limitaciones nutricionales en el medio de jugo de *Agave*.

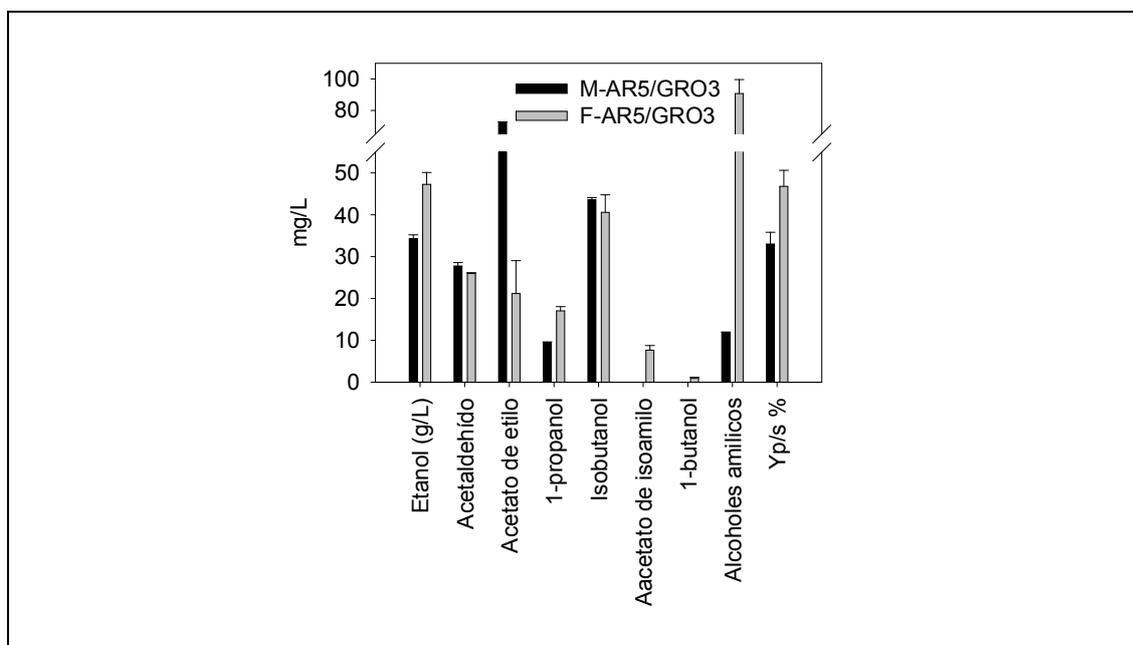
**Figura 7.7.9.** Evolución de la población de levaduras y concentración de azúcar a lo largo de la fermentación en cultivo mixto con las cepas AR5 (*S. cerevisiae*) y GRO3 (*P. kluyveri*) a nivel matraz y nivel biorreactor de 3L.





La concentración de etanol producida es mayor a nivel biorreactor en comparación a la obtenida a nivel matraz, mientras que el acetaldehído presenta concentraciones similares. Respecto a los ésteres producidos, el acetato de etilo a nivel matraz muestra una concentración mayor, puesto que fue la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) quien se mantuvo predominante durante toda la fermentación y por otro lado a nivel biorreactor no se logra alcanzar la misma concentración que la que se obtuvo a nivel matraz, pero si se logra aumentar la concentración en comparación a lo que se obtiene con la cepa AR5 (*S. cerevisiae*) en cultivo puro. El acetato de isoamilo se produjo en una concentración superior a nivel biorreactor, lo cual corresponde a lo observado con la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) en cultivo puro a nivel biorreactor que disminuyó la concentración de acetato de etilo y aumento la de acetato de isoamilo. Los alcoholes superiores como el 1-propanol y los alcoholes amílicos presentan una concentración mayor a nivel biorreactor, lo cual demuestra una predominancia por parte de la cepa AR5 (*S. cerevisiae*) que es la cepa que los producen en mayor concentración en comparación a las concentraciones obtenidas con la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) en cultivo puro; el isobutanol muestra concentraciones similares en ambos niveles. Finalmente el rendimiento de etanol producido con respecto al consumo de azúcar es mayor a nivel biorreactor, debido a que el consumo de azúcar es similar, mientras que la concentración de etanol producida es mayor a nivel biorreactor (**Figura 7.7.10.**).

**Figura 7.7.10.** Concentración de los principales compuestos volátiles y rendimiento de alcohol respecto al sustrato ( $Y_{p/s}$ ) producidos por las cepas AR5 (*S. cerevisiae*) y GRO3 (*P. kluyveri*) en cultivo mixto a nivel matraz y nivel biorreactor de 3L.



#### 7.7.3.6. Análisis estadístico.

El análisis de componentes principales describe el 77.542% en 3 componentes diferentes. Apreciando en la **figura 7.7.11.** la grafica del componente 1 y 2, donde se puede ver del lado derecho las fermentaciones correspondientes a las realizadas en los biorreactores y se relacionan con un rendimiento de etanol alto y concentraciones altas de etanol, así como altas concentraciones de 1-butanol, 1-propanol y alcoholes amilicos, mientras que del lado izquierdo se aprecian las fermentaciones realizadas a nivel matraz, relacionadas con acetaldehído, isobutanol y acetato de etilo. El componente 2 hace una separación de las fermentaciones donde está presente la cepa GRO3 (*P. kluyveri*) observando en la parte superior de la grafica las fermentaciones con GRO3 (*P. kluyveri*) puras y mixtas relacionadas con los ésteres acetato de etilo y acetato de isoamilo, así como con altos rendimiento y concentraciones de etanol, mientras que en la parte inferior de la grafica se aprecian las demás fermentaciones, relacionadas con altas concentraciones de alcoholes superiores.



**Tabla 7.7.1.** Valores de *p-value* obtenidos del análisis de ANOVA y grupos estadísticos que se formaron a partir del mismo análisis estadístico.

	Etanol	Acetaldehído	Acetato de etilo	1-propanol	Isobutanol	Acetato de isoamilo	1-butanol	Alcoholes amilicos	Rendimiento $Y_{p/s}$
M-AR5	a	b	a	c,d	a,b	a	b	b	a
M-DU3	a	a	b	b,c	e	a	a	d	a
M-GRO3	a	a	d	a	f	b	a	a	a
M-AR5/DU3	b,c	a	b	e	d	a	a	c	a
M-AR5/GRO3	a,b	a	c	b	c	a	a	a	a
F-AR5	c,d	a	a	b	b	a	a	c	b
F-DU3	c,d	a	b	g	e	a	b	b	a
F-GRO3	d,e	a	c	d,e	a	d	b	a	b
F-AR5/DU3	e	a	a,b	f	c	a	d	d	b
F-AR5/GRO3	d,e	a	a,b	d,e	c	c	c	b	b
<i>p-value</i>	0.0000	0.0892	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002

c,d,e,f,g son grupos estadísticos.

M (Matraz), F (Biorreactor), AR5 (*S. cerevisiae*), DU3 (*K. marxianus*), GRO3 (*P. kluyveri*).

*p-value*, considerando los valores menores de 0.05 como diferencias estadísticamente significativas con un 95% de confianza.

### 7.7.3.7. MEDICIÓN DE $K_{La}$ .

#### 7.7.3.7.1. INTRODUCCIÓN.

Debido al problema que se tuvo con la cepa GRO3 la cual no presentó un crecimiento igual al que se había obtenido en el matraz y habiendo observado que la aireación durante las primeras 12 horas favoreció a que tanto el crecimiento como las concentraciones de metabolitos fuera similar, se decidió realizar la medición de la constante de disolución de oxígeno en el medio ( $K_{La}$ ), para verificar la cantidad de oxígeno que era capaz de disolverse por efecto de la agitación. A nivel matraz se trabajó con una agitación orbital, mientras que en el reactor se tuvo una agitación axial.

#### 7.7.3.7.2. METODOLOGÍA

Para la medición tanto en el matraz como en el reactor, primeramente se desplazó todo el oxígeno realizando una aireación con nitrógeno, hasta llegar a un valor de oxígeno disuelto de 0. En el matraz se realizó la medición en medio M11, JA y agua con un sistema no invasivo, que permitió la toma de lecturas desde el exterior a través de una sonda con un laser verde de Ramman. Mientras que en el reactor se realizó solo en JA utilizando el electrodo de oxígeno disuelto del biorreactor Applikon.

En el caso del matraz el menor volumen que se maneja fue de 100 mL, debido a que el sensor dentro del matraz, no podía realizar mediciones con menor volumen, y la máxima agitación fue de 175 rpm, debido a que una agitación mayor podía dañar la sonda laser.

Mientras que en el biorreactor se realizaron las mediciones con una agitación de 250 rpm y volúmenes de trabajo de 1.5 y 2 L, cuando se realizó la medición en el biorreactor se realizó una medición sin aireación, que es como se trabaja normalmente, pero también se realizó una medición con aireación en la superficie sin tocar el líquido, esto debido a que el reactor se tapa, limitando el intercambio de gases a diferencia del matraz que tiene un tapón de algodón. Finalmente se realizó en el biorreactor la medición con la aireación a 0.5 vvm.

### 7.7.3.7.3. RESULTADOS.

**Tabla 7.7.2.** Resultados de  $K_{La}$  y condiciones a las que se realizó cada una de las mediciones.

	Aireación	Agitación	Temperatura	Volumen	Medio	$K_{La}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	sd
Matraz		100 rpm	30°C	100 mL	M11	<b>0.0487</b>	$\pm 0.0016$
		100 rpm	30°C	100 mL	Agua	<b>0.0564</b>	$\pm 0.0005$
	N/A	100 rpm	30°C	100 mL	JA	<b>0.0565</b>	$\pm 0.0028$
		100 rpm	30°C	150 mL	M11	<b>0.037</b>	$\pm 0.0001$
		175 rpm	30°C	100 mL	M11	<b>0.0907</b>	$\pm 0.0247$
Fermentador	0.5 vvm	250 rpm	30°C	2L	JA	<b>0.0392</b>	$\pm 0.0003$
	no	250 rpm	30°C	2L	JA	<b>0.0010</b>	$\pm 0.0001$
	superficie	250 rpm	30°C	2L	JA	<b>0.0040</b>	$\pm 0.0008$
	0.5 vvm	250 rpm	30°C	1.5 L	JA	<b>0.0531</b>	$\pm 0.0061$
	superficie	250 rpm	30°C	1.5 L	JA	<b>0.0018</b>	$\pm 0.0001$

N/A (No aplica)

A nivel matraz se observaron valores de  $K_{La}$  similares entre el JA y al agua destilada, mientras que el medio M11 presentó un valor de  $K_{La}$  menor, al aumentar el volumen a 150 mL, el valor de  $K_{La}$  disminuyó y trabajando con el mismo volumen y aumentando la agitación a 175 rpm el valor de  $K_{La}$  aumento casi el doble (**Tabla 7.7.2.**).

En el biorreactor se obtuvo un valor de  $K_{La}$  similar al del matraz con 100 mL y una agitación de 100rpm cuando el biorreactor se trabajo a 250 rpm, 1.5 L y una aireación de 0.5 vvm. En todos los casos estudiados en el biorreactor siempre fue menor el valor de  $K_{La}$ , por lo que se llega a la conclusión de que la transferencia de oxígeno al medio es menor que la que se tiene en el matraz, lo cual limita el crecimiento de la cepa GRO3 (*P. kluyveri*). Para poder llevar a nivel industrial será necesario realizar una aireación durante las primeras horas de la fermentación.

#### 7.7.4. CONCLUSIÓN

El escalamiento de los procesos realizados a nivel laboratorio es complicado, debido a que no siempre se puede llegar a reproducir todas las condiciones de la misma manera.

La cepa GRO3 (*P. kluyveri*) muestra requerimientos de oxígeno superiores que los de AR5 (*S. cerevisiae*), por lo que es necesaria una aireación cuando se desee trabajar con esta cepa.

A pesar de no poder repetir al 100% en el biorreactor las condiciones que se obtuvieron en matraz, se sigue logrando producir una concentración mayor de ésteres en comparación a la que se obtiene con la cepa AR5 (*S. cerevisiae*) en cultivo puro.

## **7.8. CAPITULO 8. Prueba a nivel piloto con cultivo mixto de levaduras *Saccharomyces* / no-*Saccharomyces* para la producción de tequila.**

### **7.8.1. INTRODUCCIÓN**

Una vez que el microorganismo ha sido seleccionado para ser utilizado en el proceso de fermentación, comienza el estudio de las capacidades fermentativas en el laboratorio en volúmenes de trabajo que van desde 1 a 10 L. Estos estudios contemplan la formulación del medio de cultivo así como la estrategia de alimentación pudiendo ser en lote, en lote alimentado o en continuo. Así mismo debe de seleccionarse el tipo de fermentador a utilizar, teniendo dentro de las opciones, el tanque aireado, tanque agitado, empacado con perlas, fermentación en estado sólido, entre otros. También deben de considerarse otros factores tales como, la configuración del reactor, control de pH, oxígeno disuelto, antiespumante y temperatura.

La optimización de los procesos en el laboratorio conllevan después a un escalamiento, comenzando de esta manera con volúmenes de entre 1 a 10 litros, para pasar después a una escala piloto que comprende volúmenes de entre 10 a 100 L y finalmente la escala industrial que va desde los 1000 hasta los 100 000 L, depende del proceso fermentativo que se realice. Sin embargo durante el escalamiento es muy común que los rendimientos obtenidos a grandes escalas sean diferentes a los obtenidos en el laboratorio, esto debido a que las condiciones de operación no se llegan a reproducir al 100%. Algunos de los factores que impactan sobre el rendimiento a gran escala son:

- La propagación del inóculo, así como la cantidad y calidad del mismo para iniciar la fermentación.
- La selección del medio de cultivo, comúnmente a gran escala se utilizan reactivos o nutrientes de menor costo y por lo tanto calidad, en comparación a los utilizados en el laboratorio.
- Los procesos y protocolos de esterilización utilizados a gran escala pueden causar degradación de compuestos termolábiles, lo cual resulta en un producto diferente.
- La homogeneidad a gran escala es difícil de lograr, cosa que a nivel laboratorio en pequeños volúmenes es fácil de realizar, por lo tanto, a gran escala se llegan a tener zonas de gradientes de nutrientes, pH, temperatura y oxígeno disuelto.
- El escalamiento puede incluso llegar a alterar la formación de espuma provocado por los métodos de agitación o debido a la liberación del CO<sub>2</sub> producido durante el proceso.

Cualquier variación en alguno de estos factores, es lo que llega a afectar el rendimiento final de la fermentación entre las diferentes escalas. Por otro lado, no es posible lograr mantener un proceso con las mismas condiciones en todo momento. Sin embargo, es posible fijar puntos clave o críticos de control dentro del proceso, los cuales deben de ser supervisados con más cuidado. Estos parámetros son, la relación del diámetro, la aireación medida en vvm, la transferencia de oxígeno al medio (K<sub>la</sub>), el nivel de oxígeno disuelto, o velocidad de agitación para mantener el mismo movimiento.

Cuando se va a llevar un proceso industrial al laboratorio, también es importante considerar estos mismos factores, tratando de imitar lo más posible en el laboratorio las condiciones de la escala industrial.

### 7.8.2. METODOLOGÍA

Se realizó una fermentación a nivel piloto con un volumen de 240L de jugo de *Agave* enriquecido con 0.5 g/L de sulfato de amonio y se inoculó con  $1 \times 10^6$  cel/mL de cada una de las cepas AR5 (*S. cerevisiae*) y GRO3 (*P. kluyveri*) crecidos en YPD.

La fermentación se realizó sin control de temperatura ni agitación, para simular las condiciones como se realizan normalmente en la industria.

La fermentación se comenzó a 18°Brix y se tomaron muestras a las 69 y 92 horas de la fermentación y se realizó un conteo en caja con medio YPD, para cuantificar la presencia de cada una de las cepas.

### 7.8.3. RESULTADOS

Se comenzó con una concentración de azúcar de 18°Brix terminando en 7°Brix, respecto a la población de levaduras, se inoculo con  $3.3 \times 10^6$  cel/mL con una realcion del 50% de cada una de las cepas. Pero al realizar el conteo a las 69 horas de fermentación todas las levaduras presentes correspondían a AR5 (*S. cerevisiae*) y por consiguiente a las 92 horas también (**Tabla 7.8.1.**).

**Tabla 7.8.1.** Fermentación del cultivo mixto AR5/GRO3.

<b>Tiempo</b>	<b>Azúcar</b>	<b>Conteo al microscopio</b>	<b>Relación AR5:GRO3</b>
Inicio	18 °Brix	3.3 X10 <sup>6</sup> cel/mL	50:50
69 horas	7 °Brix	75.5X10 <sup>6</sup> cel/mL	100:0
92 horas	7 °Brix	102.5X10 <sup>6</sup> cel/mL	100:0

Se realizó la destilación del mostos para obtener producto final al cual se le realizó la medición de compuestos volátiles por cromatografía de gases acoplado a un Head-space, obteniendo las siguientes concentraciones.

**Tabla 7.8.2.** Concentración de los compuestos volátiles mayoritarios de la fermentación mixta AR5/GRO3. Concentración en mg/L, excepto el alcohol que es en g/L.

	Etanol (g/L)	Acetaldehído	Metanol	1-Propanol	Isobutanol	1-Butanol
T0	2.60 ±0.23	15.54 ±0.60	182.10 ±11.99	1.18 ±0.16	1.45 ±0.16	0.51 ±0.01
T69	63.85 ±1.07	16.37 ±0.08	147.30 ±4.33	13.09 ±0.03	32.57 ±0.26	1.44 ±0.00
T92	66.38 ±1.44	15.45 ±0.34	149.89 ±2.38	13.28 ±0.47	33.53 ±0.99	1.61 ±0.08
ORDINARIO	228.05 ±2.28	43.44 ±0.35	579.27 ±4.45	38.13 ±0.41	50.78 ±2.03	3.44 ±0.10
RECTIFICADO	239.22 ±12.18	31.67 ±5.22	604.87 ±25.85	37.49 ±1.95	55.85 ±20.18	3.17 ±0.15
	Acetato de etilo	Acetato de isoamilo	Etil caprilato	2-fenil-etanol	Alcoholes amílicos	
T0	3.76 ±0.12	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	2.52 ±2.08	3.71 ±0.41	
T69	8.75 ±0.10	0.14 ±0.20	0.85 ±0.00	53.25 ±9.27	244.40 ±2.47	
T92	7.94 ±0.13	0.00 ±0.00	0.86 ±0.00	67.63 ±1.87	253.46 ±10.54	
ORDINARIO	35.15 ±0.65	2.59 ±0.08	1.01 ±0.01	36.61 ±0.18	563.50 ±8.63	
RECTIFICADO	21.93 ±1.32	0.48 ±0.22	0.97 ±0.01	18.78 ±6.39	472.04 ±26.52	

La concentración de etanol en el mosto llegó hasta 66 g/L al final de la fermentación, mientras que la concentración de esteres como acetato de etilo presentó una concentración al final de la fermentación de 7.94 mg/L, y los alcoholes amílicos presentaron una concentración de 253 mg/L (**Tabla 7.8.2.**). Esto demuestra que la cepa GRO3 no logro crecer durante la fermentación y por tanto se obtiene una baja concentración de esteres y alta concentración de alcoholes superiores, resultado característico de fermentaciones con cultivos puros de AR5 (*S. cerevisiae*).

Para la comparación con los parámetros de acuerdo a la norma, se realizó la conversión de las concentraciones del rectificado que se muestran en la **tabla 7.8.3.** Observando que todos los compuestos están dentro de norma, pero se tiene una concentración de esteres baja, por lo que se debe de realizar una modificación al proceso tradicional de elaboración de tequila en caso de que se quiera realizar la fermentación con la cepa GRO3. Pudiendo ser necesaria una aireación inicial como se requirió a nivel biorreactor.

**Tabla 7.8.3.** Resultados de las concentraciones expresados de acuerdo a la NOM-006-SCFI-2012.

	mg Aldehído/ 100 mL de alcohol anhidro	mg metanol/ 100 mL de alcohol anhidro	mg alcoholes sup/ 100 mL de alcohol anhidro	mg esteres/100 mL alcohol anhidro	% alc vol.	furfural
ORDINARIO	15.43	205.75	246.00	13.77	28.87	nd
RECTIFICADO	12.40	236.73	229.88	9.15	35.00	nd
Norma	0-40	30-300	20-500	2-200	35-55	0-4

#### 7.8.4. CONCLUSIÓN

El escalamiento de los procesos que se desarrollan en el laboratorio requiere de una serie de etapas, para lograr llegar a reproducir los mismos resultados. Si bien en el laboratorio, las cepas de levaduras no-*Saccharomyces* presentaron tener rendimientos similares a los de *Saccharomyces*, para su uso a nivel industrial será necesario realizar algunas modificaciones al proceso de elaboración de tequila que se tiene actualmente, pudiendo ser necesaria la implementación de un sistema de aireación en los reactores, lo cual no solo favorecería el crecimiento de las no-*Saccharomyces* sino también de la misma *Saccharomyces* lo cual llegaría a reducir los tiempos de fermentación.

Las levaduras no-*Saccharomyces* son capaces de producir vino con un aroma más complejo, el cual puede incrementar la calidad del vino y tener un significado favorable en las características sensoriales (Ciani y Maccarelli 1998; Egli y col., 1998; Jolly y col., 2003; Romano y col., 1997), pero no son capaces de completar la fermentación debido a su baja tolerancia al etanol.

Se había atribuido que las no-*Saccharomyces* no eran capaces de fermentar solas en cultivo puro por su baja tolerancia al etanol, pero en este trabajo se ha demostrado que tanto *K. marxianus* como *P. kluyveri* son capaces de realizar a nivel laboratorio fermentaciones completas al igual que *S. cerevisiae* en jugo de *Agave*. Como ya se dijo en el capítulo anterior el escalamiento es un proceso complejo que requiere de mucha atención en varios detalles, en este capítulo se pretendió realizar una fermentación con un co-cultivo, pero bajo las condiciones que se siguen a nivel industrial, observando que *P. kluyveri* no sobrevivió, esto debido a su demanda de oxígeno para poder estar presente en la fermentación, puesto que a nivel matraz y biorreactor, se realizó siempre una agitación, lo cual favorecía a tener una pequeña cantidad de oxígeno disuelto en el medio. A nivel piloto, el gran volumen de medio y mantener el mosto estático, provocó que *P. kluyveri* no estuviera presente al final de la fermentación. Obteniendo un producto muy similar al obtenido con cultivo puro de *S. cerevisiae*, sin la aportación de *P. kluyveri*.

## **7.9. CAPITULO 9. Caracterización de cultivos mixtos *Saccharomyces* /no-*Saccharomyces* y comparación contra *Saccharomyces* en cultivo puro. (Artículo 2)**

En el siguiente capítulo se presentan los resultados de las fermentaciones realizadas con cultivos mixtos de *Saccharomyces* con no-*Saccharomyces*, además de realizar una comparación con los cultivos puros de *Saccharomyces* que es una cepa control, con el fin de determinar si el co-cultivo con las cepas no-*Saccharomyces*, favorece o no la producción de compuestos volátiles durante la etapa de fermentación del proceso de fabricación del tequila.

La inmovilización de células de levaduras en sustratos inertes ha permitido en diversos estudios favorecer la presencia y crecimiento de las levaduras no-*Saccharomyces* en co-cultivo con *Saccharomyces*, por lo que en este capítulo se realizó la inmovilización de levaduras no-*Saccharomyces* y se evaluó el efecto que provoca la inmovilización sobre el metabolismo de la levadura, debido a que la inmovilización genera un estado de estrés en la levadura puesto que no está libre en el medio, además de presentar una limitación al acceso a los nutrientes. Con la inmovilización, las levaduras que están al interior del material de inmovilización están limitadas a la difusión de nutrientes al interior del material por lo que en ocasiones se ha llegado a ver una afectación a las capacidades fermentativas, mientras que por otro lado, la inmovilización también ha llegado a servir como un protector de las cepas no-*Saccharomyces*, presentando un crecimiento favorable en co-cultivo con *Saccharomyces*.

Los resultados obtenidos demuestran un gran potencial de las levaduras no-*Saccharomyces* para su utilización en fermentaciones en cultivo puro para la fermentación de tequila. Por lo que actualmente se tiene en edición para ser enviado como artículo para su publicación, por lo que el presente capítulo será presentado en inglés, en formato de artículo de manera independiente.

*Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeast co-culture for improving volatile compounds generation during *Agave* juice fermentation for tequila production.

Segura-García Luis E.<sup>1,2</sup>, Taillandier Patricia<sup>2</sup>, Brandam Cedric<sup>2</sup>, Gschaedler Anne<sup>1</sup>.

1. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. A.C., Av. Normalistas 800, Colinas de la Normal, Guadalajara Jalisco C.P. 44270 Mexico. 2. -ENSIACET, Laboratoire de Génie Chimique, 4, allée Emille Monson, 31432 Toulouse Cedex 4. France.

Phone and fax: +52 (33) 33455200.

e-mail: agschaedler@ciatej.net.mx

### **Summary**

The non-*Saccharomyces* yeasts are the principal responsible producers of aromatic compounds in beverages. The cells immobilization is a technique that maintains the non-*Saccharomyces* in co-culture with *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. In this study were performed co-cultures of *Kluyveromyces marxianus* and *Pichia kluyveri* with *S. cerevisiae* in *Agave* juice (JA) and semi-synthetic medium (M11). The non-*Saccharomyces* yeasts were able to maintain similar concentrations of cells during the fermentation like *S. cerevisiae* in co-culture with both yeasts free in the medium. When one of *Saccharomyces* or non-*Saccharomyces* yeast strain was immobilized, free cells showed the best growth in comparison with those immobilized in *Agave* juice. Nevertheless, the immobilization was not shown good results and is better to do the fermentation with free cells. The co-culture increased the volatile compounds concentration like esters with both non-*Saccharomyces* yeast strain. The concentration of higher-alcohols was elevated with *K. marxianus* and lower with *P. kluyveri*.

Key words: co-culture, yeast immobilization, *Agave* juice fermentation, non-*Saccharomyces*.

## Introduction

The *Saccharomyces* yeast strains have been known by their higher ethanol yields and low volatile compounds production during alcoholic fermentation, on the other hand the non-*Saccharomyces* yeasts are the principal responsible to produce aromatic compounds. Therefore, yeast co-culture in fermentation let to obtain not only alcohol but also volatile compounds. However, non-*Saccharomyces* yeasts are not able to survive in co-culture with *Saccharomyces* (Fleet *et al* 1984), in order to maintain the non-*Saccharomyces* during the fermentation several studies were performed.

The non-*Saccharomyces* early death was attributed by the low ethanol tolerance (Kunkee 1984) and could not be explained by nutrient depletion or the presence of toxic compounds (Nissen and Arneborg 2003). Currently the early death of *H. uvarum* was attributed at nutritional deficiencies in the fermentation medium (Diaz-Montaño *et al* 2010). One strategy studied in order to maintain the non-*Saccharomyces* during the fermentation was the immobilization cells on inert supports like alginate beads (Ciani and Ferraro 1998).

Diverse studies of microorganisms associated with different alcoholic fermentations allow known the great diversity of yeasts and bacteria which are presents during the spontaneous and natural fermentations. Those studies are the starting point of the non-*Saccharomyces* assays (Jolly *et al* 2006) and the co-cultures are the most viable tool to use. In wine was studied *Hanseniaspora uvarum*, *H. vineae*, *H. guillermondii*, *H. osmophila*, *Candida zemplinina*, *Metchnikowia pulcherrima*, *Torulaspora delbrueckii*, *Lachanceae thermotolerans* (*Kluyveromyces*), *Pichia anomala*, *Saccharomycoides ludwigii*, and *Zygosaccharomyces florentinus*, which are the most common non-*Saccharomyces* yeasts in wine (Jolly *et al* 2003; Albergaria *et al* 2010; Andorra *et al* 2010a, 2010b; Comitini *et al* 2011; Domizio *et al* 2011; Viana *et al* 2011; Andorra *et al* 2012; Medina *et al* 2012; Sadoudi *et al* 2012; Suzzi *et al* 2012). In other beverages like cachaça have been studied *Pichia anomala* and *P. caribba* (Ferreira-Duarte *et al* 2012) and also the bacteria interaction with yeasts like *Lactobacillus fermentum* (Ferreira Duarte *et al* 2011). In addition was studied the Longan juice fermentation with *Willopsis saturnus* co-culture

(Trinh *et al* 2011). In contrast, a wine fermentation with non-*Saccharomyces* in pure culture was also carried out with *Pichia kudriavzevi* (Sharma *et al* 2011). Currently studies have been demonstrated that some species of non-*Saccharomyces* yeasts are able to produce not only alcohol at the same level than *Saccharomyces* but also volatile compounds in higher concentrations (Sharma *et al* 2011; Lopez-Alvarez *et al* 2012; Amaya –Delgado *et al* 2013).

It have been reported that in some fermentations of *Agave* beverages have been noticed the presence of *Kluyveromyces marxianus* (Lappe-Oliveras *et al* 2008), some studies at industrial level with *K. marxianus* in pure culture in order to produce tequila has been performed and was obtained a similar ethanol yield like *S. cerevisiae*, but with an incrementing of desirables volatile compounds (Amaya-Delgado *et al* 2013; Lopez-Alvarez *et al* 2012). Also the use of *Pichia kluyveri* in pure culture has been shown as good fermented and volatile producer yeast in tequila fermentation (Amaya-Delgado *et al* 2013).

Moreover the mixed cultures have been used also in bio-ethanol production as a bio-fuel (Azmi *et al* 2010; Hickert *et al* 2013), since not all the non-*Saccharomyces* yeasts are good aromatic compounds producers. Other strategy in order to improve the aromatic profile was the study of *S. cerevisiae* strains co-cultures in wine, but no differences were founded (Barrajón *et al* 2011).

In this work was studied the fermentative capacity of non-*Saccharomyces* yeasts in co-culture with *S. cerevisiae* in *Agave* juice and M11 semi-synthetic medium in fermentation conditions. Also was studied the usage of immobilization yeasts in co-culture.

## Materials and methods

### Yeast strains

*Saccharomyces cerevisiae* (AR5), *Kluyveromyces marxianus* (DU3) and *Pichia kluyveri* (GRO3) yeast strains, were isolated from the fermentation process of tequila (AR5) and mezcal (DU3 and GRO3) and have been conserved in the microorganism collection of CIATEJ AC, were used in this study. They were chosen according to their fermentation capabilities and volatile compounds generation profile.

### Inoculation conditions

Cells were grown from 18 to 20 h at 30°C with shaking (250 rpm) in 125 ml Erlenmeyer flask with 50 ml of YPD medium.

### Immobilization yeasts

Yeast cells ( $2 \times 10^9$  cell/ml) were immobilized using beads of alginic acid sodium salt from brown algae (Sigma-Aldrich ®) 4% solution, and was obtain as a final concentration approximately  $1 \times 10^9$  cell/ml beads in 2% of alginic sodium yeast cells suspension, thus was dripped using a vacuum pomp and 29G needle, in 170 g/l CaCl<sub>2</sub> solution mixed with a magnetic stirring bar; the beads were mixed (30min) in the CaCl<sub>2</sub> solution, next the beads were washed with distilled sterile water to remove the calcium excess, finally the beads were stored in glucose solution (4% w/v) at 4°C.

### Fermentation media

Semi-synthetic medium M11 (reference 1st paper) and *Agave tequilana* Weber blue variety juice JA (100 g/l sugar concentration) supplemented with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.5 g/l) were used as a fermentation media.

### Fermentation conditions

Batch fermentation were performed with both fermentation media in 250 ml Erlenmeyer flask with 100 ml medium and incubated at 30°C with shaking (100 rpm). Samples were taken through the fermentation (72 h).

#### Analytical methods

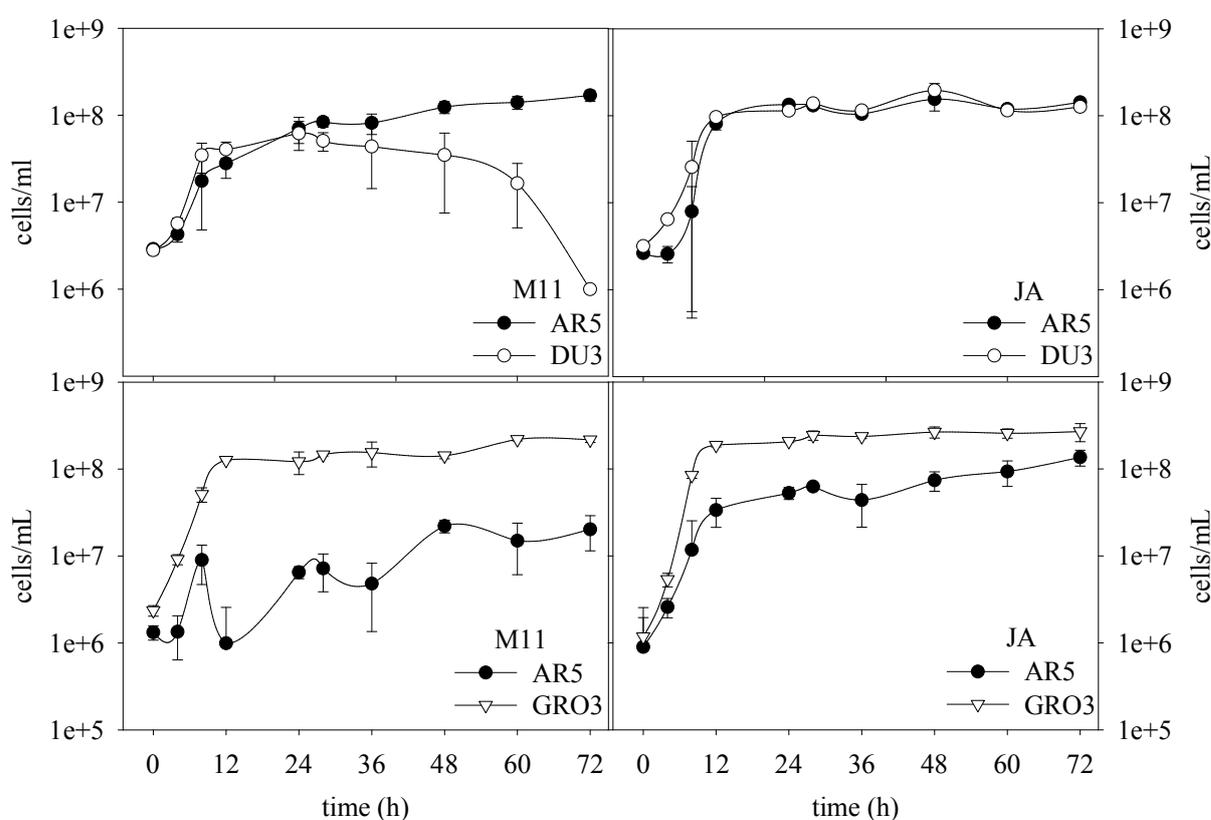
Yeast population was measured using Neubauer chamber (reference) and counting on WL medium plate, reducing sugar concentration was determined by the DNS reagent ([Miller 1959](#)), and ethanol and volatile compounds of the finals samples were measured by dynamic head space (Hewlett Packard HP 7694 E) coupled with gas chromatography (Hewlett Packard HP 6890) ([Arellano et al 2011](#)).

#### Statistical analysis

Fermentative performances of the medium and immobilized yeasts were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA), concentration of volatile compounds, ethanol yield and yeast population were analysed by Factor analysis. Statistical analyses were performed with Statgraphics Centurion XVI.

## Results and discussion

The co-culture fermentations with free cells were showed different kinetics growth (Figure 1), In M11 medium, AR5 grew more than DU3, however in JA both strains were grown at the same level. In contrast GRO3 grew better than AR5 in both mediums, the difference of yeast population in M11 medium is more than 1 logarithm of concentration, and in JA the strains reach almost the same concentration at the end of the fermentation.

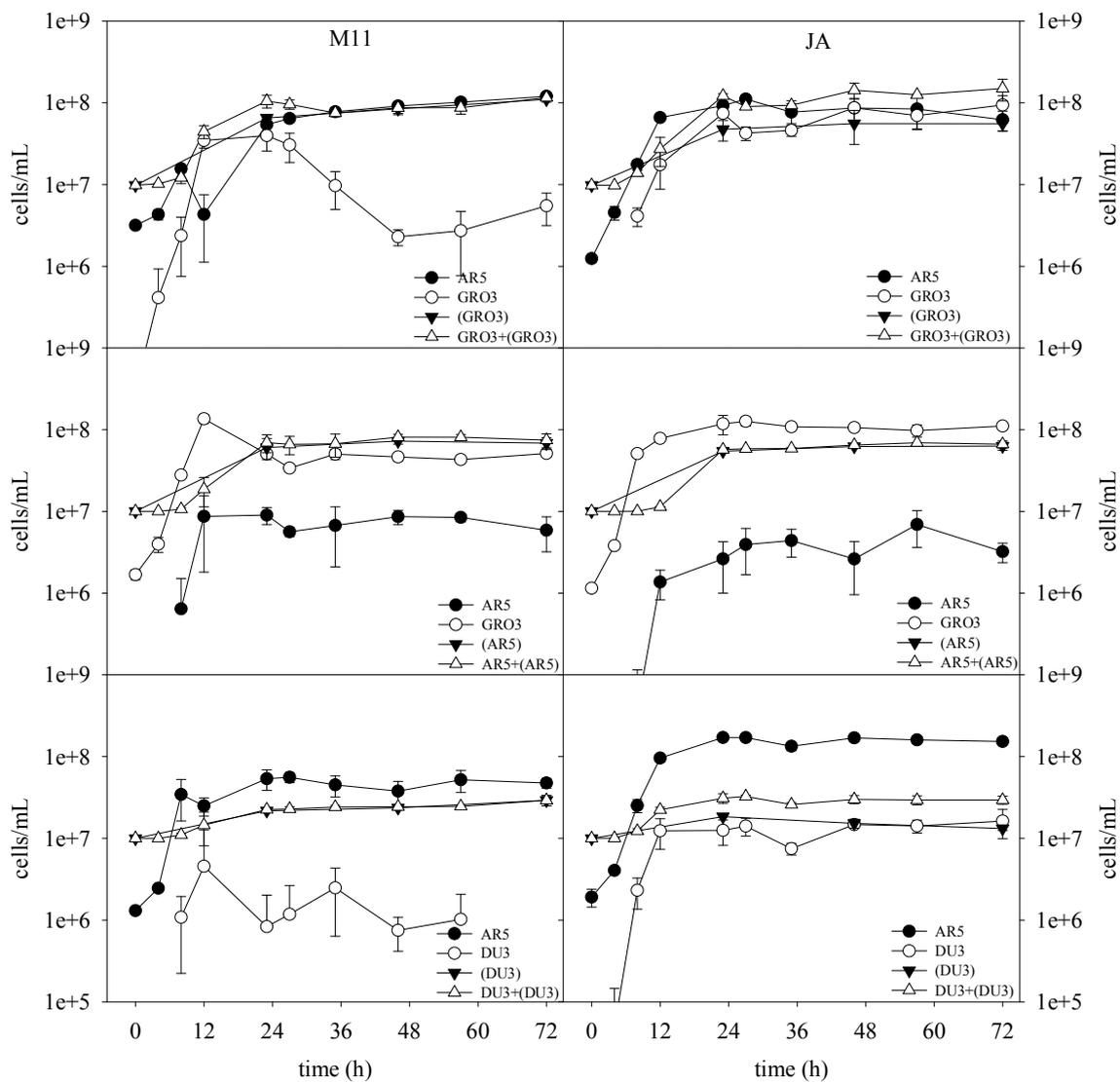


**Figure 1.** Effect of the co-culture in the cellular population with free cells in M11 medium and *Agave* juice (JA).

These results show the capability of non-*Saccharomyces* yeast strains to grow at the same level than *S. cerevisiae* in JA, without any nutrient supplementation like was suggested by [Diaz-Montañó et al 2010](#).

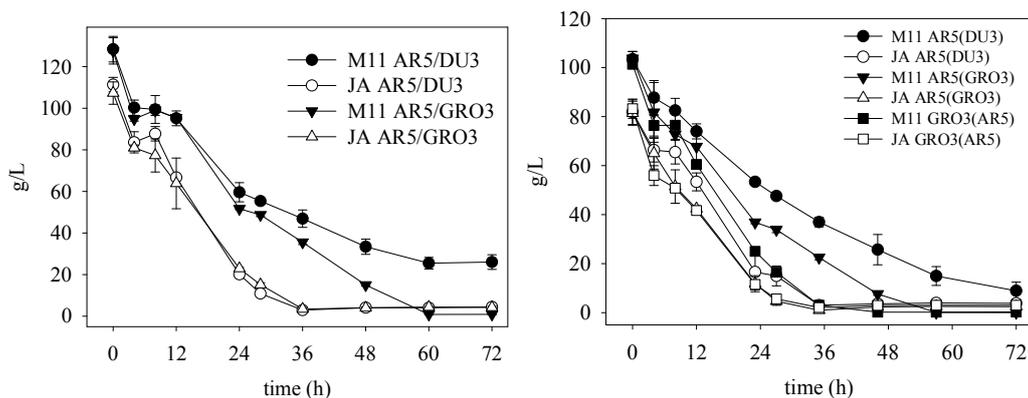
Besides was reported, *S. cerevisiae* CCMI885 produced a peptide that inhibit the growth of *K. marxianus* (Albergaria *et al* 2010), it was observed this inhibition in the AR5/DU3 co-culture with M11 medium, however this inhibition could not notice with JA medium. Also was reported the production of killer toxins by *P. kluyveri* against *S. cerevisiae* (Middelbeek *et al* 1980), this effect was shown in M11 medium where GRO3 grew more than AR5, in contrast the population yeasts in JA fermentation was similar between AR5 and GRO3.

Kinetics growth of cells immobilized in co-culture is shown in figure 2. In M11 medium the immobilized strain have the lowest concentration in the liquid medium, no matter if there is *Saccharomyces* or non-*Saccharomyces* strain. However JA was shown a different kinetic growth with each co-culture. In the co-culture with GRO3 immobilized and AR5 free, both yeasts strains grew at the same level in the liquid medium and the immobilized strain inside of the beads rich at the same cells concentration. The strain GRO3 grew both inside and outside of the beads. In the co-culture with AR5 immobilized and GRO3 free, was GRO3 that grew more than AR5. The strain AR5 just grew inside of the beads. On the case where DU3 was immobilized and AR5 free, was the strain AR5 which grows better and DU3, and only maintain the same concentration inside of the beads. The immobilization was used to maintain the same concentration cells during the fermentation; only in M11 medium was shown this effect.



**Figure 2.** Kinetics growth of co-cultures with immobilized yeasts.

Sugar consumption was almost complete in all the fermentations, just the co-culture with free cells AR5/DU3 in M11 medium did not consume all the sugar, and the same co-culture with DU3 immobilized had the lowest sugar consumption rate. In figure 3 is shows the sugar consumption kinetics where the consumption rate in JA.



**Figure 3.** Sugar consumption of co-cultures in medium M11 and *Agave* juice (JA).

The volatile compounds concentration in co-culture with one yeast strain immobilized is shown in table 3. The highest ester concentration was achieved in JA with the AR5/GRO3 co-culture 159.43 mg/L where AR5 was immobilized and GRO3 was free, however 113 mg/L was produced with AR5 free and GRO3 immobilized, and the isoamyl acetate were detected only when GRO3 was free. The ethyl acetate concentration was higher in co-culture immobilized in comparison with AR5 pure immobilized fermentations where the concentrations were 14.15 mg/L in M11 medium and 0.88 mg/L in JA.

Ethyl acetate is the principal ester produced during the JA fermentation and is used as ester concentration reference in tequila production (NOM-006-SCFI-2012). The highest concentration of this ester was show with the AR5/GRO3 co-culture 127.38 mg/L in M11 medium, and 72.03 mg/L in JA, in addition, only this co-culture produced isoamyl acetate 1.09 mg/L in M11 medium. The ethyl acetate concentration achieved was higher in all the co-culture in comparison with AR5 pure free cells fermentations where the concentrations were 13.65 and 2.08 mg/L in M11 medium and JA respectively. In wine fermentation, *P. kluyveri* produced more ethyl acetate than *S. cerevisiae* but less ethanol concentration, however, shows high residual sugar concentration (Domizio *et al* 2011).

Higher-alcohols concentration was elevated with the AR5/DU3 co-culture and lower with AR5/GRO3 (Table 2) in comparison with AR5 free pure culture (Table 1).

**Table 1.** Ethanol and volatile compounds final concentrations of AR5 pure cultures free and immobilized.

	M11 AR5		JA AR5		M11 (AR5)		JA (AR5)	
Acetaldehyde	161.57	± 122.20	85.91	± 56.19	162.04	± 26.03	180.07	± 38.21
Ethyl acetate	13.65	± 2.61	2.08	± 0.87	14.15	± 0.92	0.88	± 1.09
Isoamyl acetate	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00
Methanol	5.83	± 0.50	42.74	± 0.85	5.46	± 1.28	9.28	± 2.28
Ethanol	41.34	± 2.47	29.67	± 3.38	54.34	± 0.19	32.80	± 6.38
1-Propanol	20.22	± 4.98	13.97	± 2.55	14.58	± 0.54	14.94	± 3.78
Isobutanol	20.46	± 0.32	19.23	± 4.05	13.37	± 0.44	14.36	± 5.08
1-Butanol	0.21	± 0.23	0.49	± 0.04	0.33	± 0.07	0.54	± 0.06
Amylic alcohols	30.97	± 5.06	72.84	± 16.06	40.50	± 1.91	64.42	± 20.06

**Table 2.** Ethanol and volatile compounds final concentrations of co-cultures with free cells.

	M11 AR5-DU3		JA AR5-DU3		M11 AR5-GRO3		JA AR5-GRO3	
Acetaldehyde	63.63	± 22.37	16.51	± 6.67	115.14	± 40.27	27.76	± 0.81
Ethyl acetate	24.80	± 1.44	27.61	± 3.57	127.38	± 74.23	72.03	± 0.68
Isoamyl acetate	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	1.09	± 0.45	0.00	± 0.00
Methanol	5.22	± 0.36	10.17	± 0.66	6.82	± 0.72	9.44	± 0.11
Ethanol	33.78	± 2.38	37.61	± 3.17	44.52	± 0.40	34.30	± 0.91
1-Propanol	22.00	± 2.83	18.15	± 1.94	19.45	± 1.38	9.49	± 0.14
Isobutanol	29.59	± 2.43	57.95	± 7.00	64.35	± 4.89	43.61	± 0.49
1-Butanol	0.00	± 0.00	0.04	± 0.02	0.01	± 0.01	0.00	± 0.00
Amylic alcohols	40.69	± 2.31	144.97	± 21.70	11.50	± 0.34	11.86	± 0.14

**Table 3.** Ethanol and volatile compounds final concentrations of co-cultures with cells immobilized.

	M11 AR5(DU3)		JA AR5(DU3)		M11 AR5(GRO3)		JA AR5(GRO3)		M11 GRO3(AR5)		JA GRO3(AR5)	
Acetaldehyde	159.11	± 9.45	24.23	± 2.86	164.01	± 34.96	13.24	± 0.83	54.36	± 1.89	5.57	± 0.28
Ethyl acetate	29.52	± 5.92	25.73	± 11.03	58.28	± 6.30	113.35	± 25.95	91.20	± 14.53	159.43	± 31.48
Isoamyl acetate	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	0.91	± 0.34
Methanol	6.67	± 1.42	45.44	± 1.33	6.87	± 0.81	44.11	± 3.57	7.59	± 0.60	35.70	± 3.44
Ethanol	36.32	± 2.10	28.31	± 2.54	34.38	± 1.18	26.95	± 3.24	37.15	± 0.90	23.08	± 0.24
1-Propanol	24.61	± 0.38	14.22	± 1.02	15.87	± 0.83	9.27	± 1.21	12.38	± 0.27	6.55	± 0.34
Isobutanol	29.59	± 0.59	26.11	± 2.38	30.32	± 2.41	31.58	± 0.36	24.86	± 1.68	37.38	± 1.48
1-Butanol	0.45	± 0.09	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00
Amylic alcohols	40.17	± 0.10	67.98	± 0.54	7.28	± 0.65	9.84	± 0.84	6.95	± 0.09	8.15	± 0.27

The higher-alcohols show an elevated concentration with the AR5/DU3 in free co-culture fermentations, thus concentration of the higher-alcohol change each fermentations, like in the AR5/DU3 co-culture were the amylic alcohols and in the AR5/GRO3 co-culture were the isobutanol. This phenomenon was observed in free and immobilized cells, and could be attributed to the non-*Saccharomyces* yeast strains capacity and not to the medium composition. The higher-alcohols difference between AR5 pure culture and co-cultures was the 1-butanol concentration that was produced in higher concentration with AR5 pure culture free and immobilized in both mediums. The non-*Saccharomyces* yeast strains used in the fermentation can lead the final volatile compounds concentrations, in comparison with *S. cerevisiae* pure culture in wine the use of *C. zemplinina* in co-culture with *S. cerevisiae* produce the same ethyl esters and lower acetate esters concentration, also *M. pulcherrima* in co-culture with *S. cerevisiae* produce higher ethyl and acetate esters concentration, and the use of *T. delbrueckii* in co-culture with *S. cerevisiae* produce lower ethyl and acetate esters concentration, where the inoculums were non-*Saccharomyces/Saccharomyces* 10:1 ratio (Sadoudi *et al* 2012). Therefore, the yeast strain selection is an important step to obtain better results, in Macabeo must *C. zemplinina* and *H. uvarum* in co-culture with *S. cerevisiae* produced higher ethyl and acetate esters concentrations than pure culture of *S. cerevisiae* was, it was used an inoculums of non-*Saccharomyces/Saccharomyces* 90:10 ratio (Andorrà *et al* 2010). However when is used a synthetic grape must there was no differences between *S. cerevisiae* and the co-cultures with *C. zemplinina* and *H. uvarum* (Andorrà *et al* 2012).

The main significant differences achieved with the immobilization were the ethanol and isobutanol concentrations, nevertheless any difference in ethanol yield was observed. In the fermentation media the main differences were the ethanol, acetaldehyde and 1-propanol concentrations (Table 4).

**Table 4.** One way ANOVA p-values.

p-values	Ethanol yield	Ethanol	Acetaldehyde	Ethyl acetate	Isoamyl acetate	1-Propanol	Isobutanol	Amylic alcohols
Immobilization	0.8901	<b>0.0156</b>	0.6166	0.4917	0.6334	0.2011	<b>0.0005</b>	0.1447

Fermentation media	0.1640	<b>0.0053</b>	<b>0.0000</b>	0.5729	0.8850	<b>0.0021</b>	0.5662	0.1609
--------------------	--------	---------------	---------------	--------	--------	---------------	--------	--------

---

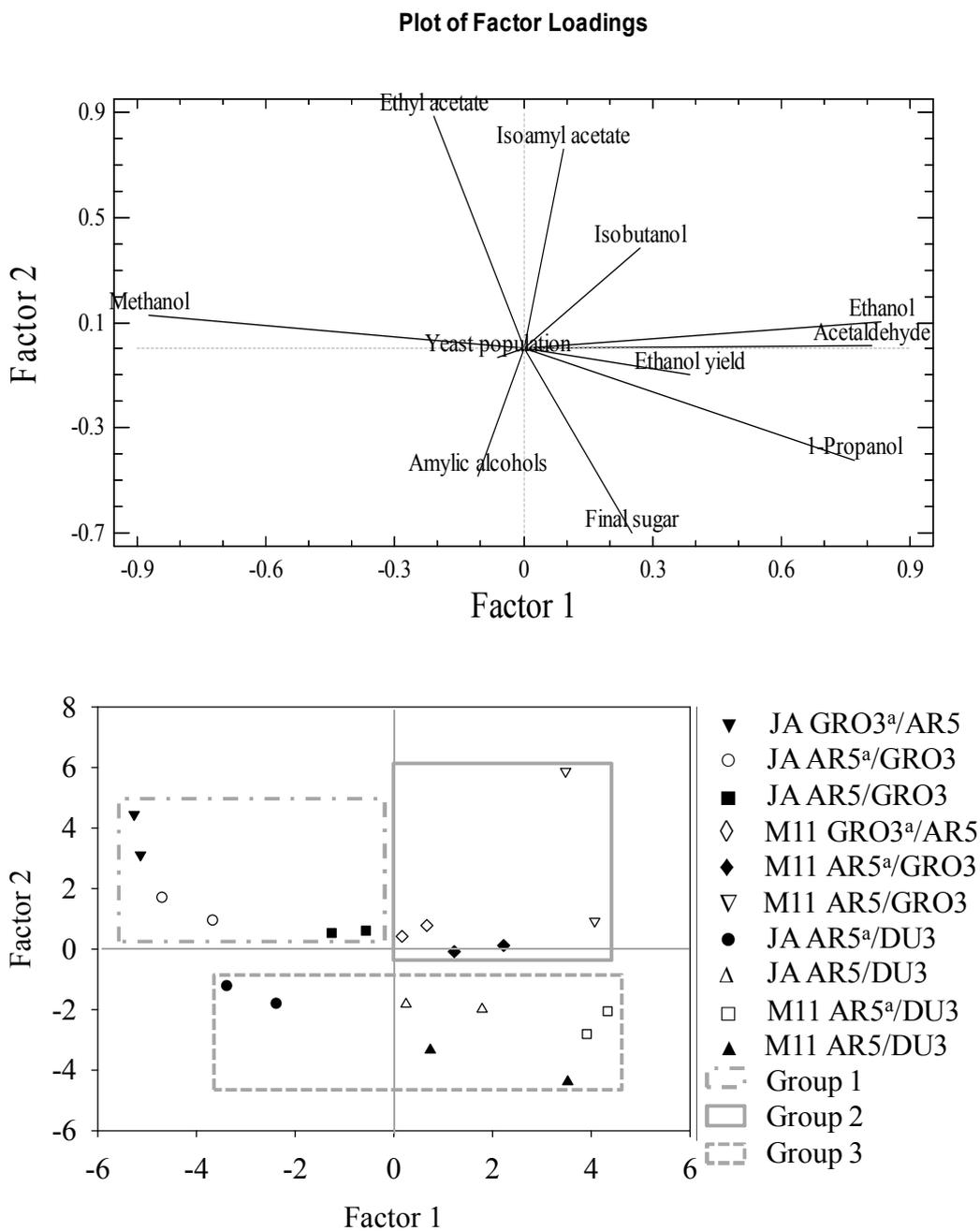
Statistically significant difference between the mean when *p-value* < 0.05.

Not only as some other studies, the *Saccharomyces/ non-Saccharomyces* co-cultures shown a higher volatile compounds concentration (Comitini *et al* 2011), but also it was observed a faster kinetics fermentation (Suzzi *et al* 2012). In addition the inoculums ratio represent an important role in the fermentation, since improve the volatile compounds concentration (Comitini *et al* 2011; Trinh *et al* 2011; Domizio *et al* 2011) however in this study were used the same free cells inoculums concentration (ratio 1:1) in the co-cultures fermentations and it was possible to increases the volatile compounds concentrations. In summary, some considerations are important in order to carry out fermentation co-cultures, like the non-*Saccharomyces* yeast strain species, the ratio *Saccharomyces/non-Saccharomyces* and the nutrients in the fermentation medium.

In order to find a correlation between the different analyzed variables a factor analysis was carried out. The factor analysis explains the 81.815 % of variance in 4 different factors (Table 5). The acetaldehyde, 1-propanol, ethanol and methanol were explained by the factor 1, the ethyl acetate and isoamyl acetate by the factor 2, isobutanol and yeast population by the factor 3 and finally the amylic alcohols and ethanol yield by the factor 4. The factor plot with the factor 1 and 2 groups the fermentations in 3 groups according to the strain and fermentation media. The group 1 involves AR5/GRO3 co-cultures free and immobilized in JA, and was correlated with the higher ethyl acetate concentrations and also methanol concentration since this is present only in JA (Figure 4). The group 2 involves the AR5/GRO3 co-cultures free and immobilized in M11 and was correlated with isoamyl acetate, isobutanol, ethanol and acetaldehyde concentrations (Figure 4). Finally the group 3 involves the AR5/DU3 co-cultures in both mediums and was correlated with amylic alcohols, final sugar, 1-propanol concentrations and ethanol yield (Figure 4).

**Table 5.** Factor score coefficients value of each variable analyzed and the variance explained in each factor.

<b>Factor Score Coefficients</b>	<b><i>Factor 1</i></b>	<b><i>Factor 2</i></b>	<b><i>Factor 3</i></b>	<b><i>Factor 4</i></b>
<i>Variance</i>	33.909	21.472	16.890	9.544
Acetaldehyde	0.811679	0.0105092	-0.405218	0.068182
Ethyl acetate	-0.207816	0.883638	0.00424224	-0.313899
1-Propanol	0.769748	-0.422293	-0.0146566	0.313212
Isobutanol	0.271935	0.385812	0.820365	0.162684
Amylic alcohols	-0.106161	-0.482213	0.50336	0.587167
Ethanol	0.831523	0.104643	0.296052	0.353136
Yeast population	-0.0596201	-0.0322205	0.861876	-0.157961
Final sugar	0.252744	-0.699597	0.0576552	-0.344977
Ethanol yield	0.387997	-0.096087	-0.158915	0.765525
Methanol	-0.873684	0.128651	-0.180779	0.0911039
Isoamyl acetate	0.0934248	0.757949	0.232821	-0.155556



**Figure 4.** Factor plot with the variables analyzed and factor plot with the yeasts strains and fermentation medium analyzed

## **Conclusion**

The co-culture is a feasible way to do JA fermentation in order to improve the aromatic profile in the tequila.

The non-*Saccharomyces* yeast strains studied in this work were adapted naturally to JA and shown the capacity to grow like *S. cerevisiae*.

Yeast immobilization in *Agave* juice fermentations did not show significant differences in esters concentrations and ethanol yield.

## References

1. Albergaria H; Francisco D; Gori K; Arneborg N and Gírio F (2010) “*Saccharomyces cerevisiae* CCMI 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains” *Appl Microbiol Biotechnol* **86**:965-972.
2. Amaya-Delgado L; Herrera-López E J; Arrizon J; Arellano-Plaza M and Gschaedler A (2013) “Performance evaluation of *Pichia kluyveri*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in industrial tequila fermentation” *World J Microbiol Biotechnol* **29**(5):875-81.
3. Andorra I; Berradre M; Rozès N; Mas A; Guillamón J M and Esteve-Zarzoso B (2010a) “Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations” *Eur Food Res Technol* **231**:215-224.
4. Andorra I; Landi S; Mas A; Esteve-Zarzoso B and Guillamón J M (2010b) “Effect of fermentation temperature on microbial population evolution using culture-independent and dependent techniques” *Food Research International* **43**:773-779.
5. Andorra I; Berradre M; Mas A; Esteve-Zarzoso B and Guillamón J M (2012) “Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile” *LWT – Food Science and Technology* **49**:8-13.
6. Arellano M; Gschaedler A and Alcazar M (2011) “Major volatile compounds analysis produced from mezcal fermentation using gas chromatography equipped headspace (GC-HS)” Chapter 5 in *Gas chromatography in plant science, wine technology, toxicology and some specific applications*, pp 73-88.
7. Azmi A S; Ngoh G C; Mel M and Hasan M (2010) “Ragi tapai and *Saccharomyces cerevisiae* as potential coculture in viscous fermentation medium for ethanol production” *African Journal of Biotechnology* **9**(42):7122-7127.

8. Barrajon N; Capece A; Arévalo-Villena M; Briones A and Romano P (2011) “Co-inoculation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains and influence on volatile composition of wine” *Food Microbiology* **28**:1080-1086.
9. Ciani M and Ferraro L (1998) “Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines” *Journal of Applied Microbiology* **85**:247-254.
10. Comitini F; Gobbi M; Domizio P; Romani C; Lencioni L; Mannazzu I and Ciani M (2011) “Selected non-*Saccharomyces* wine yeast in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*” *Food Microbiology* **28**:873-882.
11. Diaz-Montaña D M; Délia M L; Estarrón-Espinosa M and Strehaiano P (2008) “Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from *Agave tequilana* Weber juice” *Enzyme and Microbial Technology* **42**:608-616.
12. Diaz-Montaña D M; Favela-Torres E and Córdova J (2010) “Improvement of growth, fermentative efficiency and ethanol tolerance of *Kloeckera africana* during the fermentation of *Agave tequilana* juice by addition of yeast extract” *J Sci Food Agric* **90**:321-328.
13. Domizio P; Romani C; Lencioni L; Comitini F; Gobbi M; Mannazzu I and Ciani M (2011) “Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation” *International Journal of Food Microbiology* **147**:170-180.
14. Ferreira Duarte W; Ferreira de Sousa M V; Ribeiro Dias D and Freitas Schwan R (2011) “Effect of co-inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus fermentum* on the Quality of the Distilled sugar cane beverage cachaça” *Journal of Food Science* **76**(9):1307-1318.
15. Ferreira-Duarte W; Cunha-Amorim J and Freitas-Schwan R (2012) “The effects of co-culturing non-*Saccharomyces* yeasts with *S. cerevisiae* on the sugar cane spirit (cachaça) fermentation process” *Antonie van Leeuwenhoek* **103**(1):175-194.

16. Fleet G H; Lafon-Lafourcade S and Ribéreau-Gayon (1984) “Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of bourdeaux wines” *Appl Environ Microbiol* **48**(5):1034-1038.
17. Hickert L R; da Cunha-Pereira F; de Souza-Cruz P B; Rosa C A and Záchia-Ayub M A (2013) “Ethanogenic fermentation of co-cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 in synthetic medium and rice hull hydrolysate” *Bioresource Technology* **131**:508-514.
18. Jolly N P; Augustyn O P H; Pretorius I S (2003) “The use of *Candida pulcherrima* in combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the production of Chenin blanc wine” *S Afr J Enol Vitic* **24**(2):63-69.
19. Jolly N P; Augustyn O P H and Pretorius I S (2006) “The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production” *S Afr J Enol Vitic* **27**(1):15-39.
20. Kunkee R E (1984) “Selection and modification of yeasts and lactic acid bacteria for wine fermentation” *Food Microbiology* **1**(4):315-332.
21. Lappe-Oliveras P; Moreno-Terrazas R; Arrizón-Gaviño J; Herrera-Suárez T; García-Mendoza A and Gschaedler-Mathis A (2008) “Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled *Agave* beverages” *FEMS Yeast Research* **8**:1037-1052.
22. Lopez-Alvarez A; Díaz-Pérez A L; Sosa-Aguirre C; Macías-Rodríguez L and Campos-García J (2012) “Ethanol yield and volatile compound content in fermentation of agave must by *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 comparing with *Saccharomyces cerevisiae* baker’s yeast used in tequila production” *Journal of Bioscience and Bioengineering* **113**(5):614-618.
23. Medina K; Boido E; Dellacassa E and Carrau F (2012) “Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation” *International Journal of Food Microbiology* **157**:245-250.

24. Middelbeek E J; Van de Laar H H A M; Hermans J M H; Stumm C and Vogels G D (1980) "Physiological conditions affecting the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to a *Pichia kluyveri* killer toxin and energy requirement for toxin action" *Antonie van Leeuwenhoek* **46**:483-497.
25. Miller G L (1959) "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar" *Analytical Chemistry* **31**(3):426-428.
26. Nissen P and Arneborg N (2003) "Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed *Saccharomyces cerevisiae*" *Arch microbiol* **180**:257-263.
27. NOM-006-SCFI-2012 (2012) Bebidas Alcohólicas Tequila Especificaciones. Secretaría de Economía. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 13 de diciembre de 2012.
28. Sadoudi M; Tourdot-Maréchal R; Rousseaux S; Steyer D; Gallardo-Chacón J J; Ballester J; Vichi S; Guérin-Schneider R; Caixach J and Alexander H (2012) "Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts" *Food Microbiology* **32**(2):243-53.
29. Sharma A K; Singh P N and Sawant S D (2011) "Evaluation of fermentation efficiency of yeast strains and their effect on quality of young wines" *Indian J Microbiol* **52**(3):495-499.
30. Suzzi G; Schirone M; Sergi M; Marianella R M; Fasoli G; Aguzzi I and Tofalo R (2012) "Multistarter from organic viticulture for red wine Montepulciano d'Abruzzo production" *Front Microbiol* **3**:135.
31. Trinh T T T; Woon W Y; Yu B; Curran P and Liu S Q (2011) "Growth and fermentation kinetics of a mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* and *Williopsis saturnus* var. *saturnus* at different ratios in longan juice (*Dimocarpus longan* Lour.)" *International Journal of Food Science and Technology* **46**:130-137.

32. Viana F; Belloch C; Vallés S and Manzanares P (2011) “Monitoring a mixed starter of *Hanseniaspora vineae*-*Saccharomyces cerevisiae* in natural must: Impact on 2-phenylethyl acetate production” *International Journal of Food Microbiology* **151**:235-240.

## 7.10. CAPITULO 10. Modelo matemático de las cinéticas de crecimiento y consumo de azúcar de los cultivos puros y mixtos a nivel laboratorio en matraz.

### 7.10.1. INTRODUCCIÓN

Los modelos matemáticos sirven para describir el crecimiento o comportamiento de las levaduras, pero además estos modelos pueden ayudar a comprender los fenómenos que suceden durante el proceso.

Cuando los modelos matemáticos se utilizan para predecir el crecimiento de los microorganismos, este crecimiento se realiza de manera no lineal siendo exponencial en la mayoría de los casos, hasta llegar a un máximo de crecimiento, de entre los cuales se encuentran los siguientes:

$$\begin{aligned} \text{Gompertz} : y &= A \cdot e^{B \cdot e^{C \cdot x}} \\ \text{Logístico} : y &= A / (1 + B \cdot e^{C \cdot x}) \\ \text{MMF} : y &= (A \cdot B + C \cdot x^D) / (B + x^D) \\ \text{Richards} : y &= 1 / (A + B \cdot e^{C \cdot x})^D \end{aligned}$$

Donde “y” es el crecimiento a tiempo “x”, mientras A, B, C y D son variables de cada modelo. (Winsor 1932; Vedenov y Pestis 2008).

### 7.10.2. METODOLOGÍA

Para el procesamiento de datos se utilizaron archivos en Excel ya programados que fueron proporcionados en Francia por el Dr. Cedric Brandam. De los cuales solo se alimentaron los datos experimentales obtenidos para obtener el resultado de las constantes que se muestran en la parte de resultados de este capítulo.

Se utilizaron los modelos MMF para el crecimiento de las levaduras y el modelo SL&P para modelar el consumo de azúcar.

**MMF (Morgan Mercer Flodin 1975)**

$$y = \frac{a \times b + c \times t^d}{b + t^d} \quad \text{o bien,} \quad y = \frac{(X_0 \times \text{rate}) + (X_{\text{max}} \times t^{\text{orden}})}{(\text{rate} + t^{\text{orden}})}$$

- a X0 Población inicial.
- b rate Velocidad constante de crecimiento.
- c Xmax Población máxima de crecimiento.
- d orden Orden de reacción.
- t Tiempo.

### SL&P (Luedeking-Piret)

Esta ecuación depende de los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$  además de la evolución de la concentración de levaduras.

$$-\frac{dS}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X = (\alpha\mu + \beta)X$$

### Modelo para estimar el consumo de azúcar de los cultivos mixtos.

$$\frac{dS}{dt} = \left( \alpha_1 \frac{dX_1}{dt} + \beta_1 X_1 \right) + \left( \alpha_2 \frac{dX_2}{dt} + \beta_2 X_2 \right)$$

S Concentración de sustrato

t Tiempo

$\alpha_1$  y  $\beta_1$  Constantes de *Saccharomyces* calculadas a partir del modelo SL&P.

$X_1$  Población de *Saccharomyces*.

$\alpha_2$  y  $\beta_2$  Constantes de no-*Saccharomyces* calculadas a partir del modelo SL&P.

$X_2$  Población de no-*Saccharomyces*.

### Modelo Sf para calcular las variables K y A para cada una de las levaduras en cultivo mixto.

$$y = S_{n-1} - \left( \left( \frac{K_1 \times P1_n \times S_n}{A_1 + S_n} \right) \times (t_n - t_{n-1}) + \left( \frac{K_2 \times P2_n \times S_n}{A_2 + S_n} \right) \times (t_n - t_{n-1}) \right)$$

- $S_{n-1}$  Concentración de sustrato (azúcar) en el tiempo anterior al analizado.
- $S_n$  Concentración de sustrato (azúcar) a en el tiempo analizado a partir del modelo lizado.
- $P1_n$  Población celular de la levadura *Saccharomyces* en el tiempo analizado.
- $P2_n$  Población celular de la levadura no-*Saccharomyces* en el tiempo analizado.
- $K_1$  Constante relacionada con velocidad de consumo de sustrato por el crecimiento celular de *Saccharomyces*.
- $A_1$  Consumo promedio de azúcar por célula.
- $K_2$  Constante relacionada con la velocidad de consumo de sustrato por el crecimiento celular de no-*Saccharomyces*.
- $A_2$  Consumo promedio de azúcar por célula.
- $t_n$  Tiempo analizado.
- $t_{n-1}$  Tiempo anterior al analizado.

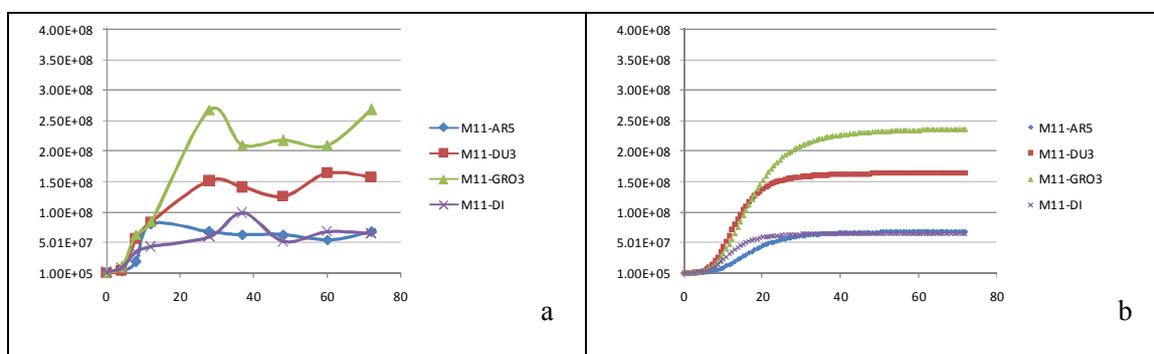
### 7.10.3. RESULTADOS

En este capítulo se discutirá la relación de los modelos matemáticos, debido a que en el capítulo 7.9. ya se discutieron las cinéticas de crecimiento, consumo de azúcar y la producción de compuestos volátiles.

#### 7.10.3.1. Cultivos puros

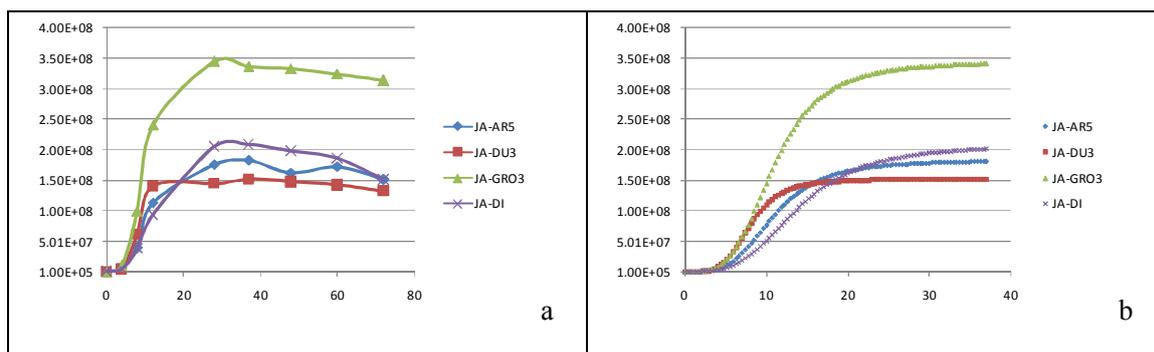
El modelo matemático MMF describe el crecimiento de las levaduras analizadas observando las mismas cinéticas tanto con los datos reales como en con el modelo, en la **figura 7.10.1.** se observan las cinéticas en medio M11 mientras que en la **figura 7.10.2.** se observan las cinéticas en medio JA.

**Figura 7.10.1.** Cinéticas de crecimiento de los cultivos puros en medio M11.



<sup>a</sup> Cinéticas con los datos reales  
<sup>b</sup> Cinéticas con el modelo MMF

**Figura 7.10.2.** Cinéticas de crecimiento de los cultivos puros en medio JA.



<sup>a</sup> Cinéticas con los datos reales  
<sup>b</sup> Cinéticas con el modelo MMF

Los modelos matemáticos se ajustaron a un inóculo de  $1.0E+6$  cel/mL por lo que  $X_0$  será el mismo para todos. Se obtuvieron velocidades (rate) de crecimiento similares con el mismo medio y

diferencias menores entre cepas. El máximo crecimiento se obtuvo con la cepa GRO3 en ambos medios y se observó una tendencia a un mejor crecimiento en medio JA en comparación con lo observado en medio M11 (**Tabla 7.10.1.**). El orden de reacción relaciona las concentraciones molares de sustrato y producto, se obtiene experimentalmente y describe la forma en que la velocidad depende de la concentración del reactante, evaluando como producto la concentración celular para este caso. Con base en los valores más comunes de orden de reacción, se clasifican las reacciones químicas. En el caso de un proceso elemental, la velocidad de reacción es proporcional al producto de las concentraciones de los reactivos elevadas a sus correspondientes coeficientes estequiométricos, para reacciones complejas, la ecuación de velocidad no es tan sencilla, y depende del mecanismo de reacción. De todas formas, para muchas reacciones la velocidad es proporcional a potencias de las concentraciones de los reactivos.

**Tabla. 7.10.1.** Parámetros cinéticos del crecimiento de las levaduras a partir del modelo MMF.

	M11-AR5	M11-DU3	M11-GRO3	M11-DI	JA-AR5	JA-DU3	JA-GRO3	JA-DI
$X_0$	1.0E+6							
rate	25.9E+3	24.8E+3	23.7E+3	22.7E+3	6.4E+3	8.5E+3	7.1E+3	8.2E+3
$X_{max}$	69.0E+6	164.5E+6	237.5E+6	65.5E+6	183.0E+6	152.5E+6	344.5E+6	208.5E+6
orden	3.58	3.93	3.55	4.06	3.67	4.35	3.72	3.42
$\mu_{max}$	129.0E-3	147.8E-3	153.8E-3	188.3E-3	81.8E-3	130.4E-3	82.3E-3	111.7E-3

$X_0$  Población inicial.

rate Velocidad constante de crecimiento( $h^{-1}$ ).

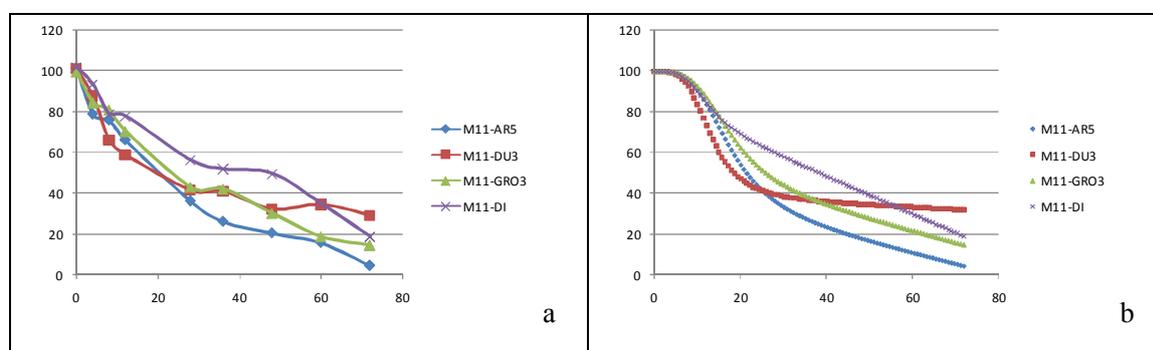
$X_{max}$  Población máxima alcanzada a las 72 horas de crecimiento.

orden Orden de la reacción.

$\mu_{max}$  Máximo valor de  $\mu$ .

Las cinéticas de consumo de azúcar se modelaron con el modelo matemático SL&P obteniendo cinéticas similares entre los datos experimentales y los matemáticos obtenidos, en la **figura 7.10.3.** se observa la evolución de la concentración de azúcar durante la fermentación en medio M11, mientras que en la **figura 7.10.4.** se observa en medio JA.

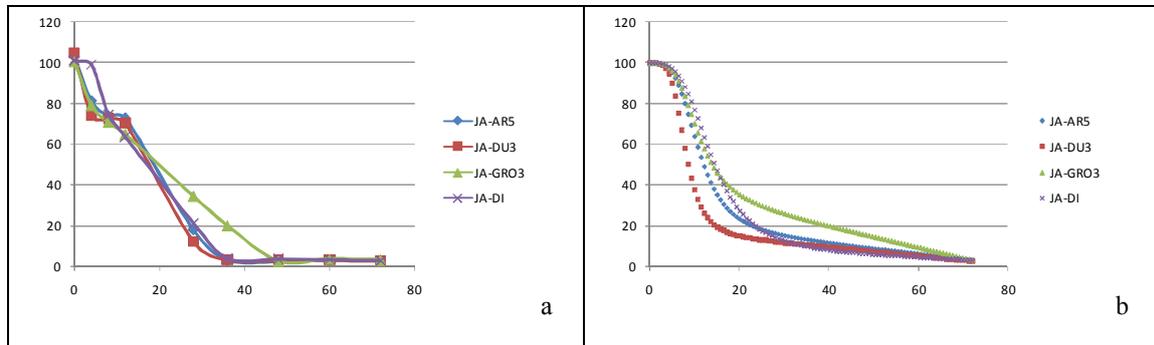
**Figura 7.10.3.** Cinéticas de consumo de azúcar de los cultivos puros en medio M11.



<sup>a</sup> Cinéticas con los datos reales

<sup>b</sup> Cinéticas con el modelo SL&P

**Figura 7.10.4.** Cinéticas de consumo de azúcar de los cultivos puros en medio JA.



<sup>a</sup> Cinéticas con los datos reales

<sup>b</sup> Cinéticas con el modelo SL&P

A partir de los datos cinéticos obtenidos con el modelo MMF de crecimiento se obtuvieron los parámetros cinéticos  $\alpha$  y  $\beta$  con el modelo SL&P para el consumo de azúcar de las diferentes cepas de levaduras estudiadas tanto en medio M11 como en medio JA.

**Tabla. 7.10.2.** Parámetros cinéticos del consumo de azúcar a partir del modelo SL&P.

	M11-AR5	M11-DU3	M11-GRO3	M11-DI	JA-AR5	JA-DU3	JA-GRO3	JA-DI
A	1.0E-6	378.7E-9	226.7E-9	551.1E-9	461.0E-9	560.9E-9	201.5E-9	447.5E-9
B	11.7E-9	627.2E-12	5.4E-9	14.0E-9	6.6E-9	2.9E-9	10.0E-9	1.4E-9

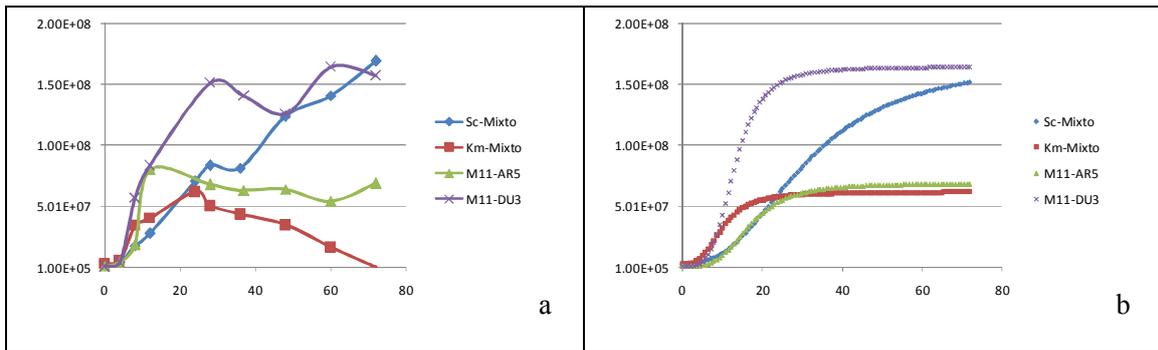
$\alpha$  se relaciona con el mantenimiento celular, explica la cantidad de azúcar que se consume en relación a la cantidad de células presentes.

$\beta$  se relaciona con el crecimiento, explica la cantidad de azúcar que se consume para la producción de células nuevas.

### 7.10.3.2. Cultivos mixtos

A continuación se presenta un comparativo entre el crecimiento de la cepa AR5 y DU3 en cultivos puros y en cultivo mixto, tanto en medio M11 (**figura 7.10.5.**) como en medio JA (**figura 7.10.6.**).

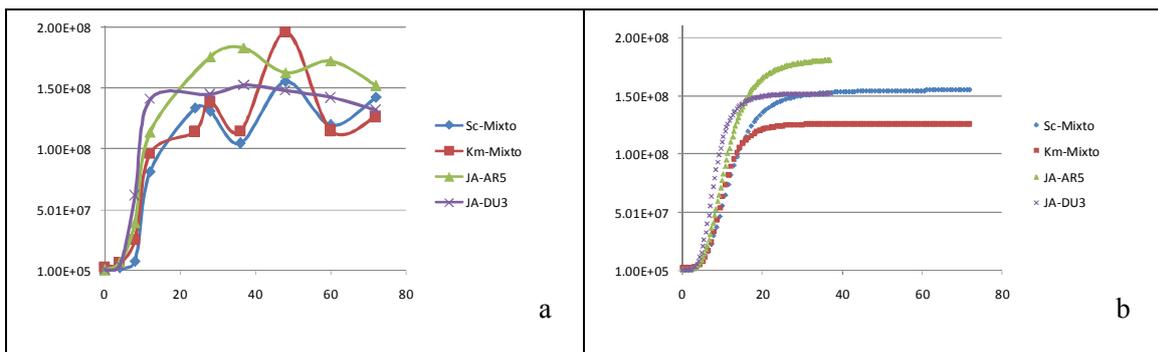
**Figura 7.10.5.** Cinéticas de crecimiento del cultivo mixto AR5/DU3 en medio M11.



<sup>a</sup> Cinéticas con los datos reales  
<sup>b</sup> Cinéticas con el modelo MMF

La cepa DU3 (*K. marxianus*) en cultivo mixto en medio M11 llega a su máximo de crecimiento alrededor de las 20 horas y después tiende a morir. En la cinética del modelo matemático se observa una estabilidad al llegar al máximo de crecimiento, esto debido a que se realizó un modelado del crecimiento con el modelo MMF que no contempla la muerte celular.

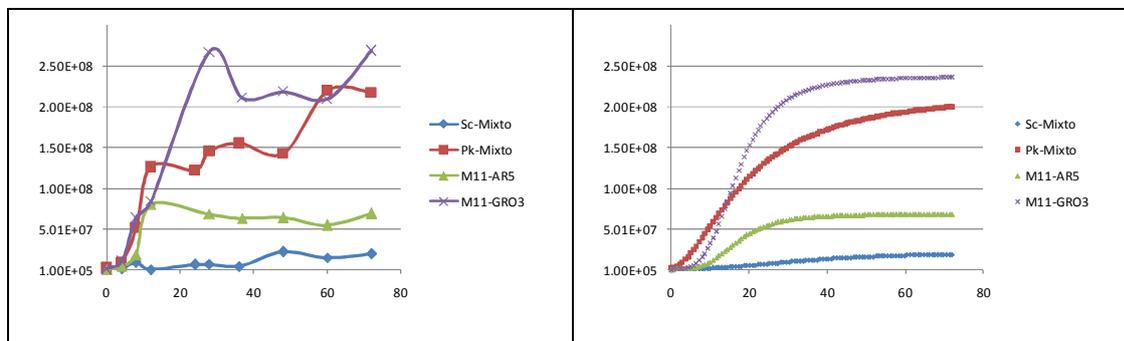
**Figura 7.10.6.** Cinéticas de crecimiento del cultivo mixto AR5/DU3 en medio JA.



<sup>a</sup> Cinéticas con los datos reales  
<sup>b</sup> Cinéticas con el modelo MMF

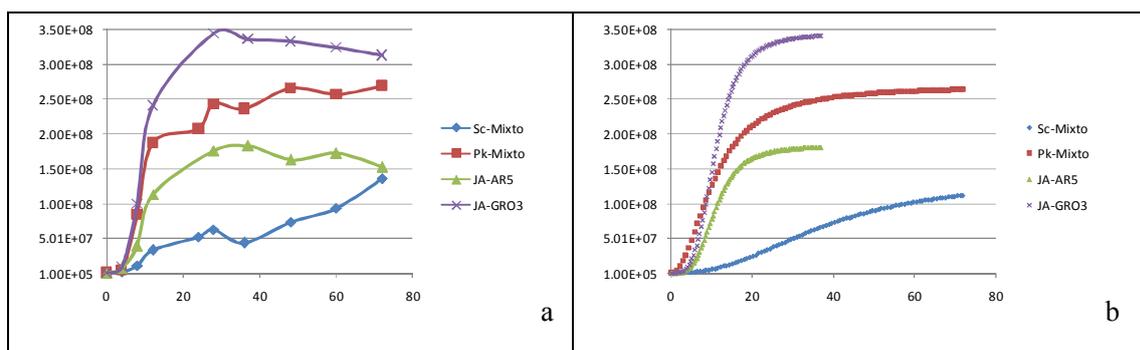
También se realizó un comparativo entre el crecimiento de la cepa AR5 y GRO3 en cultivos puros y en cultivo mixto, tanto en medio M11 (**figura 7.10.7.**) como en medio JA (**figura 7.10.8.**).

**Figura 7.10.7.** Cinéticas de crecimiento del cultivo mixto AR5/GRO3 en medio M11.



<sup>a</sup> Cinéticas con los datos reales  
<sup>b</sup> Cinéticas con el modelo MMF

**Figura 7.10.8.** Cinéticas de crecimiento del cultivo mixto AR5/GRO3 en medio JA.



<sup>a</sup> Cinéticas con los datos reales  
<sup>b</sup> Cinéticas con el modelo MMF

Las velocidades de crecimiento son más rápidas en medio JA y debido a que el modelo MMF una vez que llega al máximo de crecimiento mantiene la cinética estable, se modelaron solo 36 horas en lugar de las 72 horas completas del experimento. Esto no afecta a los parámetros cinéticos ya que estos se obtienen a partir de la pendiente de crecimiento. En la **tabla 7.10.3.** se presentan los parámetros cinéticos del crecimiento global del cultivo mixto, mientras que en la **tabla 7.10.4.** se presentan los parámetros cinéticos del crecimiento de cada una de las levaduras dentro del cultivo mixto.

**Tabla. 7.10.3.** Parámetros cinéticos del crecimiento de las levaduras en cultivo mixto a partir del modelo MMF.

	M11 AR5/DU3	M11 AR5/GRO3	JA AR5/DU3	JA AR5/GRO3
X <sub>0</sub>	5.7E+6	3.7E+6	5.8E+6	2.1E+6
rate	177.7E+0	38.5E+0	65.5E+3	33.3E+0
X <sub>max</sub>	169.5E+6	237.5E+6	269.5E+6	405.5E+6
orden	1.94	1.24	4.61	1.33
μ <sub>max</sub>	106.8E-3	94.0E-3	215.1E-3	112.8E-3

X<sub>0</sub> Población inicial.

rate Velocidad constante de crecimiento (h<sup>-1</sup>).

X<sub>max</sub> Población máxima alcanzada a las 72 horas de crecimiento.

orden Orden de la reacción.

μ<sub>max</sub> Máximo valor de μ.

**Tabla. 7.10.4.** Parámetros cinéticos del crecimiento de cada una de las cepas de levadura en cultivo mixto a partir del modelo MMF.

	M11 AR5/DU3		M11 AR5/GRO3		JA AR5/DU3		JA AR5/GRO3	
	AR5	DU3	AR5	GRO3	AR5	DU3	AR5	GRO3
X <sub>0</sub>	2.9E+6	2.8E+6	1.3E+6	2.4E+6	2.6E+6	3.2E+6	899.2E+3	1.2E+6
rate	6.1E+3	1.0E+3	7.2E+3	190.6E+0	9.4E+3	35.5E+3	6.2E+3	133.3E+0
X <sub>max</sub>	169.5E+6	62.1E+6	22.2E+6	219.5E+6	155.4E+6	126.6E+6	136.2E+6	269.3E+6
orden	2.54	3.00	2.50	1.77	3.69	4.53	2.40	2.07
μ <sub>max</sub>	68.3E-3	129.0E-3	48.9E-3	90.3E-3	170.6E-3	185.9E-3	74.9E-3	151.8E-3

X<sub>0</sub> Población inicial.

rate Velocidad constante de crecimiento (h<sup>-1</sup>).

X<sub>max</sub> Población máxima alcanzada a las 72 horas de crecimiento.

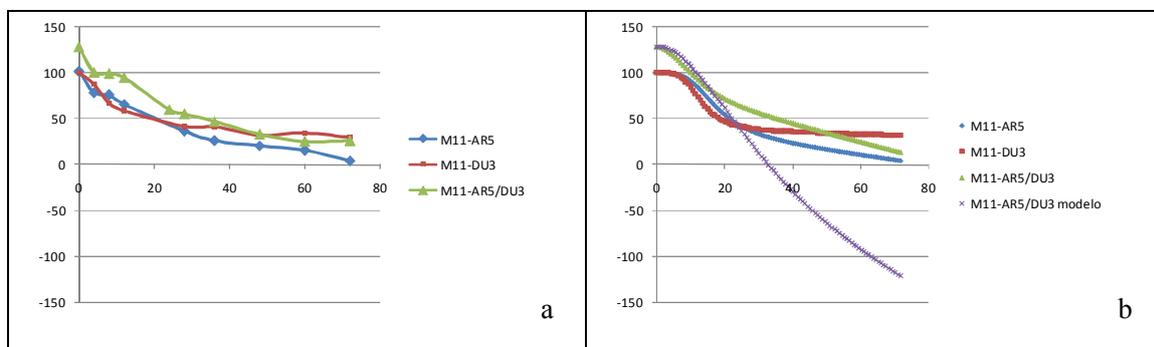
orden Orden de la reacción.

μ<sub>max</sub> Máximo valor de μ.

Con los parámetros cinéticos obtenidos del crecimiento y consumo de azúcar de las levaduras en cultivo puro, se realizó un modelo el cual predice lo que pasaría si las 2 levaduras actúan de la misma manera sin ser afectado su metabolismo con el co-cultivo.

En la **figura 7.10.9.** se observa que el modelo predice que a las 35 horas debería de terminarse el azúcar si las 2 levaduras continuaran trabajando como lo hacen cuando están en cultivo puro, sin embargo se observa que la cinética del cultivo mixto es más parecida a la cinética de AR5. El modelo es alimentado con los datos del modelo de crecimiento MMF y como este considera que DU3 no muere (como en los datos experimentales) el modelo para el consumo de azúcar considera que DU3 continua activa todo el tiempo.

**Figura 7.10.9.** Cinéticas de consumo de azúcar del cultivo mixto AR5/DU3 en medio M11.

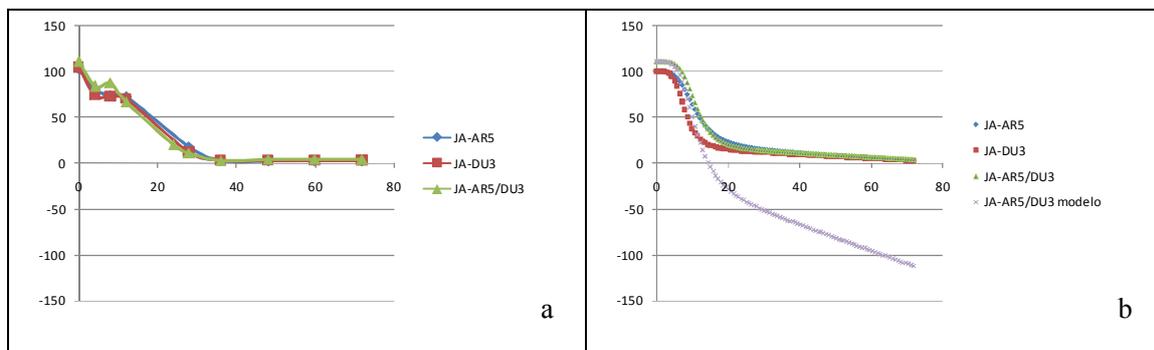


<sup>a</sup> Cinéticas con los datos reales

<sup>b</sup> Cinéticas con el modelo SL&P

El modelo del cultivo mixto AR5/DU3 en medio JA predice que a las 15 horas terminaría todo el azúcar, la proporción de las poblaciones de estas 2 levaduras en medio JA es aproximadamente del 50% durante las 72 horas. Las cinéticas de consumo de azúcar son similares tanto las de los cultivos puros como la del cultivo mixto. Por lo que parece que estas 2 levaduras en cultivo mixto en medio JA participan de la misma manera, y cuando la concentración de azúcar es baja disminuye su metabolismo.

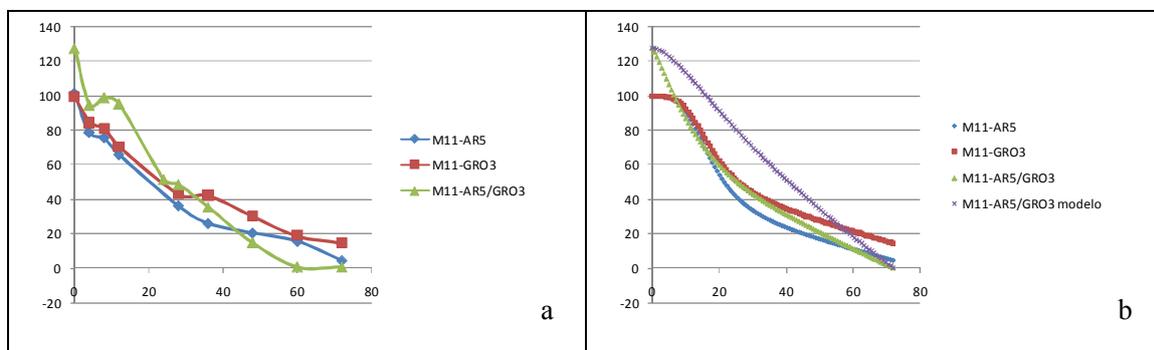
**Figura 7.10.10.** Cinéticas de consumo de azúcar del cultivo mixto AR5/DU3 en medio JA.



<sup>a</sup> Cinéticas con los datos reales

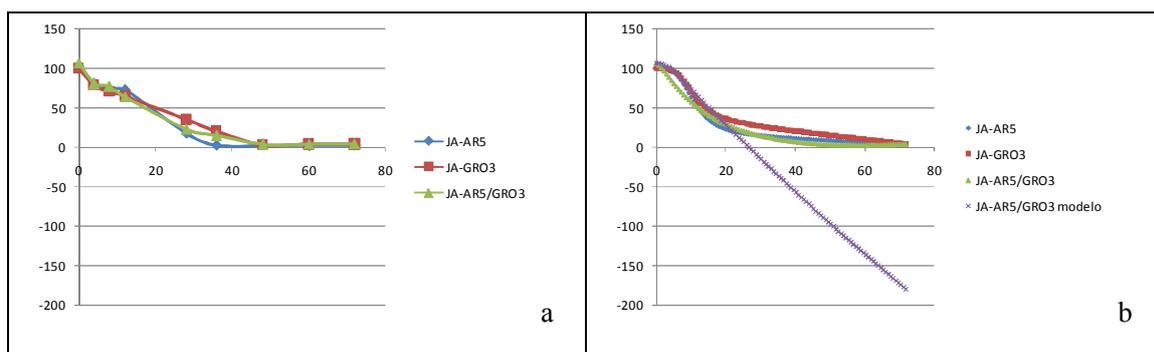
<sup>b</sup> Cinéticas con el modelo SL&P

**Figura 7.10.11.** Cinéticas de consumo de azúcar del cultivo mixto AR5/GRO3 en medio M11.



<sup>a</sup> Cinéticas con los datos reales  
<sup>b</sup> Cinéticas con el modelo SL&P

**Figura 7.10.12.** Cinéticas de consumo de azúcar del cultivo mixto AR5/GRO3 en medio JA.

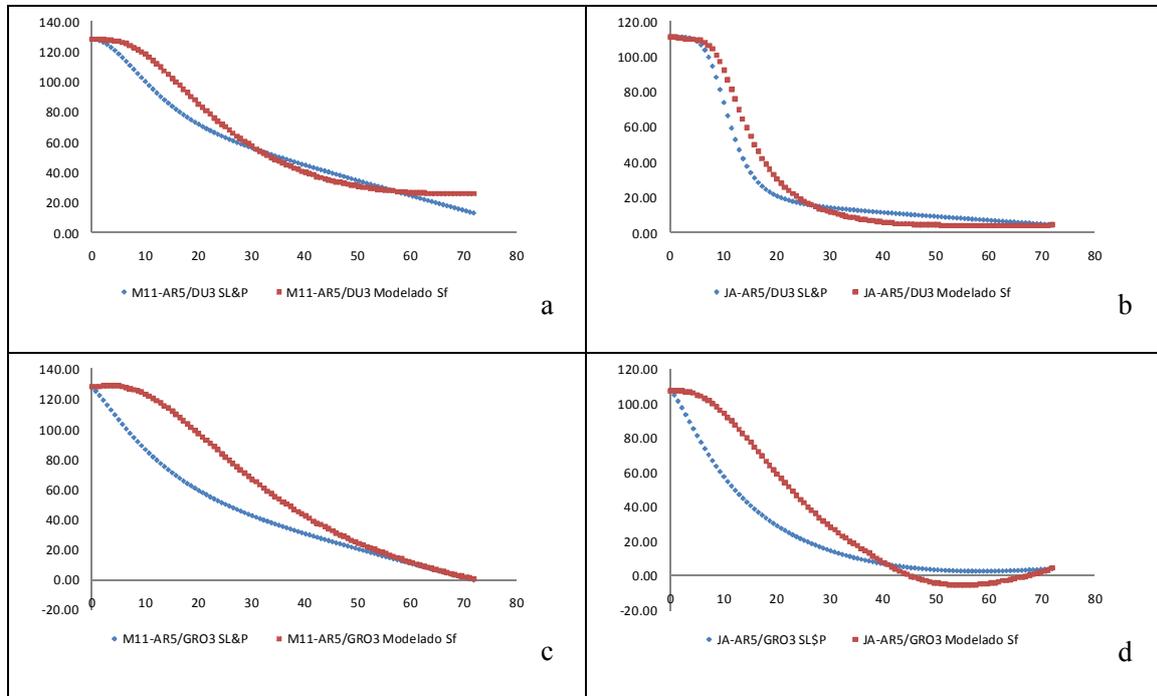


<sup>a</sup> Cinéticas con los datos reales  
<sup>b</sup> Cinéticas con el modelo SL&P

**Tabla. 7.10.5.** Parámetros cinéticos del consumo de azúcar de los cultivos mixtos a partir del modelo SL&P.

	M11 AR5/DU3	M11 AR5/GRO3	JA AR5/DU3	JA AR5/GRO3
$\alpha$	5.1094E-07	5.538E-07	3.6183E-07	3.1375E-07
$\beta$	5.1598E-09	2.7519E-09	7.8901E-10	-1.0184E-09

**Figura 7.10.13.** Comparación de las cinéticas de consumo de azúcar de los cultivos mixtos modelados con el modelo MMF y el modelo Sf.



<sup>a</sup> Cinética de consumo de azúcar del cultivo mixto AR5/DU3 en medio M11.

<sup>b</sup> Cinética de consumo de azúcar del cultivo mixto AR5/DU3 en medio JA.

<sup>c</sup> Cinética de consumo de azúcar del cultivo mixto AR5/GRO3 en medio M11.

<sup>d</sup> Cinética de consumo de azúcar del cultivo mixto AR5/GRO3 en medio JA.

Se puede apreciar que matemáticamente los valores de  $K_1$  son negativos, lo que nos indica que es la cepa *Saccharomyces* la que es inhibida por la cepa no-*Saccharomyces*. Por otro lado los valores de  $A$  nos muestran que hay un mayor consumo de azúcar por célula en medio JA con valores mayores a los obtenidos en medio M11.

**Tabla. 7.10.6.** Parámetros cinético del consumo de azúcar en los cultivos mixtos obtenidos a partir del modelo Sf.

	M11 AR5/DU3	M11 AR5/GRO3	JA AR5/DU3	JA AR5/GRO3
K <sub>1</sub>	-50.9E-9	-653.9E-9	-395.1E-9	-110.0E-9
A <sub>1</sub>	9.8E-9	9.8E-9	3.6E-3	559.7E-3
K <sub>2</sub>	88.9E-9	49.3E-9	348.1E-9	26.1E-9
A <sub>2</sub>	821.3E-12	3.9E-9	273.6E-9	168.9E-3

K<sub>1</sub> Constante relacionada con l velocidad de consumo de sustrato por el crecimiento celular de *Saccharomyces* (AR5)

A<sub>1</sub> Consumo promedio de azúcar por célula relacionada a AR5

K<sub>2</sub> Constante relacionada con la velocidad de consumo de sustrato por el crecimiento celular de no-*Saccharomyces* (DU3 ó GRO3)

A<sub>2</sub> Consumo promedio de azúcar por célula relacionada a no-*Saccharomyces* (DU3 ó GRO3)

#### 7.10.4. CONCLUSION

Se lograron modelar matemáticamente las cinéticas de crecimiento celular así como las cinéticas de consumo de azúcar.

En los cultivos mixtos existe una inhibición por parte de alguna de las 2 levaduras presentes, y la inhibición depende tanto del medio de cultivo como del la cepa de levadura presente en co-cultivo con *Saccharomyces*.

La no-*Saccharomyces* le gana en el consumo de sustrato a *S. cerevisiae* en cultivo mixto.

## 8. CONCLUSIONES GENERALES

Se seleccionaron 2 cepas no-*Saccharomyces* capaces de realizar la fermentación alcohólica, además de aumentar la concentración de ésteres en el tequila.

Cada cepa de levadura es afectada de manera diferente por cada factor estudiado, por lo que se hace necesaria una caracterización de cada cepa.

No se puede generalizar a las levaduras con el simple estudio de *Saccharomyces*.

La inmovilización no tuvo efecto positivo en la fermentación de jugo de *Agave* y no fue necesaria para el co-cultivo.

Las levaduras no-*Saccharomyces* estudiadas no fueron inhibidas en co-cultivo, logrando estar presentes durante toda la fermentación, aportando una mayor concentración de ésteres al tequila.

Se lograron modelar las cinéticas de crecimiento y consumo de sustrato, lo que nos permite explicar el comportamiento de las levaduras en los diferentes medios, y se explica el comportamiento de las levaduras en co-cultivo.

El estudio del escalamiento es una parte fundamental para lograr llevar los resultados del laboratorio a su aplicación industrial.

El conocimiento de las demandas nutrimentales y condiciones ambientales de cada cepa, permite lograr llevar a término la fermentación para obtener el producto deseado.

Las levaduras no-*Saccharomyces* presentaron un potencial en sus capacidades de producción de compuestos volátiles, en comparación a las concentraciones que fueron obtenidas con la cepa control *S. cerevisiae*. Como era de esperarse, pero además las levaduras no-*Saccharomyces*, también mostraron ser capaces de llegar a realizar fermentaciones en cultivo puro, exhibiendo capacidades fermentativas en producción de etanol, similares a las que mostró *S. cerevisiae*.

Los diferentes factores estudiados afectaron a las levaduras de diferentes maneras, siendo algunos de ellos positivos y otros negativos, tanto en la capacidad para producir etanol como en la producción de compuestos volátiles de interés, para modificar de manera positiva el sabor del tequila. Teniendo de manera general que la fermentación con aireación y a bajas temperaturas, parecen ser una buena alternativa para llegar a

aumentar la concentración de esteres sin cambiar la cepa de levadura con la que se esté trabajando en cada una de las fabricas de tequila.

Si se desea modificar todo el perfil aromático de la bebida alcohólica, la mejor opción es cambiar de cepa de levadura, teniendo el conocimiento previo de que factores tanto ambientales como nutrimentales, afectan el metabolismo de la levadura, para poder mantener una estabilidad en el producto, independientemente de la época del año en la que se éste trabajando.

Una gran ventaja de trabajar con fermentaciones de tequila, es que la materia prima al ser solo una especie de *Agave*, no muestra una variación tan grande como lo es con la industrial del vino, donde la materia prima que es la uva, es muy variable en cada especie. Y la materia prima que se le proporciona a la levadura para realizar la fermentación es una pieza clave en la calidad y composición que se tendrá al final en la bebida alcohólica, por lo que para la industrial del tequila, no parece ser un problema tan grande. Siempre y cuando se conozcan las necesidades nutricionales de la levadura que se utilice para su propio proceso.

El conocimiento de las capacidades fermentativas de la levadura en particular que utilice cada fabrica, le proporciona el conocimiento para poder llegar a estabilizar el producto final, a pesar de los cambios ambientales o nutrimentales (materia prima). Por lo que se hace indispensable el estudio de las capacidades fermentativas de cada cepa, con el fin de realizar una caracterización en cada fábrica. Lo cual les daría la oportunidad de llegar a tener diversos productos realizados con la misma cepa de levadura, solamente realizando cambios controlados desde el punto de vista ambiental (temperatura, agitación) o nutrimental (pH, relación en la concentración de la fuente de carbono, concentración de minerales), entre otros.

## 9. PERSPECTIVAS

### Caracterización de las cepas a nivel industrial

Se pone en evidencia en este trabajo la importancia de caracterizar cada una de las cepas de levaduras, para poder tener un buen control del proceso y llegar a obtener producto final homogéneo.

### Importancia del aislamiento de las cepas

Los estudios demuestran que en vino y las demás bebidas alcohólicas existe una baja diversidad de *no-Saccharomyces* de manera natural en fermentaciones con *Saccharomyces*. Siendo de crucial importancia la metodología a seguir para poder obtener un resultado representativo de la microflora presente. Lo que ayuda a garantizar la recuperación de cepas buenas para aplicarlas a otros procesos biotecnológicos.

### Estudio de los factores nutrimentales y ambientales en base al proceso

Conociendo el comportamiento de las levaduras y como le afecta cada uno de los factores nutrimentales y ambientales es posible llegar a realizar diversos productos, solamente con el hecho de cambiar las condiciones de fermentación.

Si bien, esto se puede hacer con *Saccharomyces* pura, para poder elevar la concentración de aromas es necesario cambiar por una *no-Saccharomyces* y conociendo las características de la cepa, se puede fermentar sin necesidad de la presencia de *Saccharomyces*.

### Métodos de conservación para garantizar las cepas

Una vez caracterizadas las cepas, hay que garantizar su permanencia y estabilidad, por lo que se deben de seleccionar metodologías de conservación que permitan tener la cepa sin cambios genéticos y fisiológicos para estar realizando el mismo proceso siempre.

### Estudio molecular de los genes para comprender el metabolismo

La relación de la expresión génica con la fisiológica es necesaria para comprender el proceso metabólico de la levadura y de esta manera poder controlar de una mejor manera a la levadura, o bien, poder favorecer la condiciones

nutrimentales y ambientales para que fisiológicamente se encuentre bien y produzca lo que nosotros deseamos.

#### Trabajar con el escalamiento

El comportamiento que tienen las levaduras a nivel matraz y nivel biorreactor, fueron diferentes poniendo en evidencia la necesidad de trabajar con el escalamiento a nivel piloto, y poder llevarlo a nivel industrial de manera adecuada. El conocimiento de las necesidades nutrimentales y ambientales, permitió el éxito de su aplicación a nivel industrial.

#### Control del proceso en base al modelo matemático

La modelización de los procesos es solamente el inicio para comprender como es que se comportan las levaduras, explicado matemáticamente, para en un futuro poder llegar a tener un mejor control con sistemas automatizados.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdel-Banat, B. M. A., Hoshida, H., Ano, A., Nonklang, S., & Akada, R. (2010). High-temperature fermentation: How can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), 861-867.
2. Abraham, T. E., & Surender, G. D. (1993). Horizontal rotary bioreactor: effect of rotation and bed characteristics on ethanol fermentation with immobilized yeast cells. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75(4), 322-324.
3. Escobar, L. M. A., Álvarez, U. S., & Peñuela, M. (2012). Yeast immobilization in lignocellulosic wastes for ethanol production in packed bed bioreactor. *Revista Facultad de Ingeniería*, (62), 66-76.
4. Aguilar-Uscanga, B., Arrizon, J., Ramirez, J., & Solis-Pacheco, J. (2007). Effect of *Agave tequilana* juice on cell wall polysaccharides of three *Saccharomyces cerevisiae* strains from different origins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91, 151-157.
5. Akrida-Demertzp, K., & Koutinas, A. A. (1991). Optimization of sucrose ethanol fermentation for K, Na, Ca, and cu metal contents. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 30(1), 1-7. Humana Press.
6. Albergaria, H., & Arneborg, N. (2016). Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-12. Springer Verlag.
7. Alloue-Boraud, W. A. M., N'Guessan, K. F., Djèni, N. T., Hiligsmann, S., Djè, K. M., & Delvigne, F. (2014). Fermentation profile of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida tropicalis* as starter cultures on barley malt medium. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 5236–5242.
8. Andorrà, I., Landi, S., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B., & Guillamón, J. M. (2010). Effect of fermentation temperature on microbial population evolution using culture-independent and dependent techniques. *Food Research International*, 43(3), 773-779.
9. Arrizon, J., & Gschaedler, A. (2007). Effects of the addition of different nitrogen sources in the tequila fermentation process at high sugar concentration. *Journal of Applied Microbiology*, 102(4), 1123-1131.
10. Athenstaedt, K., Zweytick, D., Jandrositz, A., Kohlwein, S. D., & Daum, G. (1999). Identification and characterization of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 181(20), 6441-8.
11. Aung, M.T., Lee, P.R., & Shao-Quan Liu, B.Y. (2015). Cider fermentation with three *Williopsis saturnus* yeast strains and volatile changes. *Annals of Microbiology*, 65, 921–928.
12. Babiskin, A. H., & Smolke, C. D. (2011). A synthetic library of RNA control modules for predictable tuning of gene expression in yeast. *Molecular systems biology*, 7, 471.
13. Barbosa, C., Mendes-Faia, A., Lage, P., Mira N.P., & Mendes-Ferreira, A. (2015). Genomic expression program of *Saccharomyces cerevisiae* along a mixed-culture wine fermentation with *Hanseniaspora guilliermondii*. *Microbial Cell Factorie*, 14 (124), 1-17.

14. Bell, S. J., & Henschke, P. a. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 242-295.
15. Beltran, G., Novo, M., Guillamón, J. M., Mas, A., & Rozès, N. (2008). Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), 169-177.
16. Bely, M., Rinaldi, A., & Dubourdieu, D. (2003). Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 96(6), 507-512.
17. Benito, S., Hofmann, T., Laier, M., Lochbühler, B., Schüttler, A., Ebert, K., Fritsch, S., et al. (2015). Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *European Food Research and Technology*, 241(5), 707-717.
18. Blanco, P., Vázquez-Alén, M., & Losada, A. (2008). Influence of yeast population on characteristics of the wine obtained in spontaneous and inoculated fermentations of must from *Vitis vinifera* Lado. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(3), 183-188.
19. Boyer, L. J., Vega, J. L., & Gaddy, J. L. (1992). Effect of furfural on ethanol S. *cerevisiae* in a cross-linked cell reactor production. *Biomass and Bioenergy*, 3(2), 71-76.
20. Brányik, T., Vicente, A. a, Dostálek, P., & Teixeira, J. a. (2008). A Review of Flavour Formation in Continuous Beer Fermentations. *Journal Of The Institute Of Brewing*, 114(1), 3-13.
21. Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., & Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol*, 34(3), 597-601.
22. Bustin, S. a, Beaulieu, J.-F., Huggett, J., Jaggi, R., Kibenge, F. S. B., Olsvik, P. a, Penning, L. C., et al. (2009). MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC molecular biology*, 11, 74.
23. Bustin, S. A. (2010). Why the need for qPCR publication guidelines?-The case for MIQE. *Methods*, 50(4), 217-226.
24. Cankorur-Cetinkaya, A., Dereli, E., Eraslan, S., Karabekmez, E., Dikicioglu, D., & Kirdar, B. (2012). A novel strategy for selection and validation of reference genes in dynamic multidimensional experimental design in yeast. *PLoS ONE*, 7(6).
25. Carlquist, M., Gibson, B., Karagul Yuceer, Y., Paraskevopoulou, A., Sandell, M., Angelov, A. I., Gotcheva, V., et al. (2015). Process engineering for bioflavour production with metabolically active yeasts - a mini-review. *Yeast*, 32(1), 123-143.
26. Carrau, F. M., Medina, K., Farina, L., Boido, E., Henschke, P. A., & Dellacassa, E. (2008). Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: Effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Research*. 8, 1196-1207.
27. Carrau, F., Medina, K., Fariña, L., Boido, E., & Dellacassa, E. (2010). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* inoculum size on wine fermentation aroma compounds and its relation with assimilable nitrogen content. *International Journal of Food Microbiology*, 143(1-2), 81-85.

28. Charoenchai, C., Fleet, G. H., Henschke, P. A., & Todd, B. E. N. (1997). Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 3(1), 2-8.
29. Chotineeranat, S., Wansuksri, R., Piyachomkwan, K., Chatakanonda, P., Weerathaworn, P., & Sriroth, K. (2010). Effect of calcium ions on ethanol production from molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. *Sugar Tech*, 12(2), 120-124.
30. Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research*.
31. Ciani, M., & Ferraro, L. (1998) Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines *Journal of Applied Microbiology*, 85, 247-254.
32. Ciani, M., & Maccarelli, F. (1998). Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(2), 199-203.
33. Ciani, M., & Picciotti, G. (1995). The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotechnology Letters*, 17(11), 1247-1250.
34. Ciesarová, Z., Dömény, Z., Šmogrovičová, D., Pátková, J., Šturdík, E., & Ciesarova, Z. (1998). Comparison of ethanol tolerance of free and immobilized *Saccharomyces uvarum* yeasts. *Folia Microbiologica*, 43(1), 55-58.
35. Comi, G., Romano, P., Cocolin, L., & Fiore, C. (2001). Characterization of *Kloeckera apiculata* strains from the Friuli region in Northern Italy. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(4), 391-394.
36. Converti, A., Casagrande, M., De Giovanni, M., Rovatti, M., & Del Borghi, M. (1996). Evaluation of glucose diffusion coefficient through cell layers for the kinetic study of an immobilized cell bioreactor. *Chemical Engineering Science*, 51(7), 1023-1026.
37. Dashko, S., Zhou, N., Tinta, T., Sivilotti, P., Lemut, M. S., Trost, K., Piskur, J. (2015). Use of non-conventional yeast improves the wine aroma profile of Ribolla Gialla. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 997-1010.
38. Davies, R., Falkiner, E. A., Wilkinson, J. F., & Peel, J. L. (1951). Ester formation by yeasts. *The Biochemical Journal*, 49(1), 59-61.
39. De la Torre-González, F. J., Narváez-Zapata, J. A., López-y-López, V. E., & Larralde-Corona, C. P. (2016). Ethanol tolerance is decreased by fructose in *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. *LWT - Food Science and Technology*, 67, 1-7.
40. Demyttenaere, J. C. R., Sánchez Martínez, J. I., Verhé, R., Sandra, P., & De Kimpe, N. (2003). Analysis of volatiles of malt whisky by solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction. *Journal of Chromatography A*. 985, 221-232.
41. Díaz-Montañó, D. M., Favela-Torres, E., & Córdova, J. (2010). Improvement of growth, fermentative efficiency and ethanol tolerance of *Kloeckera africana* during the fermentation of agave tequilana juice by addition of yeast extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(2), 321-328.

42. Dragone, G., Mussatto, S. I., & Almeida e Silva, J. B. (2005). Immobilized Yeast on Lignocellulosic Carrier for Continuous Beer Production. *Brazilian Journal of Food Technology*, 5°SIPAL, 70-73.
43. Dragone, G., Mussatto, S. I., Oliveira, J. M., & Teixeira, J. A. (2009). Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chemistry*, 112(4), 929-935.
44. Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De Montigny, J., et al. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature*, 430(6995), 35-44.
45. Egli, C. M., Edinger, W. D., Mittrakul, C. M., & Henick-Kling, T. (1998). Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *Journal of Applied Microbiology*, 85(5), 779-789.
46. Eleutério dos Santos, C. M., Pietrowski, G. de A. M., Braga, C. M., Rossi, M. J., Ninow, J., Machado dos Santos, T. P., ... Nogueira, A. (2015). Apple Aminoacid Profile and Yeast Strains in the Formation of Fusel Alcohols and Esters in Cider Production. *Journal of Food Science*, 80(6), C1170–C1177.
47. Vidal, E. E., De Billerbeck, G. M., Simões, D. A., Schuler, A., François, J. M., & De Morais, M. A. (2013). Influence of nitrogen supply on the production of higher alcohols/esters and expression of flavour-related genes in cachaça fermentation. *Food Chemistry*, 138(1), 701-708.
48. Fairchild, A., Lee, M. D., & Maurer, J. J. (2006). PCR Basics. In J. Maurer (Ed.), *PCR Methods in Foods* (pp. 1–25). Boston, MA: Springer US.
49. Fleet, G. H. (1984). Evolution of Yeasts and Lactic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Bordeaux Wines, 48(5), 1034–1038.
50. Fleet, H. and Heard, G.M. (1993) Yeast-growth during fermentation. In *Wine Microbiology and Biotechnology* ed. Fleet, G. pp. 27–54. Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers.
51. Fleet, G. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 11–22.
52. Gaillardin, C., Heslot, H. (1987). La levure. *La Recherche* (188), 586-601.
53. Gamero, A., Tronchoni, J., Querol, A., & Belloch, C. (2013). Production of aroma compounds by cryotolerant *Saccharomyces* species and hybrids at low and moderate fermentation temperatures. *Journal of Applied Microbiology*, 114(5), 1405–1414.
54. Gamero, A., Belloch, C., Ibáñez, C., & Querol, A. (2014). Molecular analysis of the genes involved in aroma synthesis in the species *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and *S. bayanus* var. *uvarum* in winemaking conditions. *PLoS ONE*, 9(5), 1–10.
55. Garde-Cerdán, T., & Ancín-Azpilicueta, C. (2006). Contribution of wild yeasts to the formation of volatile compounds in inoculated wine fermentations. *European Food Research and Technology*, 222(1-2), 15–25.
56. Gethins, L., Guneser, O., Demirkol, A., Rea, M. C., Stanton, C., Ross, R. P., Yucer, Y., Morrissey, J. P. (2015). Influence of carbon and nitrogen source on production of volatile fragrance and flavour metabolites by the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast (Chichester, England)*, 32(1), 67–76.
57. Hiralal, L., Olaniran, A. O., & Pillay, B. (2014). Aroma-active ester profile of ale beer produced under different fermentation and nutritional conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(1), 57–64.

58. Hoppner, T. C., & Doelle, H. W. (1983). Purification and kinetic characteristics of pyruvate decarboxylase and ethanol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in relation to ethanol production. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, *17*, 152–157.
59. Iñiguez Muñoz, L. E. (2014). Tesis. Expresión de los genes ATF1, ATF2, EHT1 involucrados en las vías de síntesis de ésteres en levaduras durante la fermentación de tequila. Picyt. Ciatej.
60. Jeffries, T. W., Grigoriev, I. V., Grimwood, J., Laplaza, J. M., Aerts, A., Salamov, A., Schmutz, J., Lindquist E., Dehal, P., Shapiro H., Jin, Y. S., Passoth, V., & Richardson, P. M. (2007). Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nature Biotechnology*, *25*(3), 319–326.
61. Jiménez-Martí, E., Aranda, A., Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., & del Olmo, M. L. (2007). The nature of the nitrogen source added to nitrogen depleted vinifications conducted by a *Saccharomyces cerevisiae* strain in synthetic must affects gene expression and the levels of several volatile compounds. *Antonie van Leeuwenhoek*, *92*(1), 61–75.
62. Jolly, N. P., Augustyn, O. H. P., & Pretorius, I. S. (2003). The effect of Non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. *South African Journal of Enology and Viticulture*, *24*(2), 55–62.
63. Jolly, N. P., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: Non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, *14*(2), 215–237.
64. Kourkoutas, Y., Komaitis, M., Koutinas, A. A., Kaliafas, A., Kanellaki, M., Marchant, R., & Banat, I. M. (2003). Wine production using yeast immobilized on quince biocatalyst at temperatures between 30 and 0 °C. *Food Chemistry*, *82*(3), 353–360.
65. Kourkoutas, Y., Bekatorou, a, Banat, I. ., Marchant, R., & Koutinas, A.A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*, *21*(4), 377–397.
66. Kunkee, R. E. (1984). Selection and modification of yeasts and lactic acid bacteria for wine fermentation. *Food Microbiology*, *1*(4), 315–332.
67. Lachance, M. a. (1995). Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, *68*(2), 151–60.
68. Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizón-Gaviño, J., Herrera-Suárez, T., García-Mendoza, A., & Gschaedler-Mathis, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Research*, *8*(7), 1037–52
69. Leveau J.Y., (2000) Microbiología industrial: los microorganismos de interes industrial. *Editorial Acribia*.
70. Mamede, M. E. O., Cardello, H. M. A. B., & Pastore, G. M. (2005). Evaluation of an aroma similar to that of sparkling wine: Sensory and gas chromatography analyses of fermented grape musts. *Food Chemistry*, *89*(1), 63–68.
71. Mason, a B., & Dufour, J. P. (2000). Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast (Chichester, England)*, *16*(14), 1287–98.
72. Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, *31*(3), 426–428.
73. Molina, A. M., Swiegers, J. H., Varela, C., Pretorius, I. S., & Agosin, E. (2007). Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *77*(3), 675–87.

74. Molina, A. M., Guadalupe, V., Varela, C., Swiegers, J. H., Pretorius, I. S., & Agosin, E. (2009). Differential synthesis of fermentative aroma compounds of two related commercial wine yeast strains. *Food Chemistry*, *117*(2), 189–195.
75. Moreira, N., Mendes, F., Hogg, T., & Vasconcelos, I. (2005). Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, *103*(3), 285–94.
76. Morgan, P. H., Mercer, L. P., & Flodin, N. W. (1975). General model for nutritional responses of higher organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *72*(11), 4327–4331.
77. Nabais, R. C., Sá-Correia, I., Viegas, C. a, & Novais, J. M. (1988). Influence of Calcium Ion on Ethanol Tolerance of *Saccharomyces bayanus* and Alcoholic Fermentation by Yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, *54*(10), 2439–46.
78. Niewerth, M., Kunze, D., Seibold, M., Schaller, M., Korting, H. C., & Hube, B. (2003). Ciclopirox olamine treatment affects the expression pattern of *Candida albicans* genes encoding virulence factors, iron metabolism proteins, and drug resistance factors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *47*(6), 1805–1817.
79. NORMA Oficial Mexicana NOM-006-S CFI-2012, Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones. Secretaría de Economía. (2012).
80. Peel, J. L. (1951). Ester formation by yeasts. 2. Formation of ethyl acetate by washed suspensions of *Hansenula anomala*. *The Biochemical Journal*, *49*(1), 62–7.
81. Plata, C., Millán, C., Mauricio, J., & Ortega, J. (2003). Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiology*, *20*(2), 217–224.
82. Procopio, S., Sprung, P., & Becker, T. (2015). Effect of amino acid supply on the transcription of flavour-related genes and aroma compound production during lager yeast fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, *63*(1),
83. Rapp, A., & Mandery, H. (1986). Wine aroma. *Experientia*, *42*(8), 873–884.
84. Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F., & Manzanares, P. (2001). Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, *70*(3), 283–9.
85. Rollero, S., Bloem, A., Camarasa, C., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J. M., Mouret, J. R. (2015). Combined effects of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(5), 2291–2304.
86. Romancino, D. P., Di Maio, S., Muriella, R., & Oliva, D. (2008). Analysis of non-*Saccharomyces* yeast populations isolated from grape musts from Sicily (Italy). *Journal of Applied Microbiology*, *105*(6), 2248–2254.
87. Romano, P., Suzzi, G., Domizio, P., & Fatichenti, F. (1997). Secondary products formation as a tool for discriminating non-*Saccharomyces* wine strains. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *71*(3), 239-242.
88. Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., & Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, *86*(1-2), 169–180.
89. Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., & Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, *86*(1-2), 169–180.
90. Saerens, S. M. G., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., & Delvaux, F. R. (2008). Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(2), 454–61.

91. Sharma, A. K., Singh, P. N., & Sawant, S. D. (2011). Evaluation of Fermentation Efficiency of Yeast Strains and their Effect on Quality of Young Wines. *Indian Journal of Microbiology*, 52(3), 495–499.
92. Shiotani, T., & Yaman, T. (1981). A Horizontal Packed-Bed Bioreactor to Reduce CO<sub>2</sub> Gas Holdup in the Continous Production on Ethanol by Immobilized Yeast Cells. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 13, 96–101.
93. Soyuduru, D., Ergun, M., & Tosun, A. (2009). Application of a statistical technique to investigate calcium, sodium, and magnesium ion effect in yeast fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152(2), 326–33.
94. Stanbury, P F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2003). Principles of Fermentation Technology. Butterworth-Heinemann Elsevier Publishing: Oxford.
95. Taillandier, P., Ramon Portugal, F., Fuster, A., & Strehaiano, P. (2007). Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. *Food Microbiology*, 24(1), 95–100.
96. Taillandier, P., Lai, Q. P., Julien-Ortiz, A., & Brandam, C. (2014). Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: Influence of inoculation and nitrogen content. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(7), 1959–1967.
97. Tapia-Tussell, R., Lappe, P., Ulloa, M., Quijano-Ramayo, A., Cáceres-Farfán, M., Larqué-Saavedra, A., & Perez-Brito, D. (2006). A Rapid and Simple Method for DNA Extraction From Yeasts and Fungi Isolated From *Agave fourcroydes*. *Molecular Biotechnology*, 33, 67–70.
98. Teste, M.-A., Duquenne, M., François, J. M., & Parrou, J.-L. (2009). Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Molecular Biology*, 10, 99.
99. Torrea, D., Varela, C., Ugliano, M., Ancin-Azpilicueta, C., Leigh Francis, I., & Henschke, P. a. (2011). Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice – Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Food Chemistry*, 127(3), 1072–1083.
100. Tringe, S. G., Willis, J., Liberatore, K. L., & Ruby, S. W. (2006). The WTM genes in budding yeast amplify expression of the stress-inducible gene RNR3. *Genetics*, 174(3), 1215–1228.
101. Tristezza, M., Fantastico, L., Vetrano, C., Bleve, G., Corallo, D., Grieco, F., Mita, G., Grieco, F. (2014). Molecular and Technological Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Natural Fermentation of Susumaniello Grape Must in Apulia, Southern Italy. *International Journal of Microbiology*, 2014(897428), 1–11.
102. Vaudano, E., Noti, O., Costantini, A., & Garcia-Moruno, E. (2011). Identification of reference genes suitable for normalization of RT-qPCR expression data in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Biotechnology Letters*, 33(8), 1593–1599.
103. Vedenov, D., & Pestit, G. M. (2008). A comparison of methods of fitting several models to nutritional response data. *Journal of Animal Science*, 86(2), 500–507.
104. Verbelen, P. J., De Schutter, D. P., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., & Delvaux, F. R. (2006). Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnology Letters*, 28(19), 1515–25.
105. Verstrepen, K. J., Laere, S. D. M. Van, Vanderhaegen, B. M. P., Derdelinckx, G., Dufour, J., Pretorius, I. S., Winderickx, J., Thevelin J. M., & Delvaux, F. R. (2003). Expression Levels of the Yeast Alcohol Acetyltransferase Genes ATF1 , Lg-ATF1 , and ATF2 Control the Formation of a Broad Range of Volatile Esters. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5228–5237.

106. Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I. S., & Henschke, P. a. (2007). Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(1), 145–57.
107. Walker, G. M., Birch, R. M., Chandrasena, G., & Maynard, a I. (1996). Magnesium, calcium, and fermentative metabolism in industrial yeasts. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 54(1), 13–18.
108. Walker, G. M. (1994). The roles of magnesium in biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*, 14(4), 311–54.
109. Walker, G. M. (2004). Metals in yeast fermentation processes. *Advances in Applied Microbiology*, 54, 197–229.
110. Willetts, A. (1989). Ester formation from ethanol by *Candida pseudotropicalis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 56(2), 175–180.
111. Winsor, C. P. (1932). The Gompertz Curve as a Growth Curve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 18(1), 1–8.
112. Yamada, M. (1927). On the mechanism of the fruit-ester formation by *Willia anomala* sp. *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan*, 3, 73–76.
113. Yoshioka, K., & Hashimoto, N. (1984). Ester Formation by Brewers' Yeast during Sugar Fermentation. *Agric. Biol. Chem.*, 48(2), 333–340.
114. Zhao, J., & Xia, L. (2010). Ethanol production from corn stover hemicellulosic hydrolysate using immobilized recombinant yeast cells. *Biochemical Engineering Journal*, 49(1), 28–32.
115. Zhu, J., Lin, J.-L., Palomec, L., & Wheeldon, I. (2015). Microbial host selection affects intracellular localization and activity of alcohol-O-acetyltransferase. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1–10.