



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE DOS
ESPECIES DE LEVADURA, AISLADAS DE LA
PRODUCCIÓN NATURAL DEL SOTOL,
DURANTE UNA FERMENTACIÓN MIXTA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

RUT ELISABET LARA VERJAN



CDMX

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: AGUSTIN REYO HERRERA

VOCAL: FRANCISCO RUIZ TERAN

SECRETARIO: ALEIDA MINA CETINA

1er. SUPLENTE: MIRANDA MARTINEZ INES

2do. SUPLENTE: SANDOVAL GUILLEN BERTHA JULIETA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 321 DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y
ALIMENTOS, CONJUNTO "E", FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DR. FRANCISCO RUIZ TERAN

SUSTENTANTE:

RUT ELISABET LARA VERJAN

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por la beca otorgada en el periodo agosto-diciembre de 2019, a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), mediante el proyecto IN216618.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), que mediante el proyecto CONACyT CB-2015-01-258436, contribuyó en la compra de material de laboratorio para el desarrollo del proyecto.

ÍNDICE GENERAL

Índice de Figuras y Esquemas	III
Índice de Tablas	IV
Índice de Gráficas	V
1. Introducción	1
2. Fundamentos teóricos	4
2.1 Definición y características generales del Sotol.....	4
2.1.1 Origen del Sotol	6
2.1.2 Microbiota presente encontrada en Sotol.....	6
2.1.3 Compuestos congénéricos encontrados en Sotol.	7
2.2 Levaduras. Definición y características generales.	7
2.3 Fermentación alcohólica.....	8
2.3.1 Producción de etanol a partir de azúcares	10
2.3.2 Producción de glicerol.....	11
2.4 Levaduras <i>Saccharomyces</i> y no- <i>Saccharomyces</i>	12
2.4.1 Levaduras <i>Saccharomyces</i>	12
2.4.2 Levaduras no- <i>Saccharomyces</i>	12
2.4.3 Principales características que aportan las levaduras no- <i>Saccharomyces</i> a las bebidas alcohólicas fermentadas.....	13
2.5 Características generales de <i>Torulaspora delbrueckii</i>	14
2.6 Características generales de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
2.7 Cultivos iniciadores mixtos.	16
2.7.1 Fermentación mixta de <i>Torulaspora delbrueckii</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . 17	
2.7.2 Uso de cultivos iniciadores mixtos en vinos.	18
2.7.3 Uso de cultivos iniciadores mixtos en cerveza.	20
2.8 Compuestos Congénéricos.	20
2.8.1 Bioquímica de la producción de alcoholes superiores.....	21
2.8.2 Aplicaciones de algunos compuestos aromáticos.	23
2.8.3 Bioquímica de la producción de ésteres.....	25
2.9 Fuentes de nitrógeno en el mosto	26
2.9.1 Metabolismo del nitrógeno en la fermentación.	27
3. Hipótesis	29
4. Objetivos	29
5. Justificación	30

6. Materiales y Métodos.....	31
6.1 Obtención de las levaduras.	31
6.2 Reactivación de las cepas.....	31
6.2.1 Realización del respaldo	31
6.2.2 Preparación del inóculo.....	32
6.3 Medio de fermentación M11.	32
6.3.1 Condiciones de fermentación y análisis.	32
6.4 Evaluación del crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Torulaspota delbrueckii</i> en medio M11.	33
6.5 Determinación del consumo de azúcar durante la fermentación en medio M11.	33
6.6 Cuantificación de etanol y glicerol durante la fermentación en medio M11.....	34
6.7 Preparación de las muestras.	34
6.8 Preparación de los estándares.	34
6.8.1 Preparación de las curvas patrón.....	35
6.9 Determinación y cuantificación de compuestos congénicos al final de la fermentación en medio M11.	35
7. Estrategia Experimental.....	37
8. Resultados y Discusión	38
8.1 Aislamiento en Agar YPD y caracterización de colonias.....	38
8.2 Observación microscópica de las especies de levadura.....	39
8.3 Determinación de Sólidos Solubles durante la fermentación.	40
8.4 Determinación de consumo de azúcar durante la fermentación.	43
8.5 Análisis del crecimiento microbiológico a lo largo de la fermentación.	48
8.6 Cuantificación de la producción de etanol a lo largo de la fermentación, mediante HPLC	52
8.7 Cuantificación de la producción de glicerol a lo largo de la fermentación, mediante HPLC	57
8.8 Determinación y cuantificación de compuestos congénicos al final de la fermentación.	60
8.8.1 Cuantificación de alcoholes superiores encontrados al final de la fermentación, mediante cromatografía de gases.....	60
8.8.2 Cuantificación de ésteres encontrados al final de la fermentación, mediante cromatografía de gases.	66
9. Conclusiones	72
10. Perspectivas.....	73
11. Bibliografía.....	74

ANEXO I.....	85
ANEXO II.....	90

Índice de Figuras y Esquemas

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Dasyilirion spp.</i>	4
Figura 2. Estados donde se produce el Sotol en México.....	5
Figura 3. Aspectos de la calidad del vino que pueden modularse mediante el uso de levaduras no- <i>Saccharomyces</i>	19
Figura 4. Fermentación de medio M11, con trampa de aire y tubo de fermentación sostenido por soporte con cadena.	33
Figura 5. Crecimiento de colonias puras en Agar YPD a las 48h de incubación, a la izquierda se observan las correspondientes a <i>S. cerevisiae</i> cepa <i>SCH2</i> y a la derecha las colonias de <i>T. delbrueckii</i>	38
Figura 6. Observación al microscopio, aumento de 40X, especie <i>S. cerevisiae</i> cepa <i>SCH2</i> , medio YPD, 48h de incubación a 37°C.....	39
Figura 7. Observación al microscopio, aumento de 40X, especie <i>T. delbrueckii</i> , medio YPD, 48h de incubación a 37°C	39

Índice de Esquemas

Esquema 1. Bioquímica de la producción de etanol a partir de azúcares.	11
Esquema 2. La ruta de Ehrlich	22
Esquema 3. Síntesis de éster por levadura	25
Esquema 4. Estrategia experimental utilizada en el proyecto	37

Índice de Tablas

Tabla 1. Algunas especies de levaduras comercializadas para uso enológico.....	19
Tabla 2. °Brix respecto al tiempo en las 3 fermentaciones en medio M11	41
Tabla 3. °Brix respecto al tiempo en las 3 fermentaciones en medio M11 con fenilalanina	42
Tabla 4. Porcentaje de consumo de fructosa en cada fermentación en medio M11.	45
Tabla 5. Porcentaje de consumo de fructosa en cada fermentación en medio M11 con fenilalanina como fuente orgánica de nitrógeno.	47
Tabla 6. Rendimiento de etanol de las fermentaciones efectuadas en medio M11 y M11 con fenilalanina	54

Índice de Gráficas

Gráfico 1. Consumo de fructosa en ($\mu\text{g}/\text{mL}$) con respecto al tiempo durante las 3 fermentaciones en medio M11.	44
Gráfico 2. Consumo de fructosa en ($\mu\text{g}/\text{mL}$) con respecto al tiempo durante las 3 fermentaciones en medio M11 con fenilalanina.	46
Gráfico 3. Concentración celular a lo largo de las 3 fermentaciones en medio M11.	48
Gráfico 4. Concentración celular a lo largo de las 3 fermentaciones en medio M11 con fenilalanina.	50
Gráfico 5. Concentración de etanol en ($\mu\text{L}/\text{mL}$) con respecto al tiempo de las tres fermentaciones en medio M11.	52
Gráfico 6. Concentración de etanol en ($\mu\text{L}/\text{mL}$) con respecto al tiempo de las tres fermentaciones en medio M11 con fenilalanina.	53
Gráfico 7. Producción de glicerol en ($\mu\text{L}/\text{mL}$) con respecto al tiempo de las tres fermentaciones en medio M11.	57
Gráfico 8. Producción de glicerol en ($\mu\text{L}/\text{mL}$) con respecto al tiempo de las tres fermentaciones en medio M11 con fenilalanina.	59
Gráfico 9. Concentración en ($\mu\text{L}/\text{L}$) de los alcoholes superiores encontrados al final de cada fermentación en medio M11.	61
Gráfico 10. Concentración en ($\mu\text{L}/\text{L}$) de los alcoholes superiores encontrados al final de cada fermentación en medio M11 con fenilalanina.	61

Gráfico 11. Concentración de los ésteres de acetato en ($\mu\text{L/L}$) encontrados al final de cada fermentación en medio M11. 67

Gráfico 12. Concentración de los ésteres de acetato en ($\mu\text{L/L}$) encontrados al final de cada fermentación en medio M11 con fenilalanina. 67

1. Introducción

El sotol es una bebida alcohólica destilada, obtenida a partir de la fermentación de las piñas o cabezas de la planta silvestre perteneciente al género *Dasyilirion spp*, nativa de zonas desérticas al norte de México, esta zona compartida por los estados de Chihuahua, Coahuila y Durango (IMPI, 2002; De la Garza *et al.*, 2008).

En proyectos anteriores se aislaron 2 especies de levadura diferentes, a partir de la fermentación natural del Sotol (Franco, 2018). Las especies de levadura que se aislaron son *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii*. Estas dos especies de levadura se utilizaron como cultivos iniciadores para el presente proyecto. El aislamiento de nuevos cultivos iniciadores provenientes de matrices naturales se ha propuesto por Marongiu *et al.* (2015), como un método para incrementar el perfil aromático de las fermentaciones.

Existen indicios de que el empleo de mezclas de levadura como cultivos iniciadores puede suponer más ventajas de las que se pensaba, al conseguir arranques de fermentación más sólidos y eficientes. En cualquier caso, el estudio de las interacciones entre los cultivos iniciadores utilizados en la misma fermentación va a ser para mejorar el control de la fermentación en estas nuevas condiciones (Tronchoni *et al.*, 2017).

Durante la fermentación de bebidas alcohólicas intervienen principalmente levaduras del género *Saccharomyces*. Sin embargo, existen otros géneros de levaduras que también participan en los procesos fermentativos, estas son las levaduras denominadas no-*Saccharomyces*, las cuales mediante la producción de congénicos, enzimas y proteínas pueden enriquecer organoléptica y nutricionalmente las bebidas alcohólicas (Casas, 2015).

El uso de cultivos iniciadores, que combinen cepas de levaduras no-*Saccharomyces* con cepas de *S. cerevisiae*, se postula como una alternativa a la recuperación de la variabilidad que existe en los cultivos “naturales” durante fermentaciones espontaneas. Por otra parte, al manipular la cantidad y género de levaduras no-

Saccharomyces durante la fermentación se pueden producir bebidas alcohólicas con parámetros de calidad de aroma y sabor que cumplan con las expectativas del consumidor (Tronchoni *et al.*, 2017). Se ha reportado que el uso de no-*Saccharomyces* en los procesos de fermentación puede incrementar parámetros de calidad (Benito, 2018).

En general, los criterios de selección de cepas de levaduras no-*Saccharomyces* para el desarrollo de estos nuevos cultivos iniciadores se basan en su comportamiento en cultivos puros, ya sea en medios sintéticos o en mostos naturales. Estos estudios, que son necesarios en una primera fase de cualquier proceso de selección, permiten obtener una primera impresión de las potencialidades de las levaduras. Sin embargo, en condiciones reales de utilización, se van a producir interacciones entre las diferentes levaduras implicadas. Estas interacciones no solo afectan a la dinámica de poblaciones, sino a los metabolitos que se producen. Y tampoco son unidireccionales, sino que tanto *S. cerevisiae* como las no-*Saccharomyces* pueden modificar su perfil metabólico cuando participan en la misma fermentación. Por lo tanto, es necesario tener en cuenta estas posibilidades en el desarrollo de nuevas levaduras comerciales, así como conocer la compatibilidad entre cepas o especies de levaduras, o al menos cuáles son las consecuencias de su utilización conjunta, más allá de las potencialidades que se aprecian cuando se utilizan por separado (Tronchoni *et al.*, 2017).

La finalidad de este proyecto es analizar la interacción que existe entre estas 2 levaduras, por medio de fermentaciones mixtas e individuales en un medio sintético, de las cuales se evaluaron las diferencias en el consumo de azúcares, crecimiento microbiano, y en la cuantificación de diferentes compuestos obtenidos de la fermentación, principalmente compuestos congenéricos.

A los compuestos químicos relacionados con el sabor y aroma de la bebida se les denomina congenéricos y tienen la peculiaridad de encontrarse en muy bajas concentraciones, comparados con el etanol producido (Casas, 2015). Las bebidas alcohólicas son apreciadas y diferenciadas por la presencia de los compuestos congenéricos.

Posteriormente se realizaron las mismas fermentaciones, pero con una fuente de nitrógeno diferente, con lo cual se evaluaron las diferencias entre una fuente y otra. Debido a que la concentración y tipo de nitrógeno es fundamental para la composición final del medio (Zumárraga y Barbero, 2014), ya que las fuentes nitrogenadas del mosto (amonio y aminoácidos) son precursores aromáticos, determinando igualmente la calidad aromática (Mas *et al.*, 2013). A su vez, el contenido de nitrógeno condiciona la realización de la fermentación alcohólica, tanto en su velocidad como en su culminación (Thaillandier *et al.* 2007).

De esta manera, se determinó si la interacción entre estas dos levaduras es favorable o no, para utilizarse posteriormente de forma conjunta en fermentaciones mixtas, lo cual podría contribuir al desarrollo de nuevos productos. Las posibles interacciones sinérgicas entre diferentes levaduras pueden proporcionar una herramienta para la aplicación de las nuevas tecnologías de fermentación (Viramontes y Pérez, 2014).

2. Fundamentos teóricos

2.1 Definición y características generales del Sotol.

El Sotol es una bebida alcohólica, obtenida a partir de la destilación de mostos fermentados de cabezas o piñas de la planta con el mismo nombre sotol o sereque (De la Garza *et al.*, 2008). Esta planta pertenece al género *Dasyllirion spp.*, y forma parte de la familia de las liliáceas, de hojas largas y fibrosas, de forma lanceolada, de color verde, cuya parte aprovechable para la elaboración del Sotol, es la piña o cabeza. (Figura 1). Estas plantas son obtenidas de poblaciones naturales y cultivadas en los estados de Chihuahua, Coahuila y Durango. (IMPI, 2002)



Figura 1. *Dasyllirion spp.*

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-159-SCFI-2004, Bebidas alcohólicas-Sotol-Especificaciones y métodos de prueba. El sotol se define como:

“Bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos, preparados directa y originalmente del material extraído, dentro de las instalaciones de la fábrica ubicada dentro de la denominación de origen, derivado de la molienda de las cabezas maduras de *Dasyllirion spp.*, previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas, y sometidos a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, siendo susceptible de ser enriquecido por otros azúcares hasta en una proporción no mayor de 49%, en la inteligencia de que en esta acción o mezcla no están permitidas las mezclas en frío. El sotol es un líquido que, de acuerdo a su tipo, es

incoloro o amarillento cuando es madurado en recipientes de madera de roble, encino, acacia, castaño, haya, fresno, u otras alternativas tecnológicas, o cuando se aboque sin madurarlo.”

Es importante mencionar que la Norma Oficial Mexicana NOM-159-SCFI-2004, establece que puede ser enriquecido por otros azúcares hasta en una proporción no mayor de 49%, refiriéndose a ser enriquecido con otros azúcares fermentables, ya que de acuerdo con el Reglamento Sanitario de Bebidas Alcohólicas emitido por la Secretaria de Salubridad y Asistencia, se permitirá la adición de azúcares para reforzar la cantidad de hidratos de carbono fermentables contenidos en el jugo de las “cabezas” o “piñas” cocidas. Y de acuerdo con esto el Sotol deberá tener una concentración alcohólica entre 38° y 55° G.L.

Es importante destacar que el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) otorgó la Denominación de Origen a esta bebida en el año 2002, declarando su origen en la zona geográfica que abarca todos y cada uno de los municipios que conforman los estados de Chihuahua, Coahuila y Durango (IMPI, 2002).



Figura 2. Estados donde se produce el Sotol en México.

El sotol contiene carbohidratos simples, tales como glucosa, fructosa, así como carbohidratos complejos como una serie de fructooligosacáridos que desempeñan un papel relevante en el proceso de fermentación (De la Garza *et al.*, 2008).

2.1.1 Origen del Sotol

Existen vestigios que el Sotol ha sido fabricado en el estado de Chihuahua desde hace más de 800 años por los pobladores del Paquimé, después de las diferentes tribus de indígenas como son los anasazis, los tarahumaras, los tobosos y los apaches, siguiéndolos los españoles quienes implantaron métodos de destilación más eficaces y desde entonces a la fecha por los pobladores de dicho territorio. (IMPI, 2002)

2.1.2 Microbiota presente encontrada en Sotol.

En un estudio de la microbiota presente en diferentes etapas de la producción del Sotol De la Garza *et al.* (2008) identificó a 2 especies de levadura: *S. cerevisiae* y a *Protatheca sp.*, estas encontradas después de la cocción de las piñas durante el “majado”, cabe mencionar que al final de la fermentación solo se detectó a *S. cerevisiae*.

De igual forma, en las primeras etapas de la fermentación se identificó a 4 diferentes tipos de bacterias Gram negativo: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Acetobacter sp.* y *Bacillus deiformis*.

Después de la cocción, en el “majado” y durante la fermentación se encontró la presencia de un hongo: *Mucor circinelloides*.

También se ha descrito la presencia de levaduras no-*Saccharomyces* en el Sotol donde se han encontrado como mayoritarias a *Kluyveromyces marxianus* y a *Torulaspora delbrueckii*, y con una menor presencia a *Candida sp.* y *Pichia sp.* (Sobrino, 2019).

Es importante señalar que el Sotol es una bebida destilada por lo que la microbiota descrita en este estudio se presenta en las etapas previas a la destilación, es decir,

después de la cocción de las piñas, durante la etapa denominada “majado” y a lo largo de la fermentación.

2.1.3 Compuestos congénéricos encontrados en Sotol.

Algunos de los compuestos superiores detectados en el jugo de fermentación del sotol son: 2-fenil etanol, limoneno, isoamil acetato, alcohol isoamílico, 3-metil 2-butanol, 4-metil 1-butanol, metanol, hexanol, etil acetato, ciclopentanona, fenil acetato, propanol, y acetato de geranilo (Flores *et al.*, 2019).

Se han estudiado los compuestos aromáticos de bebidas étnicas mexicanas como el tequila, mezcal y sotol. Los resultados muestran una gran cantidad de ésteres, alcoholes, ácidos, algunas cetonas, aldehídos y algunos furanos. Específicamente en el sotol se han encontrado los siguientes componentes: 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol, ácido octanoico, ácido acético, fenil etanol y butirolactona. (López y Guevara, 2001).

2.2 Levaduras. Definición y características generales.

Las levaduras se pueden definir como hongos unicelulares, eucariotas, con estados vegetativos que se reproducen predominantemente por gemación o fisión. Mientras que muchas especies de levaduras son siempre unicelulares, otras son dimórficas o bifásicas, es decir, pueden crecer como micelio en condiciones ambientales apropiadas de nutrientes o temperatura (Latisnere *et al.*, 2006).

Las levaduras forman sobre los medios de cultivo colonias pastosas, constituidas por células aisladas que suelen ser esféricas, ovoideas, elipsoideas o alargadas. Unas pocas presentan hifas. Las dimensiones pueden oscilar de 1 a 9 μm de ancho y 2 a más de 20 μm de longitud según la especie, nutrición, edad y otros factores. (UNSA, 2007)

Las levaduras son oxidativas, fermentativas, o bien su actividad metabólica es a la vez de ambos tipos. (Camacho *et al.*, 2009). Las levaduras pueden cambiar su metabolismo de oxidativo a fermentativo por lo que se les incluye en el grupo de aerobios facultativos (Ochoa, 2004).

Son organismos heterótrofos, por lo tanto, requieren de carbono orgánico para obtener energía y para la síntesis de sus componentes celulares. Sin embargo, los requerimientos nutricionales pueden variar entre las diferentes especies de levadura. (Sobrino, 2019)

Los constituyentes macromoleculares de las levaduras incluyen proteínas, glicoproteínas, polisacáridos, polifosfatos, lípidos y ácidos nucleicos. (Walker, 1998)

2.3 Fermentación alcohólica

Las células de levadura se emplean a menudo en procesos de fermentación industrial por su capacidad para convertir de manera eficiente altas concentraciones de azúcares en etanol y dióxido de carbono. Además, las células fermentadoras de levadura con los nutrientes apropiados producen una amplia gama de otros compuestos, incluyendo varios alcoholes superiores, compuestos carbonílicos, compuestos fenólicos, derivados de ácidos grasos y compuestos de azufre. Curiosamente, muchos de estos metabolitos secundarios son volátiles y tienen aromas picantes que son vitales para la calidad del producto (Dzialo *et al.*, 2017).

La fermentación alcohólica es una bioreacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono. La conversión se representa mediante la ecuación:



A pesar de parecer, a nivel estequiométrico, una transformación simple, la secuencia de transformaciones para degradar el azúcar hasta dos moléculas de alcohol y dos moléculas de bióxido de carbono es un proceso muy complejo, pues al mismo tiempo la levadura utiliza el azúcar y nutrientes adicionales para reproducirse (Vázquez y Dacosta, 2007).

En condiciones de estrés (baja concentración de oxígeno) es llevada a cabo la fermentación alcohólica, lo que genera etanol y otros compuestos de importancia sensorial en la bebida como: glicerol, ácido acético, ésteres, acetoínas, 1-propanol e isopropanol (Waldir *et al.*, 2012).

El metabolismo de azúcares produce otros muchos subproductos derivados de rutas secundarias que usan intermediarios de la degradación de azúcares como por ejemplo glicerol, acetaldehído, ácido acético (que contribuye a la acidez volátil), diacetilo, ácido succínico (y en menor medida los ácidos tartárico, málico y láctico), compuestos volátiles como monoterpenos o los ésteres que contribuyen a los aromas frutales y florales o compuestos no volátiles como los ácidos grasos y los alcoholes superiores (Zumárraga y Barbero, 2014).

En términos generales, la producción de compuestos de importancia sensorial depende de la especie y cepa de levadura y de las condiciones de fermentación (Rojas *et al.*, 2001). Los parámetros como temperatura, nivel de oxígeno, concentración y tipo de nutrientes son claves en la fermentación. Estos factores pueden controlarse para influir positivamente sobre la calidad de la bebida y sobre el rendimiento del proceso (Leal *et al.*, 2014).

La temperatura de fermentación afecta tanto el tiempo del proceso así como la concentración final de etanol ya que controla la cantidad de azúcares consumidos por la levadura, así como también puede afectar las propiedades organolépticas de la bebida (Liu *et al.*, 2014).

El control de la aireación del medio de fermentación puede ser usado para controlar la síntesis de compuestos químicos de impacto sensorial en la producción de bebidas fermentadas. La aireación del medio controla la producción de compuestos de la fermentación como glicerol, etanol, alcoholes superiores, ésteres y ácido acético. En estudios (Waldir *et al.*, 2007; Waldir *et al.*, 2012; Waldir *et al.*, 2014) con levaduras no-*Saccharomyces* ha reportado que el oxígeno incrementa la producción de alcoholes superiores, pero por otro lado disminuye la producción de etil acetato y glicerol. Por lo que la síntesis de estos compuestos puede ser controlado ajustando la aireación.

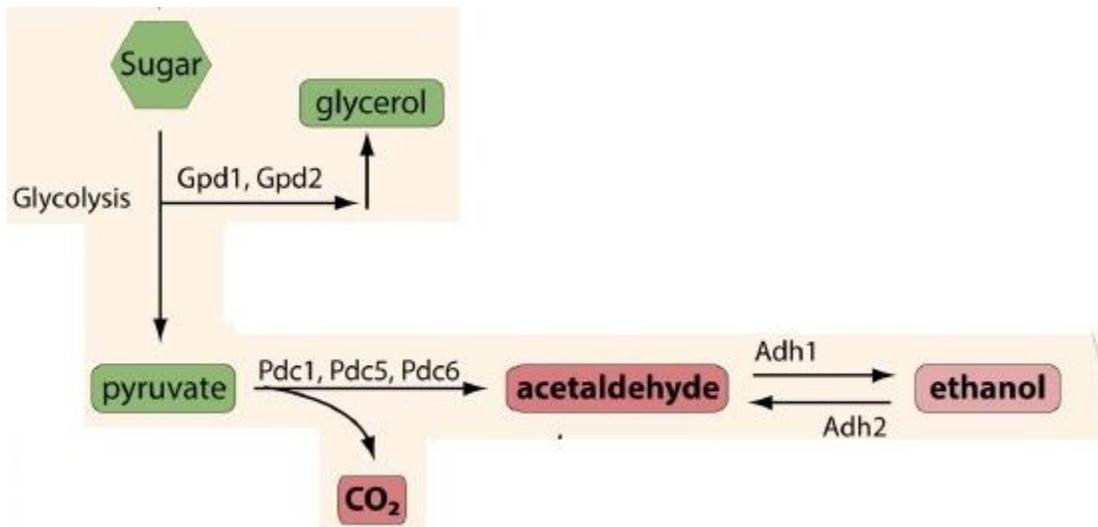
Por otro lado, la concentración y tipo de nutrientes en el mosto afectan la producción de compuestos aromáticos (Saerens *et al.*, 2008), especialmente la relación carbono-nitrógeno, la interacción entre ambos factores puede incidir significativamente sobre la formación de estos compuestos; es decir, cada cepa puede tener un perfil de síntesis para determinados alcoholes superiores,

dependiendo de las condiciones nutricionales del mosto (altas o bajas relaciones C: N) (Borroto et al., 2017).

2.3.1 Producción de etanol a partir de azúcares

En muchos procesos de fermentación industrial, el etanol es el compuesto más importante producido por las levaduras. Además, es la producción de este metabolito primario lo que originalmente despertó el interés por la fermentación de bebidas. El etanol es un compuesto aromático volátil, que tiene un papel vital en la fermentación de bebidas y también se utiliza como un biocombustible renovable en la industria. Dado el papel central del etanol en la fermentación alcohólica muchas investigaciones se han centrado en mejorar la velocidad y eficiencia de la producción de alcohol por levaduras en las últimas décadas, especialmente en la industria del bioetanol (Dzialo *et al.*, 2017). Curiosamente también hay una nueva tendencia hacia las bebidas fermentadas con contenido reducido de etanol (Wilkinson y Jiranck, 2013). Esto es impulsado por la creciente demanda de consumidores y productores para reducir los problemas asociados con los niveles de alcohol. Ya que demasiado etanol puede comprometer la calidad del producto y el consumo excesivo de alcohol se asocia con varios problemas de salud (Dzialo *et al.*, 2017).

El metabolismo central comienza con la conversión básica de azúcares en piruvato, produciendo energía en forma de ATP. La levadura asimila los azúcares fermentables del medio y los convierte en glicerol o piruvato a través de la glucólisis. La conversión de piruvato a etanol es un proceso de dos pasos. Primero, el piruvato se convierte en acetaldehído por una piruvato descarboxilasa (PDC), liberando dióxido de carbono como residuo. El acetaldehído se convierte posteriormente en etanol por medio de una alcohol deshidrogenasa (ADH) (Dzialo *et al.*, 2017). Es importante mencionar que estos metabolitos son generados por medio de una vía anaerobia. **(Esquema 1)**



Esquema 1. Bioquímica de la producción de etanol a partir de azúcares.

(Tomado de Dzialo *et al.*, 2017).

2.3.2 Producción de glicerol

El glicerol es un alcohol con tres grupos hidroxilos, que brinda un sabor dulce y da cuerpo a la bebida fermentada (Escalante *et al.*, 2012).

No es volátil, ni contribuye al aroma, pero si a su suavidad y viscosidad. El glicerol es el producto mayoritario originado por las levaduras después del etanol y anhídrido carbónico (Gardner *et al.*, 1993).

El glicerol es producido por la célula por la reducción de la dihidroxiacetona-fosfato a glicerol-fosfato en una reacción que implica la oxidación de NADH a NAD, seguida de la desfosforilación a glicerol. Se forma en los primeros momentos de la fermentación alcohólica. Su formación juega un papel muy importante en el mantenimiento del equilibrio redox en la célula. En ocasiones, es producido como respuesta al estrés osmótico, pudiendo ser estimulada su producción en presencia de altas concentraciones iniciales de azúcar (Mairoella *et al.*, 1984). Además, la producción de glicerol por *S. cerevisiae* depende de otros factores como la temperatura de fermentación, cantidad de nitrógeno del medio, cantidad de SO₂, aireación, acidez del mosto y finalmente la cepa de levadura utilizada (Lozano y Muñoz, 1988; Gardner *et al.*, 1993).

2.4 Levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*

Durante la fermentación de bebidas alcohólicas intervienen principalmente levaduras del género *Saccharomyces*. Sin embargo, existen otros géneros de levaduras que también participan en los procesos fermentativos, y rara vez son tomados en cuenta, estas son las levaduras denominadas no-*Saccharomyces*, las cuales mediante la producción de congenéricos, enzimas y proteínas pueden enriquecer organoléptica y nutricionalmente las bebidas alcohólicas, lo que ayudaría a satisfacer el paladar de los consumidores más exigentes.

2.4.1 Levaduras *Saccharomyces*

La palabra *Saccharomyces* viene del latín *Saccharo* que significa azúcar, y *myces* que significa hongo (Hernández, 1999).

Las especies de *Saccharomyces* son reconocidas por su capacidad para la vigorosa fermentación anaeróbica, o semi-anaeróbica, de uno o más azúcares para producir etanol, estos azúcares incluyen D-glucosa, D-fructosa y D-manosa. Casi todas las cepas de las especies de *Saccharomyces* pueden utilizar D-galactosa, aeróbica y anaeróticamente. Sin embargo, no utilizan lactosa ni pentosas o polisacáridos. Tampoco utilizan nitrato como fuente de nitrógeno, ni citrato como fuente de carbono para el crecimiento aeróbico (Barnett, 1992).

2.4.2 Levaduras no-*Saccharomyces*

Las levaduras tipo no-*Saccharomyces* engloba a todas aquellas levaduras de diferentes géneros que están presentes en el mosto durante las primeras fases de la fermentación, antes de que *Saccharomyces cerevisiae* las desplace, siendo esta última especie la que se encuentra mayoritariamente al final de la fermentación (Tronchoni *et al.*, 2017).

Las levaduras no-*Saccharomyces* forman parte de un consorcio fundamental en la fermentación de bebidas alcohólicas, ya que son estas las responsables de aportar la mayoría de las características organolépticas a los fermentos, los cuales en la mayoría de los casos enriquecen el aroma y/o sabor de las bebidas alcohólicas. Además de los metabolitos secundarios producidos por estas levaduras, son benéficos para la salud del consumidor (Casas, 2015).

Por otra parte, al manipular la cantidad y género de levaduras no-*Saccharomyces* durante la fermentación se pueden producir bebidas alcohólicas con parámetros de calidad de aroma y sabor que cumplan con las expectativas del consumidor más exigente (Casas, 2015).

2.4.3 Principales características que aportan las levaduras no-*Saccharomyces* a las bebidas alcohólicas fermentadas.

Algunas de las características de mayor relevancia en cualquier tipo de fermentación son el aroma y sabor, que estarán estrictamente relacionados con la materia prima a fermentar, y las especies de levaduras que realizan la fermentación. Los aromas y sabores son el resultado de los diferentes metabolitos de desecho que produce cada cepa; dentro de estos metabolitos se encuentran compuestos azufrados, ésteres (acetato de etilo, acetato de isoamilo y acetato de metilo), ácidos orgánicos (butírico, fórmico, propiónico), carbonilos (acetona, acetaldehído), alcoholes (butanol, sec-butanol, isobutanol), entre otros (Enríquez y Acevedo, 2012).

Debido a la importancia de las levaduras no-*Saccharomyces* en el sabor y aroma final de las bebidas (Esteve *et al.*, 1998), se han realizado estudios con co-fermentaciones simultáneas y secuenciales usando diferentes cepas de levaduras, por ejemplo: *S. cerevisiae* con una no-*Saccharomyces* (Ravasio *et al.*, 2014). Algunas de estas últimas levaduras pudieran no completar la fermentación, como por ejemplo *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Torulaspota*, etc., pero incrementan la complejidad sensorial de las bebidas (Tataridis *et al.*, 2013).

Se ha reportado que el uso de no-*Saccharomyces* en los procesos de fermentación puede incrementar parámetros de calidad, como la reducción del etanol (Contreras *et al.*, 2014), contenido de glicerol (Belda *et al.*, 2015), complejidad aromática (Belda *et al.* 2017), acidez (Balikci *et al.* 2016), contenido de antocianinas (Benito *et al.*, 2017), polisacáridos y manoproteínas (Domizio *et al.*, 2017). Compuestos nocivos que influyen en la inocuidad de los alimentos, como aminos biogénicos o etil carbamato, también se pueden reducir con el uso de algunas especies de no-*Saccharomyces* (Benito *et al.* 2015a). Por tanto, la selección de no-*Saccharomyces*

es esencial para optimizar el bouquet de las bebidas alcohólicas (Ciani y Maccarelli, 1997).

2.5 Características generales de *Torulaspora delbrueckii*.

El género *Torulaspora* comprende levaduras fermentativas que se pueden encontrar en hábitats silvestres y antrópicos, donde pueden coincidir con otras levaduras fermentativas como *Saccharomyces* y *ZygoSaccharomyces*. (Kurtzman, 1904)

Las células de *Torulaspora* en su mayoría tienen una forma esférica, aunque las formas ovoides y elipsoidales son también frecuentes. Su tamaño celular oscila entre los 2–6 x 3–7 µm, suele ser más pequeña que *S. cerevisiae*. *Torulaspora* rara vez puede producir pseudohifas, pero nunca hifas. (Yarrow, 1984). Cabe mencionar que *T. delbrueckii* en comparación con *S. cerevisiae* muestra un menor crecimiento en estrictas condiciones anaeróbicas, así como un menor vigor para fermentar y una tasa de crecimiento más lenta en condiciones habituales de fermentación (Visser *et al.*, 1990; Mauricio *et al.*, 1998; Hanl *et al.*, 2005).

Con respecto a las características necesarias para realizar la fermentación alcohólica industrial, *Torulaspora delbrueckii* afecta positivamente el sabor y aroma de las bebidas (Ciani y Maccarelli, 1997).

Torulaspora delbrueckii tiene un buen rendimiento de fermentación en comparación con otras levaduras no-*Saccharomyces*. Además, se ha afirmado que *T. delbrueckii* se puede utilizar para optimizar algunos parámetros en vinos con respecto a los habituales inoculados con *S. cerevisiae*, como producir una cantidad baja de ácido acético, una concentración menor de etanol, incrementar la cantidad de glicerol, permite una mayor liberación de mannoпротеína y polisacárido, promueve la fermentación maloláctica, aumenta las cantidades de compuestos aromáticos interesantes (ésteres frutales, lactonas, tioles y terpenos), y disminuye la cantidad de compuestos aromáticos no deseados; con lo cual puede incrementar la calidad o complejidad del vino (Benito, 2018).

Se ha encontrado que *T. delbrueckii* tiene la capacidad para fermentar maltosa, producir compuestos de éster, y biotransformar monoterpenoides que son

componentes de sabor en el lúpulo de cerveza. (King y Dickinson, 2000; Tataridis *et al.*, 2013; Michel *et al.*, 2016; Canonico *et al.*, 2016). Así como producir diferentes aromas frutales, como β -fenil etanol (sabor a “rosas”), n-propanol, isobutanol, alcohol amílico (aroma a “brandy”), y etil acetato (Basso *et al.*, 2016; Etschmann *et al.*, 2015; Pires *et al.*, 2014).

2.6 Características generales de *Saccharomyces cerevisiae*.

Dentro del género *Saccharomyces*, la especie *cerevisiae* constituye el microorganismo eucariote más estudiado; su nombre deriva del vocablo *Saccharo* (azúcar), *myces* (hongo) y *cerevisiae* (cerveza). (Hernández, 1999) Esta levadura es una de las especies considerada como microorganismo GRAS (por las siglas en inglés de *Generally Recognized As Safe*), por lo que ha sido aprobada para su uso como aditivo alimentario (Boyle *et al.*, 2006; Anadon *et al.*, 2006). Puede aislarse con facilidad de plantas y tierra, así como del tracto gastrointestinal y genital humano. El uso más extendido está enmarcado en la panificación y en las industrias de fabricación de cerveza, vinos y alcohol. (Suárez *et al.*, 2016)

Esta levadura es un hongo ascomiceto que ha sido ampliamente estudiado por su capacidad de producir etanol (Folch *et al.*, 2004). Algunas características de esta levadura que forman parte de su adaptación son el hecho de que pueda metabolizar la glucosa y la fructosa tanto por vía respiratoria como por vía fermentativa, y de crecer en condiciones aerobias o anaerobias (González *et al.*, 2007).

Saccharomyces cerevisiae es la levadura más empleada en procesos industriales donde se requiere tener control de la fermentación. Esta levadura se caracteriza por tener alto poder fermentativo, aunque posee baja capacidad de producir compuestos secundarios, que son los que brindan características organolépticas a las bebidas y alimentos fermentados. Las condiciones de cultivo afectan la producción de compuestos secundarios en *S. cerevisiae* (Rojas *et al.*, 2001). *S. cerevisiae* fermenta los carbohidratos de seis carbonos y posee un alto grado de tolerancia al etanol (Hidalgo, 2003). Otra característica de *Saccharomyces* es la tolerancia a SO₂, que se emplea como inhibidor de otras levaduras y bacterias en los procesos de fermentación controlada durante la elaboración de bebidas alcohólicas, debido a

que el crecimiento de una microbiota no deseada puede interferir en las características organolépticas de las bebidas (Nally *et al.*, 2005).

La especie puede inhibir el crecimiento de cepas no-*Saccharomyces* (Cocolin *et al.*, 2004). Además de poseer el fenómeno **killer**, que implica la secreción, por parte de ciertas cepas, de una proteína tóxica de baja masa molecular, llamada toxina **killer**, a la cual ellas son inmunes, que mata a células sensibles, las cuales pueden ser del mismo o diferentes géneros. Este tipo de interacciones pueden determinar la evolución de las distintas poblaciones de levaduras durante la fermentación (Nally *et al.*, 2005; Maqueda *et al.*, 2012).

2.7 Cultivos iniciadores mixtos.

Los avances en la biotecnología han llevado a la reciente comercialización de levaduras no-*Saccharomyces* como cultivos iniciadores. Estos están destinados a ser utilizados en inoculación simultánea o secuencial con *S. cerevisiae* (Tronchoni *et al.*, 2017).

El uso de cultivos iniciadores, que combinen cepas de no-*Saccharomyces* con cepas de *S. cerevisiae*, o su uso en inoculación secuencial, se postula como una alternativa a la recuperación de la variabilidad que existe en los cultivos “naturales” durante fermentaciones espontáneas, pero sin los problemas que pueden aparecer en éstos, como pueden ser las paradas de fermentación o la aparición de defectos sensoriales.

Ya se sabía que existen diversos tipos de interacciones entre levaduras (Wang *et al.*, 2016), generalmente afectando de forma negativa a las no-*Saccharomyces*, que normalmente desaparecen de la fermentación y son desplazadas por *S. cerevisiae*. Este desplazamiento se debe en parte a que posee una mayor capacidad fermentativa y de consumo de azúcares, y en parte a su capacidad de tolerar mayores concentraciones de alcohol. Ahora también se sabe que, además de los conocidos factores *killer* de *S. cerevisiae*, esta levadura tiene otras estrategias para imponerse en la fermentación, como la producción de pequeños péptidos, derivados de enzimas que poseen actividad antimicrobiana contra diversas especies de levaduras y bacterias.

Las interacciones entre levaduras en fermentaciones puras y mixtas han sido objeto de una minuciosa revisión, Ciani (2016) estableció claramente que la competitividad de cualquier cepa dada puede ser influenciada por muchos factores, que son abióticos (pH, temperatura, etanol, presión osmótica, disponibilidad de nitrógeno, concentración de dióxido de azufre, etc.) y biótico (tipo de microorganismos, presencia de moléculas antimicrobianas, contacto de célula a célula, variedad de sustrato, etc. Esta competitividad cambiará dependiendo de las condiciones ambientales específicas de una fermentación alimentaria determinada, que a su vez influirá en la capacidad de una cepa dada para competir con otras levaduras.

Además, en la fermentación mixta, la elección de cepas específicas de *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* puede ser otro factor biótico a considerar como origen de variabilidad en la competitividad de cada cepa de levadura. Sin embargo, el uso de una pareja fija de cepas de levadura podría producir resultados predecibles relacionados con la dinámica de cada población de levadura y, por lo tanto, a la calidad (Ramírez y Velázquez, 2018).

2.7.1 Fermentación mixta de *Torulaspota delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Con respecto a las características requeridas para realizar la fermentación alcohólica industrial, de levaduras no-*Saccharomyces*, *T. delbrueckii* es la referencia más similar a la levadura mejor considerada, *S. cerevisiae*. Esta es la razón principal por la cual *T. delbrueckii* fue la primera levadura no-*Saccharomyces* propuesta para su uso industrial en la fermentación del vino (Castelli, 1955). Sin embargo, existen diferencias leves pero relevantes en las características fisiológicas entre estas dos levaduras lo cual afecta su elección como opciones para diferentes aplicaciones industriales.

En particular, las tasas específicas de producción de CO₂ y consumo de O₂ son más altas en *T. delbrueckii* que en *S. cerevisiae* (Mauricio *et al.*, 1998). Los patrones de utilización y regulación del azúcar de las dos levaduras son muy similares, con rendimientos de biomasa similares en cultivos con glucosa limitada. Se destaca que *S. cerevisiae* es el primero en cambiar a un metabolismo respiro fermentativo a

medida que disminuye la velocidad de alimentación de oxígeno, mostrando un menor rendimiento de biomasa a bajas tensiones de oxígeno con respecto a *T. delbrueckii* (Alves *et al.*, 2007). También es importante destacar que *T. delbrueckii* tiene una menor resistencia a las altas concentraciones de etanol (oscila entre el 7.4% y ligeramente superior al 9%) con respecto a *S. cerevisiae*. Por esta razón, no puede completar la fermentación cuando el alcohol alcanza niveles superiores al 12% (Catrileo *et al.*, 2020).

Herraiz *et al.* (1990) describió que la inoculación mixta *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* incrementa la concentración total de ésteres (principalmente acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, octanoato y 3-hidroxibutanoato) en relación con la inoculación con *S. cerevisiae*.

La relación de dominancia de *T. delbrueckii* depende de muchos factores: el tamaño del inóculo, la cantidad y los tipos de microorganismos silvestres viables presentes en el mosto inicialmente, etapa de fermentación, concentraciones de azúcar y etanol, fenotipo **killer** y sensibilidad **killer** de la levadura inoculada y de las levaduras silvestres, la concentración de SO₂, concentración de cobre, plaguicidas que vienen en la materia prima (Ramírez y Velázquez, 2018).

2.7.2 Uso de cultivos iniciadores mixtos en vinos.

Los cocultivos de no-*Saccharomyces* con *S. cerevisiae* también se han usado para controlar la acidez volátil en el vino. En cultivos mixtos con *T. delbrueckii* se ha visto en diferentes estudios que reducen la producción de la acidez volátil y el acetaldehído.

Las características que las levaduras no-*Saccharomyces* pueden aportar al vino se observan en la Figura 3. Una de las principales es indudablemente el aroma, y también una de las primeras que se han estudiado (Tronchoni *et al.*, 2017).



Figura 3. Aspectos de la calidad del vino que pueden modularse mediante el uso de levaduras no-*Saccharomyces*.

Existen también ejemplos de cómo las no-*Saccharomyces* pueden ser beneficiosas para actuar positivamente sobre la estabilización del color, mejorando las características de la espuma (Medina *et al.*, 2017)

Tabla 1. Algunas especies de levaduras comercializadas para uso enológico

Cepas comerciales	Atributos por los que se comercializan
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Mejorar aroma y complejidad en boca de tintos y blancos
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Productora de ácido láctico, proporciona redondez y equilibrio ácido al vino
<i>Torulaspota delbrueckii</i> / <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Incrementa la complejidad vínica proporcionando aromas frutales
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Mejora de aromas varietales, así como terpenos y tioles
<i>Metschnikowia fructicola</i>	Protección natural contra la contaminación por microorganismos, permite reducir el uso de sulfuroso
<i>Pichia kluyveri</i>	Mejora de aromas varietales, así como tioles
<i>SchizoSaccharomyces pombe</i>	Permite la desacidificación maloláctica

(Tomada de Tronchoni *et al.*, 2017).

Recientemente el empleo de las no-*Saccharomyces* se ha propuesto para disminuir el grado alcohólico. Las diferencias metabólicas que existen entre las no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* hacen que estas levaduras puedan suponer una mejor alternativa al intento de disminuir el grado alcohólico. En un estudio realizado

por Morales *et al.* (2015) se utilizó la inoculación secuencial de cepas de levaduras pertenecientes a *T. delbrueckii* y *M. pulcherrima* junto a *S. cerevisiae* para obtener vinos con menor grado alcohólico para así disminuir los efectos negativos que el alcohol tiene sobre el paladar y la salud.

2.7.3 Uso de cultivos iniciadores mixtos en cerveza.

Recientemente, con el objetivo de obtener cervezas con perfiles aromáticos más complejos, los investigadores han centrado su atención en las levaduras no convencionales (Basso *et al.*, 2016; Varela, 2016). El manejo de la fermentación tiene un papel fundamental en la calidad de la cerveza y en la cantidad de compuestos aromáticos. La elección de la levadura en el proceso de la cerveza es también crucial para que el producto tenga sabores distintos (Canónico *et al.*, 2017).

La cerveza producida utilizando cultivos puros de *T. delbrueckii* así como fermentaciones mixtas de *S. cerevisiae/T. delbrueckii* se caracteriza por poseer notas cítricas y a ésteres frutales (Canónico *et al.*, 2016; Michel *et al.*, 2016).

Canónico *et al.* (2017) encontró que el uso de fermentaciones mixtas *S. cerevisiae/T. delbrueckii* en cerveza puede potenciar el contenido de alcoholes superiores. Por lo que su uso de forma conjunta es una estrategia adecuada para controlar la producción de sabor durante la fermentación de cerveza, y así obtener productos con compuestos aromáticos diferentes. Es importante mencionar que la composición del mosto influye directamente en la composición final de los compuestos aromáticos, Canónico *et al.* realizó estudios con diferentes variedades de lúpulo (2016 y 2017), encontrando diferentes concentraciones de compuestos congenéricos.

2.8 Compuestos Congenéricos.

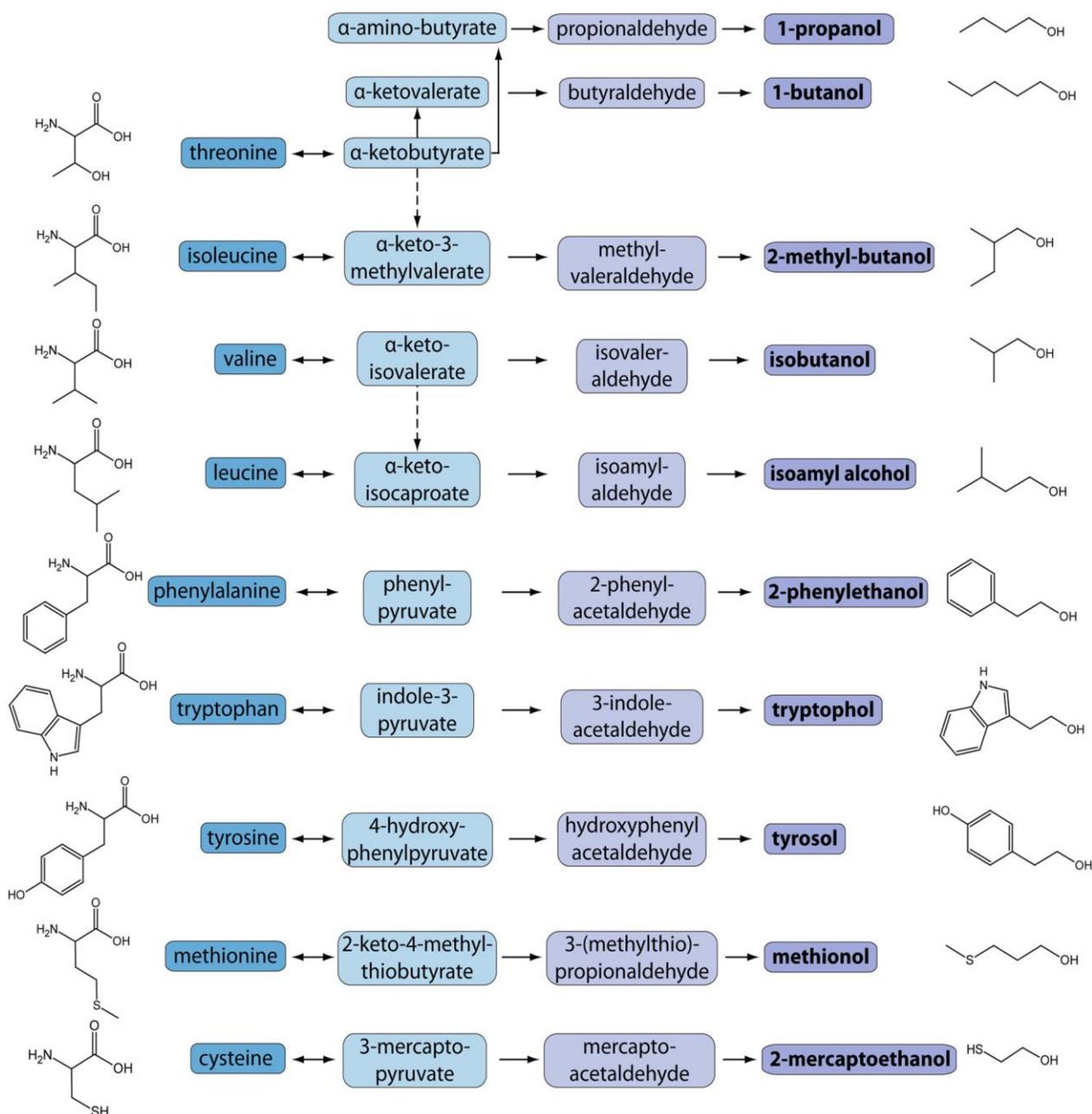
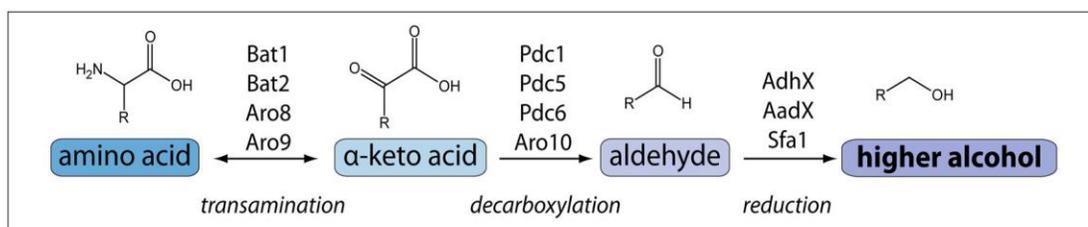
Se les llama compuestos congenéricos a la mezcla compleja de metabolitos generalmente volátiles, producidos por las levaduras en muy bajas concentraciones pertenecientes a ésteres, carbonilos y alcoholes de alto peso molecular (Santillana y García, 1998).

Estos compuestos químicos se relacionan con el sabor y aroma de las bebidas y tienen la peculiaridad de encontrarse en muy bajas concentraciones, comparados con el etanol producido (Casas *et al.*, 2015).

Los factores que pueden afectar la producción de congenéricos son la temperatura, fermentaciones intermedias, tipo de carbohidratos que se utilice y materia vegetal a fermentar, concentración y tipo de nitrógeno, así como también la especie y cepa de levadura que se utilice (García *et al.*, 2004; Zumárraga y Barbero, 2014).

2.8.1 Bioquímica de la producción de alcoholes superiores.

La ruta bioquímica que mejor caracteriza a la producción del aroma por parte de las levaduras es la ruta de Ehrlich. Esto se debe a que por esta ruta se producen los compuestos más deseables y reconocibles: los alcoholes superiores y posteriormente, los ésteres de acetato. En 1907, Félix Ehrlich planteó por primera vez la conexión entre el metabolismo de aminoácidos y la formación de alcoholes superiores basándose en su similitud estructural (**Esquema 2**) (Dzialo *et al.*, 2017).



Esquema 2. La ruta de Ehrlich. Este esquema representa las conexiones directas que existen entre los aminoácidos y los alcoholes superiores respectivos. (Tomado de Dzialo *et al.*, 2017)

La ruta de Ehrlich es un proceso de tres pasos que modifica la asimilación de aminoácidos, siendo estos la principal fuente de nitrógeno en muchos procesos de fermentación.

En general, los aminoácidos se desaminan, se descarboxilan y finalmente se reducen a su respectivo alcohol superior. Al modificar secuencialmente los aminoácidos, la levadura puede utilizar el nitrógeno esencial según sea necesario y a su vez producir una serie de distintos compuestos aromáticos (Dzialo *et al.*, 2017).

Dadas las similitudes químicas de los intermediarios con el piruvato, el acetaldehído, y el etanol, muchas de las mismas enzimas involucradas en la producción de los metabolitos primarios en la fermentación también participan en este camino.

Los principales alcoholes superiores encontrados en bebidas alcohólicas y la relación con los aromas que producen son:

1-propanol (aroma alcohólico), 1-butanol (aroma alcohólico), 2-metil-1-propanol, también llamado isobutanol (aroma alcohólico), 2-feniletanol (aromas a rosas, florales), 3-metil-butanol (aroma a rosas) y alcohol isoamilo (aroma a banana o afrutado) (Escalante *et al.*, 2012).

Los alcoholes superiores pueden impartir un efecto muy deseado en el sabor del producto, su umbral sensorial más alto difiere varios órdenes de magnitud en comparación con sus correspondientes ésteres de acetato.

Adicionalmente, la concentración de cada compuesto se ve dramáticamente afectada por la composición del medio, especialmente por la fuente de carbono y de nitrógeno (Dzialo *et al.*, 2017).

2.8.2 Aplicaciones de algunos compuestos aromáticos.

Desde el punto de vista industrial la fragancia a rosas del 2-feniletanol lo ha convertido en un compuesto deseable para su uso en muchos perfumes, cosméticos y bebidas (Etschmann *et al.* 2002).

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* se han utilizado para convertir fenilalanina en 2-feniletanol, por lo general mediante la Vía de Ehrlich (Kim *et al.*, 2014).

- Propiedades Antifúngicas

Algunos alcoholes superiores tienen propiedades antifúngicas. Como el alcohol isoamílico que inhibe la germinación de hongos filamentosos (Ando *et al.* 2012). El 2-feniletanol es producido por varios géneros de levaduras para inhibir potencialmente el crecimiento de varios hongos filamentosos (Liu *et al.* 2014).

- **Quorum sensing**

El **quorum sensing** es un mecanismo de comunicación entre células mediante el cual son capaces de saber cuántas son a través de la producción y detección de la acumulación de una molécula de señalización que secretan a su entorno y así pueden conocer el momento en el que deben actuar para desarrollar sus funciones de la forma más eficaz. Mediante este mecanismo las levaduras pueden conocer su concentración en un ambiente determinado y decidir el momento en el que se va a poner en marcha la expresión de un determinado conjunto de genes con el fin de desarrollar una respuesta concreta y de forma simultánea (March y Eiros, 2013).

Varios alcoholes superiores como 2-fenil etanol, tyrosol y farnesol pueden actuar como moléculas **quorum-sensing** en levaduras dimórficas, incluyendo a *S. cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii* y *Candida albicans*. La secreción de estos alcoholes regula el cambio entre formas de levadura unicelulares y formas filamentosas.

Además, se ha especulado que estas moléculas **quorum-sensing** pueden tener un papel a nivel poblacional ya que pueden influir en el establecimiento de comunidades microbianas en fermentaciones semi-espontáneas (Ciani y Comitini, 2015).

- Insectos

Los alcoholes superiores también pueden servir como señales químicas para los insectos. Estos utilizan los aromas emitidos para orientarse hacia sitios de oviposición adecuados, como manzanas infestadas de levadura que proporcionan una fuente de alimento para larvas y protección contra infestaciones de hongos nocivos. Fermentaciones de *S. cerevisiae* o una mezcla sintética de compuestos de

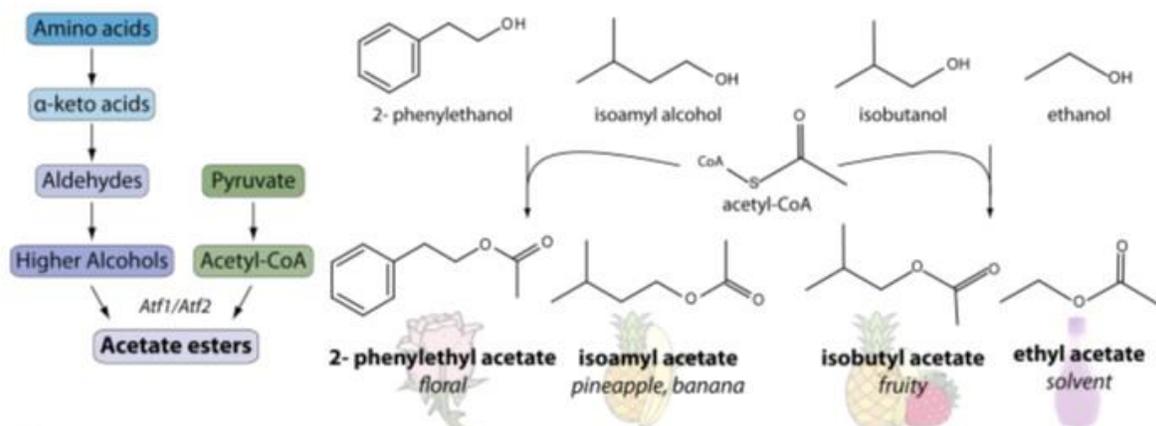
la fermentación, incluidos etanol, alcohol isoamílico y 2-feniletanol, es suficiente para atraer a *D. melanogaster* (Becher *et al.* 2012).

Las mezclas de compuestos para imitar las fermentaciones de levadura son comúnmente implementadas para combatir las plagas agrícolas. Estas mezclas contienen alcoholes superiores que tienden a provocar respuestas antenales y atracción. (Dzialo *et al.*, 2018). Por ejemplo, recientemente se descubrió que el gorgojo *Araecerus fasciculatus*, una plaga del grano de café se siente atraído por el 2-feniletanol lo cual implica que el compuesto podría servir como un señuelo potencial (Yang *et al.*, 2016).

2.8.3 Bioquímica de la producción de ésteres.

Los ésteres están formados por una reacción de condensación entre acetil/acyl-CoA y un alcohol. El uso de acetil-CoA o acyl-CoA divide los ésteres en dos categorías diferentes, ésteres de acetato y ésteres de ácidos grasos, respectivamente (Dzialo *et al.*, 2017).

La síntesis de ésteres se lleva a cabo por alcohol-O-acetil (o acyl)-transferasas (AATasas) encontradas en la levadura. En *Saccharomyces cerevisiae*, hay cuatro enzimas conocidas, Atf1 y Atf2 son responsables de la producción de la mayoría de los ésteres de acetato (Cherry *et al.* 2012).



Esquema 3. Síntesis de éster por levadura. (Tomado de Dzialo *et al.*, 2017)

Las actividades enzimáticas de estas enzimas pueden diferir significativamente, sobre todo entre diferentes especies y cepas, consiguiendo la variación en el producto final de la de fermentación.

Los ésteres son generalmente aceptados como algunos de los más importantes contribuyentes del sabor y aroma de las bebidas alcohólicas, impartiendo notas afrutadas y florales al producto (Nordstrom *et al.*, 1966; Verstrepen *et al.* 2003).

La importancia general y la complejidad de la producción de ésteres ha llevado a una considerable investigación industrial para optimizar la producción. Curiosamente, estos compuestos afectan a la calidad de prácticamente todas las fermentaciones de alimentos que impliquen levaduras (Lilly *et al.*, 2000; Verstrepen *et al.* 2003).

La concentración y composición de la fuente fermentable de carbono, así como la relación carbono/nitrógeno tienen efectos dramáticos sobre la producción de ésteres (Pidcocke *et al.* 2009; Dekoninck *et al.* 2012). La conexión directa con sus aminoácidos precursores hace a la producción de ésteres altamente dependiente de la fuente de nitrógeno. La concentración de los aminoácidos y los pequeños péptidos, se correlaciona con la producción de ésteres de acetato (Procopio *et al.* 2013). Al igual que los alcoholes superiores, los ésteres pueden tener efectos antifúngicos, posiblemente las levaduras los producen para eliminar a la competencia (Masoud *et al.*, 2005).

2.9 Fuentes de nitrógeno en el mosto

El nitrógeno en el mosto puede estar presente en dos formas claramente diferenciadas: la inorgánica, como las sales de amonio, y la orgánica formada por aminoácidos, péptidos y proteínas. No todas estas formas son igualmente disponibles para la levadura ya que, por ejemplo, los péptidos y las proteínas no se suelen considerar como auténticas fuentes de nitrógeno, y los aminoácidos son muy variables como fuentes nitrogenadas ya que mientras algunos son consumidos ávidamente (glutamina, por ejemplo), otros no lo son en absoluto en condiciones anaerobias, como la prolina. El amonio suele estar altamente disponible para las

levaduras, por lo que es una forma química que se suele utilizar de forma abundante en la industria (Mas *et al.*, 2013).

Durante las fermentaciones mixtas, el uso de diferentes fuentes de nitrógeno puede influenciar el dominio de una especie de levadura en la competencia por los nutrientes. Se han reportado varias interacciones positivas y negativas respecto a la disponibilidad de nitrógeno y/o la limitación de este sustrato (Ivey *et al.*, 2013; Oro *et al.*, 2014).

El componente nitrogenado es utilizado por las levaduras para reproducirse (producción de biomasa) durante la fermentación alcohólica y asegurar un número de células suficientes para consumir todos los azúcares del mosto. Por lo tanto, el contenido en nitrógeno condiciona la realización de la fermentación alcohólica, tanto en su velocidad como en su culminación (Thaillandier *et al.*, 2007).

Pero, además, la mayoría de las fuentes nitrogenadas del mosto (amonio y aminoácidos) son a su vez precursores aromáticos, determinando igualmente la calidad aromática (Mas *et al.*, 2013). En este contexto, la competencia entre levaduras por el uso de nitrógeno asimilable en fermentaciones mixtas podría tener un papel importante en la formación de alcoholes superiores (He *et al.*, 2014).

2.9.1 Metabolismo del nitrógeno en la fermentación.

En cuanto al metabolismo del nitrógeno, durante el proceso de la fermentación alcohólica, la levadura incorpora el nitrógeno de compuestos simples, como el amonio, para la síntesis de compuestos estructurales tales, como los aminoácidos, (y en consecuencia péptidos y proteínas), ácidos nucleicos y vitaminas. Por otra parte, los aminoácidos representan la mayor fuente de nitrógeno asimilable en los mostos y su uso por las levaduras a través de la ruta de Ehrlich da lugar a la formación de alcoholes superiores. La síntesis de alcoholes superiores depende de la cepa de levadura y es función de las concentraciones de nitrógeno amínico y nitrógeno amoniacal. De hecho, la naturaleza y cantidad de nitrógeno asimilable por la levadura afecta directamente a la concentración y por lo tanto a la percepción aromática de alcoholes superiores (como el isoamil alcohol o el alcohol amílico) y

ésteres (como el isoamil acetato o el 2-feniletil acetato) que son producidos durante la fermentación alcohólica mediante la regulación de las diferentes rutas síntesis. Es más, la producción excesiva de H₂S y los malos olores asociados, se deben a menudo a una inadecuada concentración de nitrógeno asimilable (Zumárraga y Barbero, 2014).

3. Hipótesis

Si en la fermentación mixta existiera una competencia por los nutrientes entre las dos especies de levadura entonces podría variar la composición de congenéricos producidos con respecto a las fermentaciones individuales.

4. Objetivos

Objetivo General

Evaluar las diferencias que existen entre la fermentación individual y mixta de *Torulaspóra delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae* cepa SCH2, en medio sintético M11 con dos distintas fuentes orgánicas de nitrógeno.

Objetivos Particulares

- Cuantificar los compuestos congenéricos, etanol y glicerol producidos durante la fermentación individual de las especies de levadura, así como en la fermentación mixta de éstas, en un medio sintético con una fuente de nitrógeno orgánica compleja, así como en un medio sintético utilizando fenilalanina como única fuente orgánica de nitrógeno.
- Determinar cuál es el efecto de la fenilalanina sobre los compuestos congenéricos producidos durante las fermentaciones mixtas e individuales en medio sintético M11.
- Analizar el consumo de fructosa así como el crecimiento microbiológico a lo largo de cada fermentación realizada.

5. Justificación

El estudiar la interacción que existe entre estas dos especies de levadura nos brinda una herramienta biotecnológica para el desarrollo de fermentaciones con características específicas que se pueden controlar y con esto, mejorar los parámetros de calidad para la producción de nuevas bebidas fermentadas.

Por otro lado, se experimentó con dos fuentes de nitrógeno amínico diferentes, ya que de acuerdo con lo descrito por He *et al.* (2014) la competencia entre levaduras por el uso de nitrógeno asimilable en fermentaciones mixtas podría tener un papel importante en la formación de alcoholes superiores, por lo que es de suma importancia determinar cómo podría afectar la fuente de nitrógeno a la interacción entre estas dos levaduras y por lo tanto a la composición aromática final del medio.

6. Materiales y Métodos

6.1 Obtención de las levaduras.

Las levaduras utilizadas para este estudio se aislaron en proyectos anteriores, a partir de la fermentación natural del Sotol proveniente de la Sotolería “Coyamito” en el pueblo de Coyame, municipio de Aldama, Chihuahua.

6.2 Reactivación de las cepas.

Las levaduras seleccionadas fueron *Saccharomyces cerevisiae* cepa SCH2 y *Torulaspóra delbrueckii*, las cuales fueron identificadas previamente por medio de la secuencia de la región D1/D2 del gen ribosomal 26S, estas se encontraban congeladas a -80°C con glicerol al 30%. Se hizo un raspado de las muestras congeladas, el cual se tomó con una punta amarilla de micropipeta y se reactivaron en medio líquido YPD (Yeast Peptone Dextrose), utilizando 2% dextrosa “Difco”, 1% extracto de levadura “MCD-LAB”, 2% peptona “DIBICO”, previamente esterilizado a 121°C por 15 minutos, y se incubaron a 30°C por 24h. Después de observar crecimiento, se sembraron en agar YPD (2% agar “Difco”, 2% dextrosa “Difco”, 1% extracto de levadura “MCD-LAB”, 2% peptona “DIBICO”) con técnica estriado por agotamiento, y se incubaron por 48h a 37°C. Se observó el crecimiento de colonias puras. Por consiguiente, se partió de estas colonias puras para observar las diferentes especies al microscopio marca “Zeiss”, con la técnica de preparación húmeda, utilizando el aumento de 40x. (Camacho *et al.*, 2009).

6.2.1 Realización del respaldo

Se realizó un respaldo por triplicado de cada una de las cepas, utilizando glicerol “Sigma” al 30% y tomando el 70% del inóculo en caldo YPD, incubado 24 h al 30°C. Cada respaldo se hizo de un volumen de 1 mL y se colocó en tubos eppendorf, posteriormente se guardaron en congelación a una temperatura de -80°C.

6.2.2 Preparación del inóculo.

Se incubaron las 2 especies de levadura a utilizar, por 48h a 30°C en caldo YPD. Hasta llegar a una concentración celular de 10^7 , tanto en las fermentaciones puras como en las mixtas donde se agregó la misma cantidad de células de cada especie, y posteriormente se agregó al medio de fermentación.

6.3 Medio de fermentación M11.

Es un medio sintético diseñado por Fernández *et al.* (2014), el cual se asemeja a la composición del jugo de agave y evita limitaciones de elementos para el crecimiento de levaduras como carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales.

La composición del medio fue: fructosa “Meyer” (100 g/L), extracto de levadura “MCD-LAB” (1 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ “Fermont” (1 g/L), K_2HPO_4 “Sigma-Aldrich” (2.23 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ “Sigma-Aldrich” (5.07 g/L), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ “Sigma-Aldrich” (4.72 g/L). El pH del medio se ajustó a 4.7 con una solución de ácido fosfórico (85% v/v), y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Teniendo 10°Bx al inicio de cada fermentación.

Este medio se utilizó para la fermentación pura de cada especie de levadura, así como para la fermentación mixta, cada fermentación se realizó por duplicado. De la misma manera, se realizaron otras 3 fermentaciones por duplicado a iguales condiciones, variando únicamente la fuente de nitrógeno, cambiando el extracto de levadura por el aminoácido fenilalanina (1 g/L).

6.3.1 Condiciones de fermentación y análisis.

La fermentación se realizó a 20°C, en condiciones anaerobias, utilizando trampas de aire las cuales se llenaron con etanol 70% y agua destilada 30%.

Para cada fermentación se prepararon 300 mL de medio M11 y se utilizaron tubos de fermentación adecuados para este volumen de mosto.

El muestreo se realizó cada 24h en tubos Eppendorf para el posterior análisis.



Figura 4. Fermentación de medio M11, con trampa de aire y tubo de fermentación sostenido por soporte con cadena.

6.4 Evaluación del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspóra delbrueckii* en medio M11.

Para esto se utilizó el Método de Miles and Misra (Camacho *et al.*, 2009) para determinar la cantidad de levaduras. Para esto, se hicieron 6 diluciones decimales en agua peptonada al 0.1%, posteriormente se tomaron 5 μ L de cada dilución y se inocularon en agar YPD, por duplicado, las cajas de agar YPD inoculadas se incubaron por 24 h a 30°C, se contaron las colonias que crecieron en cada dilución, y se tomó en cuenta la dilución en la que crecieron menos de 20 UFC. Cada dilución se hizo por duplicado en condiciones estáticas.

Para el conteo de levaduras en el caso de las fermentaciones mixtas, se utilizó un medio diferencial Agar WL (Difco) para inocular de la misma manera 5 μ L de cada dilución sobre este medio. De tal forma que las colonias de *Saccharomyces cerevisiae* se observaran diferentes a *Torulaspóra delbrueckii*.

6.5 Determinación del consumo de azúcar durante la fermentación en medio M11.

Se monitorearon los °Brix de las fermentaciones cada 24 horas, utilizando un refractómetro marca Atago (Brix 0-32%) a 20°C. Cada lectura se hizo por duplicado.

Se cuantificó el consumo de fructosa por cromatografía de líquidos de alto rendimiento, HPLC (High Performance Liquid Chromatography), usando un cromatógrafo Waters 525 acoplado a un detector de índice de refracción (IR) Waters 2414, la temperatura del horno fue de 50°C, para la fase estacionaria. Se utilizó una columna Aminex HPX-87H Bio-Rad. La fase móvil utilizada fue H₂SO₄ 5mM a un flujo de 0.6 mL/min, la cual se filtró y se esterilizó antes de usarse.

Se realizó la preparación del estándar y curva patrón de fructosa “Meyer”.

La curva patrón utilizada para la cuantificación de fructosa se encuentra en el ANEXO I. Las muestras se tomaron cada 24 h, cada fermentación se hizo por duplicado y se obtuvo su promedio para los resultados.

6.6 Cuantificación de etanol y glicerol durante la fermentación en medio M11.

Se cuantificó la concentración de etanol y glicerol por cromatografía de líquidos de alto rendimiento, HPLC (High Performance Liquid Chromatography), usando un cromatógrafo Waters 525 acoplado a un detector de índice de refracción (IR) Waters 2414, la temperatura del horno fue de 50°C, para la fase estacionaria. Se utilizó una columna Aminex HPX-87H Bio-Rad. La fase móvil utilizada fue H₂SO₄ 5mM a un flujo de 0.6 mL/min, la cual se filtró y se esterilizó antes de usarse.

Se monitoreo la producción de etanol cada 24h a lo largo de cada fermentación, tanto en medio M11 como en medio M11 con fenilalanina. Se realizó la preparación del estándar y curva patrón de etanol “Sigma-Aldrich” y glicerol “Sigma”.

Las curvas patrón utilizadas para su cuantificación se encuentran en el ANEXO I.

6.7 Preparación de las muestras.

Se tomó 1.5 mL de cada fermentación en tubos Eppendorf y se centrifugaron a 14000 rpm por 20 minutos a 20°C, se filtraron y se inyectaron en el HPLC.

6.8 Preparación de los estándares.

El estándar de fructosa “Meyer”, se preparó pesando 0.1 g del azúcar en un matraz aforado, aforando con agua desionizada a 10 mL. Por lo que el estándar quedó a una concentración del 1%. De igual forma se preparó el estándar de etanol “Sigma-

Aldrich” y glicerol “Sigma” midiendo 0.1mL de cada uno y aforándolos a 10 mL con agua desionizada.

6.8.1 Preparación de las curvas patrón.

Se preparó una disolución madre al 10% de fructosa, después se realizaron las diluciones correspondientes para tener las diferentes concentraciones y realizar la curva. La curva patrón de glicerol se realizó a partir de una disolución madre del 2%. Y en el caso del etanol se preparó una disolución madre al 15% y ahí se partió para las diferentes concentraciones de la curva patrón.

6.9 Determinación y cuantificación de compuestos congenéricos al final de la fermentación en medio M11.

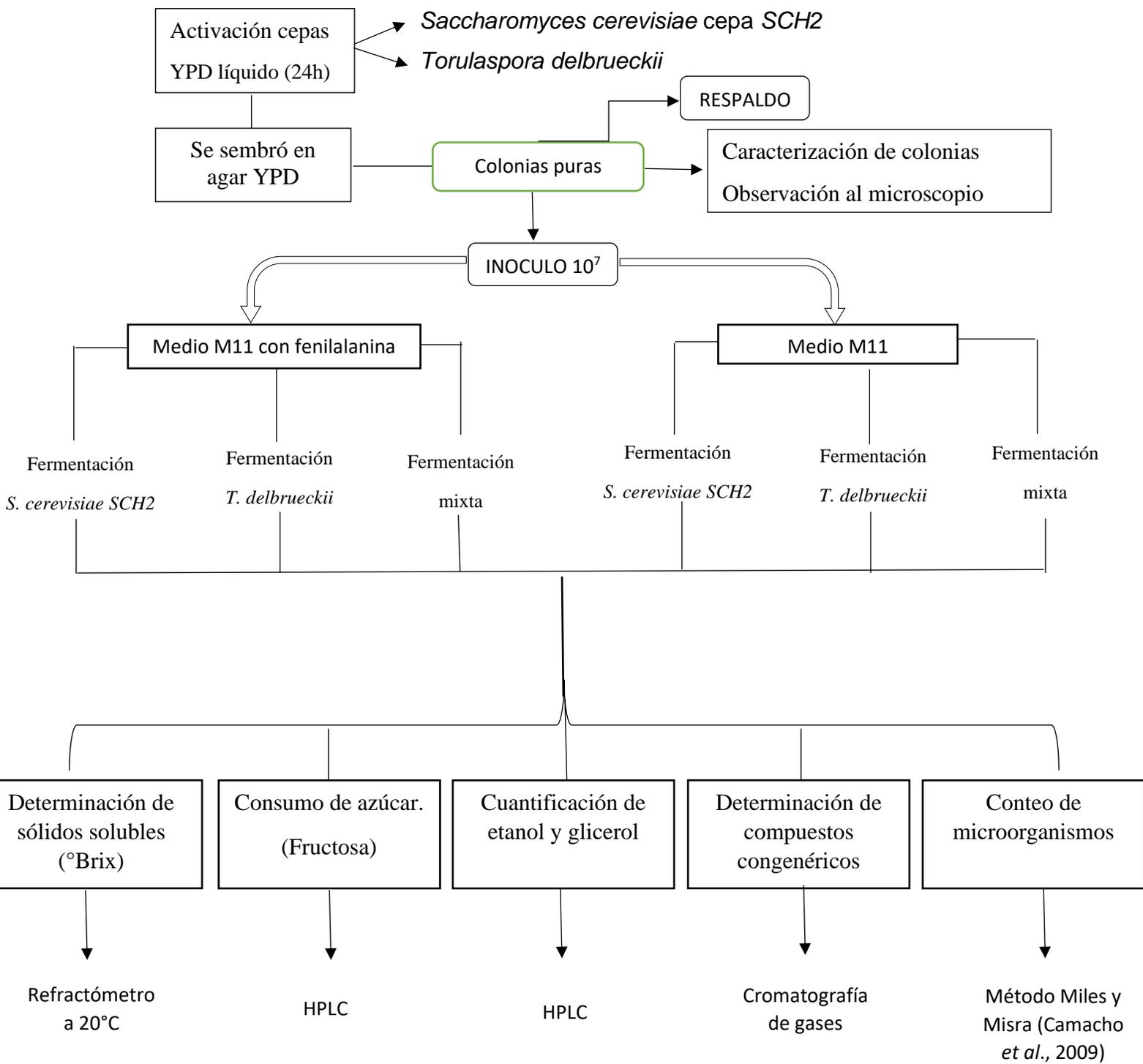
Se determinaron y cuantificaron los compuestos congenéricos a las 168h de cada fermentación por cromatografía de gases, mediante un cromatógrafo Agilent Technologies, acoplado a un detector de ionización de flama, utilizando una columna Optima-Wax, que posee un tamaño de partícula de 0.25 μm , con dimensiones de 60m x 0.25mm. La temperatura del inyector y detector fue de 250°C. Se utilizó aire con un flujo de 300 mL/min, hidrogeno con un flujo de 40 mL/min y nitrógeno con un flujo de 28 mL/min como gas acarreador.

Para la determinación de compuestos congenéricos se inyectaron los estándares siguientes: etil lactato (SAFC), 1-propanol (Sigma-Aldrich), 2-butanol (Fluka), metanol (Sigma-Aldrich), 2-metil-1-propanol (Sigma), 2-metil-1-butanol (Aldrich), 2-fenil etanol (Chem Service), 2-fenil acetato (Aldrich), isoamilacetato (SAFC). De estos estándares se realizaron las curvas patrón partiendo de una disolución madre con una concentración de 1% (10 μL /mL) de cada uno de estos. **Las curvas patrón utilizadas para la cuantificación de compuestos congenéricos se encuentran en el ANEXO I.**

Se hizo una curva patrón para los estándares solubles en agua (etil lactato, 1-propanol, 2-butanol y metanol) y otra para los no solubles en agua (2-fenil etanol, 2-fenil acetato, isoamilacetato, 2-metil-1-propanol y 2-metil-1-butanol), los cuales se disolvieron con una solución de etanol puro (Sigma- Aldrich).

Para la preparación de la muestra, se tomó 1.5 mL del final de cada fermentación a las 168h en tubos eppendorf y se centrifugaron a 14000 rpm por 20 minutos a 20°C, se filtraron y se inyectaron en el cromatógrafo de gases.

7. Estrategia Experimental.



Esquema 4. Estrategia experimental utilizada en el proyecto

8. Resultados y Discusión

8.1 Aislamiento en Agar YPD y caracterización de colonias.



Figura 5. Crecimiento de colonias puras en Agar YPD a las 48h de incubación, a la izquierda se observan las correspondientes a *S. cerevisiae* cepa *SCH2* y a la derecha las colonias de *T. delbrueckii*.

Las colonias de *S. cerevisiae* cepa *SCH2* presentaron una forma circular, convexa, con bordes redondeados, superficie lisa, de tamaño mediano, color beige claro, aspecto húmedo, opacas, cremosas. Se observó su crecimiento desde las 24h de incubación a 37°C, mientras que las colonias de *T. delbrueckii* crecieron a las 48h de incubación, las cuales se describen como colonias pequeñas, forma circular, color beige, opacas, planas con bordes redondeados, superficie lisa y textura cremosa. Ambas especies levadura se observaron puras al crecer en Agar YPD.

La caracterización de las colonias de *S. cerevisiae* concuerda con lo descrito por Larone (2011) donde señala a esta especie de crecimiento rápido (maduran al tercer día), son colonias húmedas, cremosas, convexas, lisas y opacas, con colores que van desde blanco a color crema.

8.2 Observación microscópica de las especies de levadura.

Después del aislamiento en Agar YPD y la observación de colonias puras, ambas cepas se observaron en el microscopio.



Figura 6. Observación al microscopio, aumento de 40X, especie *S. cerevisiae* cepa *SCH2*, medio YPD, 48h de incubación a 37°C



Figura 7. Observación al microscopio, aumento de 40X, especie *T. delbrueckii*, medio YPD, 48h de incubación a 37°C

En la Figura 6, se observa la levadura *S. cerevisiae* cepa *SCH2*, que se puede describir como células esféricas, transparentes, con un tamaño celular de $5\mu\text{m}$, no se observa una agrupación definida, se observa reproducción asexual por gemación, ya que existen varias células más grandes unidas a una pequeña, su tipo de gemación es polar de acuerdo con lo descrito por Hidalgo (2018).

Por otro lado en la Figura 7, se observa la levadura *T. delbrueckii*, donde se observan células esféricas, transparentes, con un tamaño celular de $7.092\mu\text{m}$, sin agrupación definida, al igual que *S. cerevisiae* se logran apreciar algunas células en gemación, de tipo polar.

Es importante destacar que *T. delbrueckii* tuvo un tamaño celular más grande que *S. cerevisiae*, de acuerdo con Ramírez (2018), el tamaño celular de *T. delbrueckii* oscila entre $3\text{--}7\mu\text{m}$, y suele ser más pequeña que *S. cerevisiae*, sin embargo, en este caso *Torulaspota delbrueckii* mostró tener un mayor tamaño, esto se puede deber a diferentes causas como la temperatura, las diferentes cepas, al medio de cultivo donde se desarrolla, los tiempos de incubación, entre otros factores.

8.3 Determinación de Sólidos Solubles durante la fermentación.

Los sólidos solubles se refieren a los azúcares, ácidos orgánicos, proteínas y minerales presentes. Los grados Brix es una escala para medir concentraciones de soluciones de diferentes azúcares, considerando que 1°Brix equivale a 1g de azúcar en 100 mL de solución acuosa (Badui, 2015), por lo que los grados Brix sirven para saber la concentración de azúcar en la disolución.

La medición de $^\circ\text{Brix}$ se utilizó para estudiar el comportamiento de la fermentación.

Tabla 2. °Brix respecto al tiempo en las 3 fermentaciones en medio M11

Tiempo (h)	° Brix		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	Mixta
0	10	10	10
24	9.1	9.6	9.3
48	6.5	8	6.1
72	4.6	6.2	4.5
96	3.9	5.3	3.8
168	3.6	3.9	3.8
192	3.6	3.9	3.8
216	3.6	3.9	3.8

En la Tabla 2, se muestran los °Brix respecto al tiempo en horas de las tres primeras fermentaciones en medio M11, estas determinaciones se hicieron cada 24 horas por duplicado y se hizo un promedio de cada fermentación, donde se observa que todas las fermentaciones comenzaron con un valor de 10°Brix y fueron disminuyendo lentamente, hasta llegar a un valor constante, el cual se tomó como el final de la fermentación, debido a que las levaduras dejaron de consumir los sólidos solubles encontrados en el medio de fermentación. En el caso particular de *S. cerevisiae* se detuvo en los 3.6 °Brix a las 168h de fermentación y de ahí se mantuvo constante, *T. delbrueckii* se detuvo a los 3.9 °Bx y de la misma forma a las 168h de la fermentación y de ahí se mantuvo constante, se observan valores muy similares entre las dos especies, sin embargo *S. cerevisiae* a lo largo de la fermentación tuvo valores más bajos de °Bx que *T. delbrueckii*, lo cual indica que consumió más rápido los sólidos solubles totales, esto se puede observar bien desde la hora 48, donde de un valor de 9.1 pasó a 6.5, mientras que *T. delbrueckii* fue consumiendo los sólidos solubles más lentamente, y de esta manera *S. cerevisiae* llegó a un valor más pequeño de °Brix y esto se puede deber a que tiene una mayor capacidad fermentativa (Barnett, 1992) que *T. delbrueckii*. Respecto a la fermentación mixta se observa que su consumo de sólidos solubles es muy parecido a la fermentación de *S. cerevisiae*, pero es destacable que la fermentación se detuvo antes que las individuales, a las 96h de fermentación, con un valor de 3.8 °Brix.

Tabla 3. °Brix respecto al tiempo en las 3 fermentaciones en medio M11 con fenilalanina.

Tiempo (h)	°Brix		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	Mixta
0	10	10	10
24	9.4	9.6	9.7
48	8	9.1	8.8
72	6.6	8.7	7.8
96	5.3	8.4	6.8
168	3.9	8.2	6.1
192	3.9	7.2	5.6
216	3.9	7	4.8
240	3.9	7	4.8
264	3.9	7	4.8
288	3.9	7	4.8

Los sólidos solubles totales de las fermentaciones en medio M11 con fenilalanina como única fuente de nitrógeno orgánico, se muestran en la Tabla 3, cada fermentación se hizo por duplicado y se obtuvo su promedio para los resultados, se leyeron los °Brix cada 24h horas por duplicado, hasta que se llegó a un valor constante, lo cual indica el final de la fermentación.

De la misma forma, que en el medio M11 se observa que la fermentación individual de *S. cerevisiae* cepa *SCH2* tardó 168h en llegar al final, sin embargo, tanto en el caso individual de *T. delbrueckii* como en la mixta tardaron 216 h en llegar al final de la fermentación. Por lo que el avance de *Torulaspota delbrueckii* fue notablemente lento a lo largo de toda la fermentación, el hecho que *Torulaspota delbrueckii* tarde más en fermentar los azúcares de forma individual puede inducir a un comportamiento igualmente lento al juntarse con *S. cerevisiae* como se observa en la fermentación mixta. Este fenómeno se puede ligar al contenido en nitrógeno ya que este, condiciona la realización de la fermentación alcohólica, tanto en su velocidad como en su culminación (Thailandier *et al.* 2007).

La fermentación de *S. cerevisiae* se detuvo en un valor de 3.9 °Brix, valor muy similar al obtenido en la fermentación M11; *T. delbrueckii* llegó a un valor de 7°Brix, lo cual es contrastante con la fermentación en medio M11 donde obtuvo un valor de 3.9°Bx. Esto indica que *T. delbrueckii* no fue capaz de consumir todos los sólidos solubles disponibles, principalmente azúcar, debido a la fuente de nitrógeno amínico diferente. Respecto a la fermentación mixta, esta se detuvo en un valor de 4.8 °Brix.

El hecho que *T. delbrueckii* solo llegara a 7 °Brix y su fermentación durara 216 h, se puede deber a que la fenilalanina no es un aminoácido muy asimilable para esta levadura, de acuerdo con lo descrito por Mas *et al.* (2013), no todos los aminoácidos son igualmente disponibles para la levadura ya que, los aminoácidos son muy variables como fuentes nitrogenadas ya que mientras algunos son consumidos ávidamente, otros no lo son en absoluto en condiciones anaerobias. Pero esto también va a depender de la especie y cepa de levadura que se utilice (García *et al.*, 2004).

Canonico *et al.* (2017) realizó un estudio en cerveza utilizando diferentes cepas de *S. cerevisiae* y poniéndolas a interaccionar con *T. delbrueckii*, donde al igual que los resultados obtenidos en este proyecto, obtuvo que la cinética de fermentación más lenta fue la del cultivo puro de *T. delbrueckii*.

8.4 Determinación de consumo de azúcar durante la fermentación.

Se cuantificó el consumo de fructosa a lo largo de la fermentación en medio M11 (Gráfico 1) y en medio M11 con fenilalanina (Gráfico2), la cuantificación se realizó mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento, HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

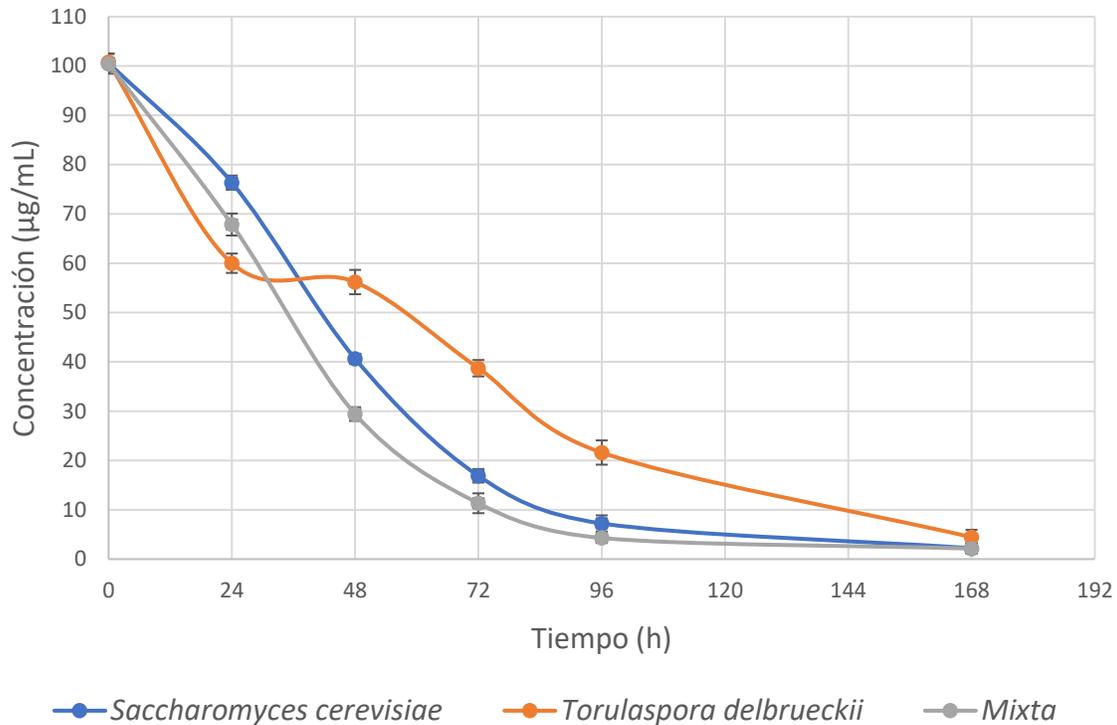


Gráfico 1. Consumo de fructosa en ($\mu\text{g/mL}$) cuantificado mediante HPLC-IR, columna Aminex HPX-87H, con respecto al tiempo durante las tres fermentaciones en medio M11. Cada serie representa el promedio de un duplicado por fermentación, con su respectiva desviación estándar (\pm).

El consumo de fructosa en las seis fermentaciones vistas en los Gráficos 1 y 2, fue disminuyendo conforme aumentaron las horas de fermentación.

En el caso de la fermentación en medio M11 (Gráfico 1) de las tres, la mixta fue la que tuvo un consumo de fructosa más rápido, dado que se consumió mayor fructosa en menor tiempo, obteniendo valores más bajos de fructosa a partir de las 48h y hasta que la fermentación termino, seguida de la de *S. cerevisiae* y la fermentación más lenta fue la de *T. delbrueckii* que difiere mucho de la mixta, ya que de las 24h a 48h casi no se observó ningún cambio en la cantidad de fructosa consumida, teniendo un valor de casi 60 $\mu\text{g/mL}$, en contraste con la fermentación mixta que tenía 30 $\mu\text{g/mL}$ a las 48h. Durante toda la fermentación *T. delbrueckii* fue la que menor fructosa consumió y fue la más lenta.

Tabla 4. Porcentaje de consumo de fructosa en cada fermentación en medio M11.

Fermentación	Fructosa residual	Consumo de fructosa
<i>S. cerevisiae</i>	2.21 µg/mL	97.79 %
<i>T. delbrueckii</i>	4.45 µg/mL	95.55 %
Mixta	2.12 µg/mL,	97.88 %

El porcentaje de consumo de fructosa se realizó considerando que se partió de una concentración inicial de fructosa de 100 µg/mL, como se muestra en el Gráfico1 de consumo de fructosa, cuantificada mediante HPLC, que es equivalente a los 100 g/L de fructosa añadidos al mosto de fermentación. Los cálculos realizados se encuentran en el ANEXO I.

De acuerdo a la Tabla 4, en ninguno de los tres casos se consumió el total del azúcar en la fermentación, sin embargo, quedaron con un valor muy cercano a 0 µg/mL, la fermentación de *S. cerevisiae* cepa *SCH2* llegó a una concentración final de fructosa de 2.21 µg/mL, *T. delbrueckii* tuvo una concentración final de 4.45 µg/mL, siendo esta la que obtuvo mayor cantidad de fructosa residual, y finalmente la mixta que llegó a un valor final de fructosa de 2.12 µg/mL, por lo que la mixta fue la que consumió la mayor cantidad de fructosa de las 3 fermentaciones. Respecto al porcentaje de consumo de fructosa, el mayor porcentaje lo obtuvo la fermentación mixta, que tuvo un porcentaje de consumo muy alto, teniendo valores muy cercanos a la fermentación pura de *S. cerevisiae*, la mayor capacidad fermentativa y de consumo de azúcares por parte de *S. cerevisiae* ya se había descrito anteriormente por Barnett (1992), sin embargo, al poner en conjunto a *T. delbrueckii* con *S. cerevisiae* se observa que hubo un mayor consumo de azúcar, esto se puede deber a la competencia que existe por los nutrientes, ya que de acuerdo con Tronchoni *et al.* (2017) tanto *S. cerevisiae* como las no-*Saccharomyces* pueden modificar su perfil metabólico cuando participan en la misma fermentación, por lo que podrían consumir mayor cantidad de azúcar, esto también se relaciona con que la fermentación terminó en menor tiempo, tomando en cuenta los resultados de los

°Brix de la Tabla 2, y se esperaría que esto tenga una repercusión en la producción de metabolitos durante la fermentación.

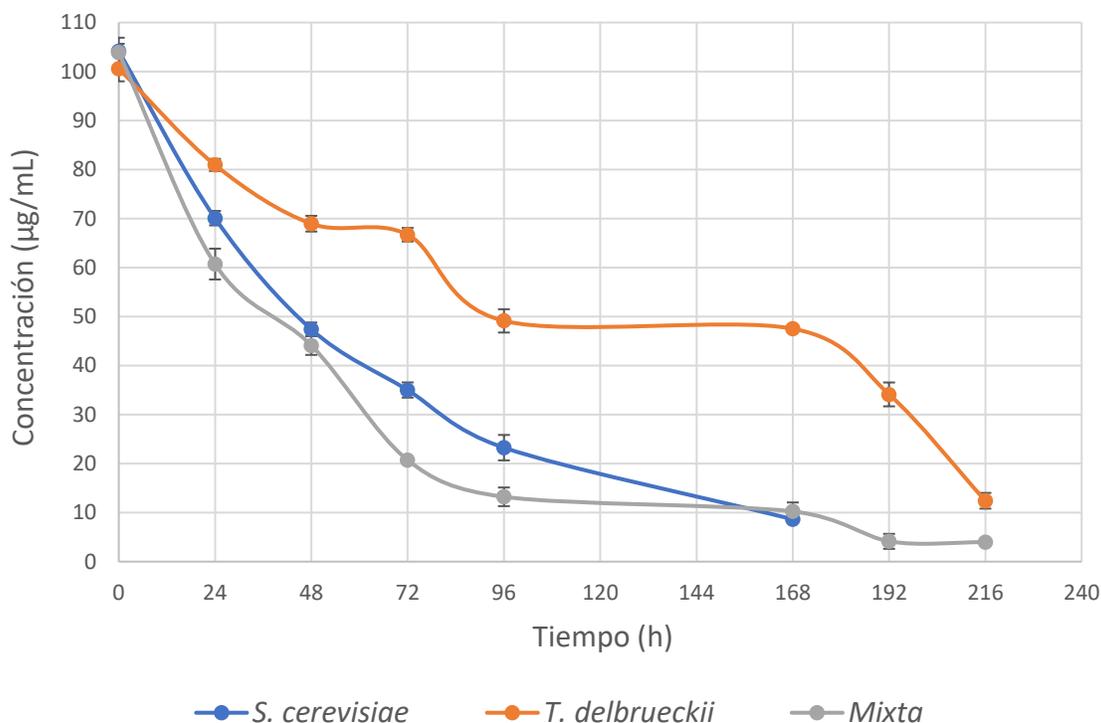


Gráfico 2. Consumo de fructosa en ($\mu\text{g}/\text{mL}$) cuantificado mediante HPLC-IR, columna Aminex HPX-87H Bio-Rad, con respecto al tiempo durante las tres fermentaciones en medio M11 con fenilalanina. Cada serie representa el promedio de un duplicado por fermentación, con su respectiva desviación estándar (\pm).

El Gráfico 2, se observa que *T. delbrueckii* fue la levadura que consumió menor cantidad de fructosa a lo largo de toda la fermentación, contrastando con la fermentación mixta, que fue la que mayor cantidad de azúcar consumió durante toda la fermentación. Esta tendencia también se observa en las fermentaciones realizadas con en medio M11 (Gráfico 1), sin embargo, se aprecia de una manera más marcada con fenilalanina como fuente orgánica de nitrógeno.

Es notable la diferencia de consumo de fructosa al comparar las 96 h de fermentación, donde *T. delbrueckii* consumió apenas la mitad del azúcar disponible, mientras que en la fermentación mixta se tenía $13.23 \mu\text{g}/\text{mL}$, cerca del final de la fermentación. La fermentación individual de *S. cerevisiae* tuvo una duración de 168h, mientras que la individual de *T. delbrueckii* y la mixta tardaron 216h en llegar

al final de la fermentación, a diferencia de la fermentación en medio M11 donde las tres fermentaciones tuvieron una duración de 168h.

El hecho que *T. delbrueckii* haya consumido la fructosa lentamente, confirma los resultados obtenidos en la Tabla 3. °Brix respecto al tiempo en las 3 fermentaciones en medio M11 con fenilalanina, donde se explicó que posiblemente la fenilalanina no es un aminoácido que *T. delbrueckii* consuma ávidamente como fuente de nitrógeno.

Tabla 5. Porcentaje de consumo de fructosa en cada fermentación en medio M11 con fenilalanina como fuente orgánica de nitrógeno.

Fermentación	Fructosa residual	Consumo de fructosa
<i>S. cerevisiae</i>	10.25 µg/mL	89.75%
<i>T. delbrueckii</i>	12.42 µg/mL	87.58%
Mixta	3.97 µg/mL,	96.03%

Realizando la comparación de la cantidad de fructosa residual al final de las tres fermentaciones, al igual que en la fermentación con extracto de levadura (Tabla 4) la fermentación mixta fue la que terminó con menor cantidad de fructosa (3.97 µg/mL) y consecuentemente con un mayor porcentaje en el consumo de fructosa, mientras que *Torulaspora delbrueckii* pura terminó con la mayor cantidad de fructosa residual (12.42 µg/mL) y el menor porcentaje de consumo de fructosa, marcando una diferencia en la capacidad de consumo de este azúcar entre las fermentaciones puras y la mixta, por lo que al utilizar extracto de levadura como fuente de nitrógeno como fenilalanina, sigue existiendo la competencia por los nutrientes en la fermentación mixta de estas levaduras.

Se observa que todas las fermentaciones en medio M11 con fenilalanina terminaron con mayor cantidad de fructosa residual (Tabla 5) que las fermentaciones realizadas en medio M11 con extracto de levadura, y por lo tanto con un porcentaje de consumo de fructosa mucho menor, por lo que las levaduras fueron capaces de consumir mayor cantidad de azúcar, utilizando extracto de levadura como fuente orgánica de nitrógeno, aprovechando mejor la fuente de carbono.

8.5 Análisis del crecimiento microbiológico a lo largo de la fermentación.

Se determinó el crecimiento celular de las levaduras por el método de Miles y Misra (Camacho *et al.*, 2009), cada determinación se hizo por duplicado y se realizó un promedio de los datos obtenidos, los cuales se observan en los Gráficos 3 y 4.

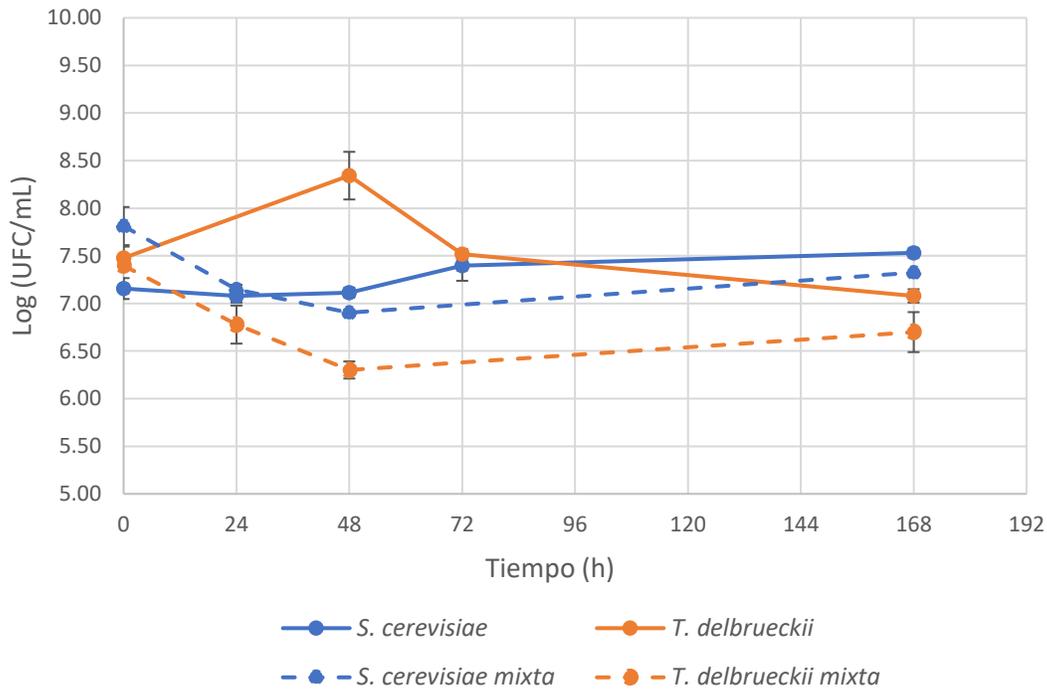


Gráfico 3. Concentración celular determinada por método de Miles y Misra (Camacho *et al.*, 2009), a lo largo de las tres fermentaciones en medio M11. Cada serie representa el promedio \pm de un duplicado por fermentación.

En el Gráfico 3, se muestra el crecimiento de las dos levaduras en sus fermentaciones puras, así como el crecimiento de las dos levaduras en la fermentación mixta, en medio M11 utilizando extracto de levadura como fuente orgánica de nitrógeno. Todas las fermentaciones comenzaron con una concentración celular de 10^7 UFC/mL. Se observa que *T. delbrueckii* en la fermentación individual tuvo un crecimiento de $>10^8$ a las 48 h, sin embargo, disminuyó de nuevo a 10^7 UFC/mL para las 72 h y tuvo una ligera reducción celular al final de la fermentación, pero sin salirse de este rango de concentración. En el caso de *S. cerevisiae* cepa SCH2, en la fermentación pura se observa un ligero aumento en la concentración celular a las 72 h de fermentación, y se mantuvo

constante hasta las 168h de fermentación con un valor de $10^{7.5}$ UFC/mL. En contraste, en la fermentación mixta, *T. delbrueckii* tuvo una notable disminución de 10^6 UFC/mL a las 48h de fermentación, manteniendo su concentración celular por debajo de *S. cerevisiae* a lo largo de toda la fermentación. Llegando a las 168h de la fermentación con una concentración celular de 10^6 UFC/mL. El cambio drástico en la dinámica poblacional observado entre la fermentación individual y la fermentación mixta, indica que el crecimiento de *T. delbrueckii* se ve afectado por la presencia de *S. cerevisiae* cepa SCH2.

Mientras que *S. cerevisiae* así también disminuyó su concentración celular a las 48h, sin embargo, no salió del rango de 10^7 UFC/mL. En ambas fermentaciones se observó un pequeño crecimiento poblacional al final de la fermentación. Estos datos indican que utilizando una inoculación inicial de 10^7 UFC/mL de ambas levaduras, *S. cerevisiae* cepa SCH2, domina la fermentación mixta. Destacando que, en el caso de las fermentaciones individuales, *T. delbrueckii* tuvo mayor incremento en su biomasa utilizando esta fuente de nitrógeno.

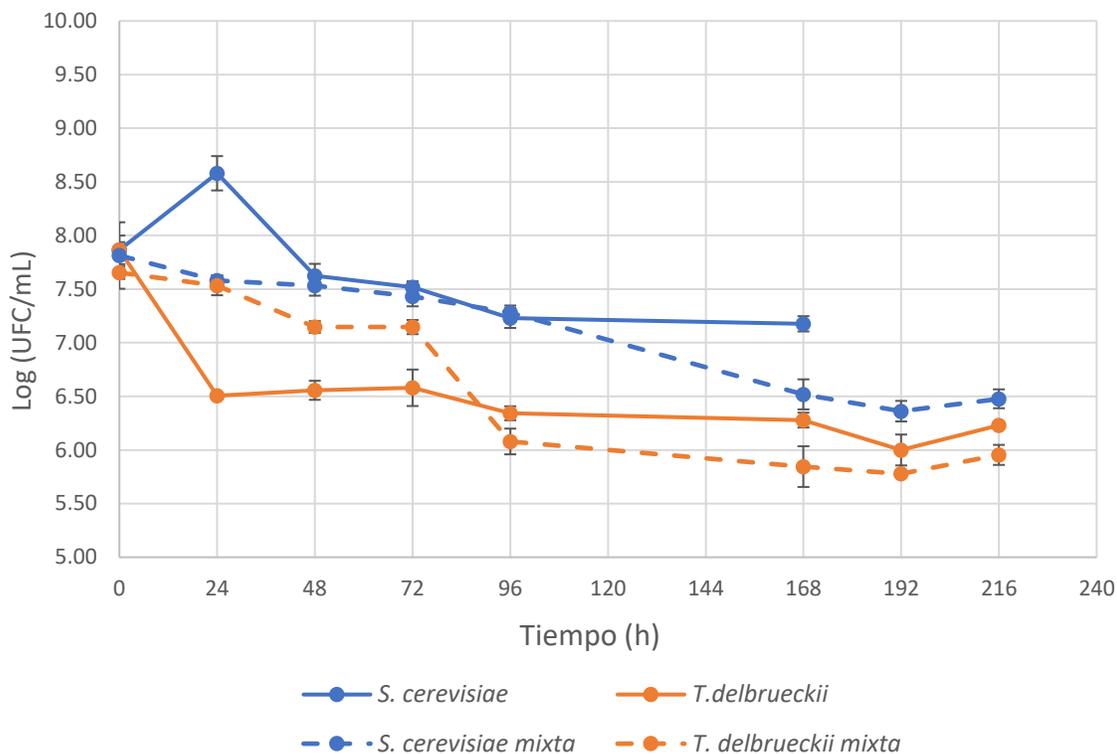


Gráfico 4. Concentración celular determinada por método de Miles y Misra (Camacho *et al.*, 2009), a lo largo de las tres fermentaciones en medio M11 con fenilalanina. Cada serie representa el promedio \pm de un duplicado por fermentación.

En el Gráfico 4, se muestra el crecimiento microbiológico de las levaduras en medio M11 utilizando fenilalanina como fuente orgánica de nitrógeno, al igual que en las fermentaciones realizadas con extracto de levadura, la inoculación inicial de todas las fermentaciones fue de 10^7 UFC/mL. En contraste con lo observado en el Gráfico 3, la fermentación pura de *T. delbrueckii* desde las 24h disminuyó drásticamente a 10^6 UFC/mL manteniéndose por debajo de este valor durante toda la fermentación. Esto indica que la fenilalanina no es un aminoácido muy asimilable para *T. delbrueckii* (Mas *et al.*, 2013), ya que de acuerdo con Thailandier *et al.* (2007) el componente nitrogenado es utilizado por las levaduras para reproducirse (producción de biomasa) durante la fermentación alcohólica y asegurar un número de células suficientes para consumir todos los azúcares del mosto. En este caso *T. delbrueckii* no produjo biomasa con fenilalanina como fuente orgánica de nitrógeno, esto también se ve reflejado en el lento consumo de azúcares observado en el

Gráfico 2. de Consumo de fructosa en ($\mu\text{g/mL}$) con respecto al tiempo durante las 3 fermentaciones en medio M11 con fenilalanina.

Caso contrario, *S. cerevisiae* de forma individual incremento su biomasa alcanzando un valor de $>10^8$, a las 24h de fermentación, disminuyendo de nuevo a 10^7 UFC/mL para las 48h y manteniéndose constante durante la fermentación. Cabe mencionar que la fermentación duró 168h, menos que las otras fermentaciones. Esto nos indica que a diferencia de *T. delbrueckii*, *S. cerevisiae* cepa SCH2 asimila bien la fenilalanina como fuente orgánica de nitrógeno.

El crecimiento de *Torulaspota delbrueckii* en la fermentación mixta no difiere mucho de la individual, puesto que no se observó ningún incremento en su biomasa, sino que, al contrario, hubo una reducción en su concentración celular de casi dos logaritmos a las 168h, alcanzando una concentración final de 10^6 UFC/mL. Por su parte, el crecimiento de *S. cerevisiae* si se vio afectado por la interacción con *Torulaspota delbrueckii*, puesto que difiere de su fermentación pura, disminuyendo notablemente su concentración celular a las 168h a un valor de 10^6 UFC/mL e incrementando la duración de su fermentación hasta 216 h. El hecho de que las células viables de *S. cerevisiae* disminuyeran en la última parte de la fermentación, hace notar la competición progresiva que existe entre esta cepa y *T. delbrueckii*. Sin embargo, al igual que en el caso de la fermentación en medio M11 con extracto de levadura, *S. cerevisiae* dominó la fermentación mixta con fenilalanina como fuente orgánica de nitrógeno.

Finalmente, se puede decir que, tanto en las fermentaciones individuales como en las fermentaciones mixtas en ambos medios de fermentación M11, la tasa de crecimiento fue muy baja. Sin embargo, en el estudio de fermentaciones mixtas de *Torulaspota delbrueckii* y diferentes cepas de *S. cerevisiae* en cerveza, realizado por Canonico *et al.* (2017), también se observa esta dinámica de población, que a pesar de utilizar cepas diferentes de *S. cerevisiae* junto con *T. delbrueckii*, ninguna tuvo una tasa de crecimiento alta.

Además, cabe destacar que en las fermentaciones realizadas por Canonico *et al.* (2017), *T. delbrueckii* dominó la fermentación en todos los casos, contrastando con los resultados obtenidos en este estudio. Lo cual nos indica que la cepa de levadura utilizada, al igual que el radio de inoculación va a ser determinante para la dinámica de crecimiento en las fermentaciones mixtas.

8.6 Cuantificación de la producción de etanol a lo largo de la fermentación, mediante HPLC

Por medio de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, CLAR por sus siglas en español, HPLC (siglas en inglés), se cuantificó la cantidad de etanol producido durante las seis fermentaciones realizadas. Cada fermentación se hizo por duplicado y se sacó un promedio de estas para los resultados, observados en los Gráficos 5 y 6.

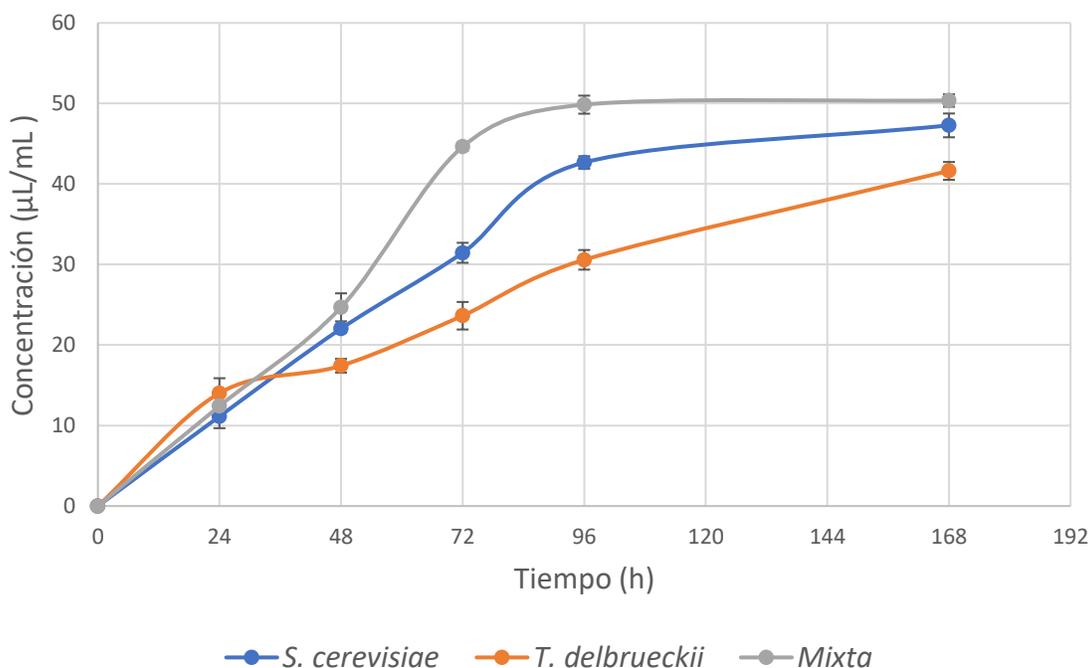


Gráfico 5. Concentración de etanol en (µL/mL) cuantificado mediante HPLC-IR, columna Aminex HPX-87H, con respecto al tiempo durante las tres fermentaciones en medio M11. Cada serie representa el promedio de un duplicado por fermentación, con su respectiva desviación estándar (\pm).

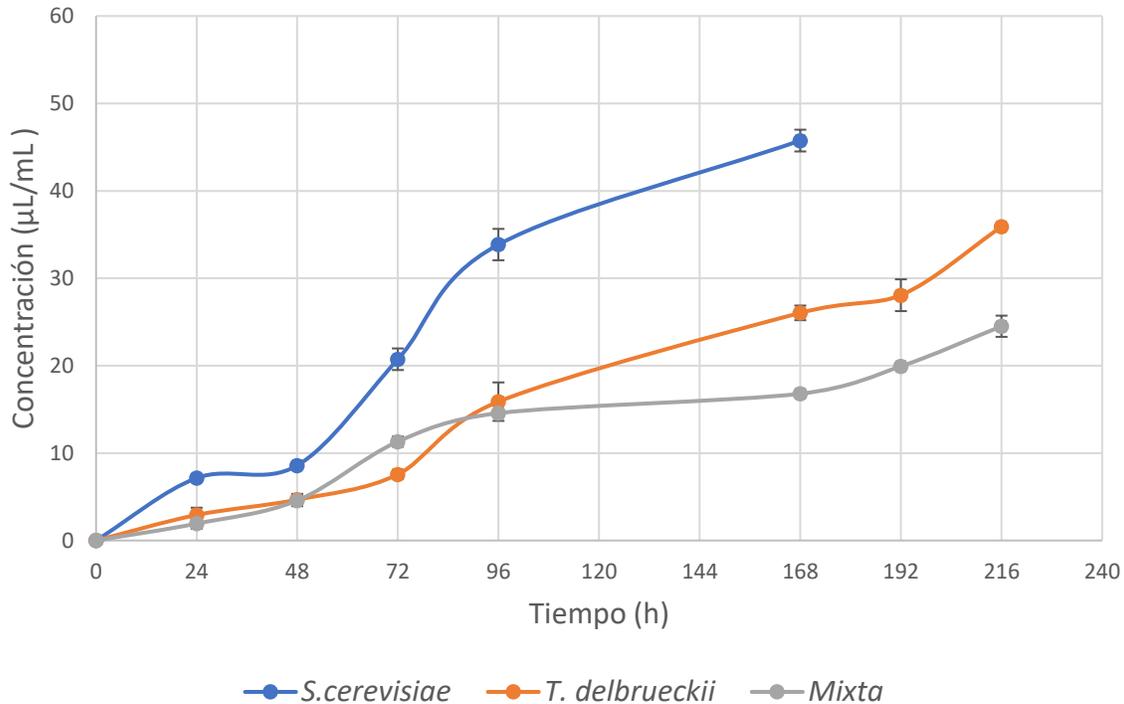


Gráfico 6. Concentración de etanol en (µL/mL) cuantificado mediante HPLC-IR, columna Aminex HPX-87H, con respecto al tiempo durante las tres fermentaciones en medio M 11 con fenilalanina. Cada serie representa el promedio de un duplicado por fermentación, con su respectiva desviación estándar (±).

En el Gráfico 5 se observa que, a partir de las 48h para adelante, la fermentación mixta fue la que produjo significativamente mayor cantidad de etanol en comparación con las otras fermentaciones. Respecto a las fermentaciones puras, *S. cerevisiae* produjo mayor cantidad de alcohol que *T. delbrueckii* a lo largo de toda la fermentación, a excepción de las primeras 24h donde la fermentación de *T. delbrueckii* pura tenía el mayor contenido de etanol de las tres.

El incremento de la concentración de etanol en la fermentación mixta con extracto de levadura (Gráfico 5) afirma la interacción inhibitoria y competencia por los nutrientes que existe entre estas levaduras, ya que de acuerdo con Ciani y Comitini (2015) el etanol es un componente antimicrobiano producido por diferentes especies de levaduras, estas pueden estar involucradas en interacciones a través de la producción de compuestos tóxicos para las células como resultado de la competición por los nutrientes. En términos de interacciones inhibitorias mediadas

por metabolitos con efectos tóxicos, está la producción de etanol. Por lo que en los resultados obtenidos hubo un aumento en la cantidad de este metabolito.

En las fermentaciones con fenilalanina (Gráfico 6) se observa que *S. cerevisiae* pura notablemente produjo la mayor cantidad de etanol durante toda la fermentación, a las 96 h la producción de etanol era significativamente mayor respecto a las otras dos fermentaciones. La producción de altos niveles de alcohol es el principal factor responsable de la dominancia de *S. cerevisiae* sobre las levaduras no-*Saccharomyces* (Pretorius, 2000).

Cabe mencionar que la fermentación de *S. cerevisiae* terminó a las 168h, a diferencia de la mixta y *T. delbrueckii* pura que terminaron a las 216 h. Las especies de *Saccharomyces* son reconocidas por su capacidad para la vigorosa fermentación anaeróbica de azúcares para producir etanol (Barnett, 1992), por lo que efectuó su fermentación de manera más rápida. Así mismo, *S. cerevisiae* posee una mayor capacidad fermentativa y de consumo de azúcares que *Torulaspora delbrueckii* (Ramírez y Velázquez, 2018).

La fermentación de *T. delbrueckii* pura y la fermentación mixta tuvieron un comportamiento similar hasta las 96 h de fermentación, a partir de esta hora en adelante *T. delbrueckii* produjo mayor cantidad de etanol.

Tabla 6. Rendimiento de etanol de las fermentaciones efectuadas en medio M11 y M11 con fenilalanina

Fermentación	Rendimiento (%) medio M11	Rendimiento (%) medio M11 con fenilalanina
<i>S. cerevisiae</i>	92.47	89.47
<i>T. delbrueckii</i>	81.40	70.21
Mixta	98.51	47.93

*Los cálculos realizados para el rendimiento se encuentran en ANEXO I.

Se obtuvo el rendimiento de la producción de etanol de cada una de las fermentaciones realizadas tanto en medio M11 con extracto de levadura como en medio M11 con fenilalanina, mostrados en la Tabla 6. Para esto, se calculó el

rendimiento teórico de etanol, donde se obtuvo que la máxima cantidad posible de etanol generado en la reacción es de 51.13 $\mu\text{L}/\text{mL}$, tomando en cuenta que se partió de una concentración inicial de fructosa de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como se indica en el Grafico 1 y 2 de consumo de fructosa, cuantificada mediante HPLC, que es equivalente a los 100 g /L de fructosa añadidos inicialmente al mosto de fermentación. Los cálculos realizados para el rendimiento de etanol se encuentran en el ANEXO I.

Partiendo de esto, el etanol cuantificado al final de la reacción no debe ser mayor al valor obtenido de rendimiento teórico (51.13 $\mu\text{L}/\text{mL}$), esto concuerda con los resultados mostrados en los Gráficos 5 y 6, donde en ninguna fermentación la cantidad de etanol sobrepasa el rendimiento teórico. En la fermentación de medio M11 con extracto de levadura (Gráfico 5), se observa que notablemente la fermentación mixta fue la que produjo mayor cantidad de etanol al final de la fermentación siendo esta de 50.37 $\mu\text{L}/\text{mL}$, seguida de *S. cerevisiae* cepa SCH2 que llegó a una cantidad de etanol de 47.28 $\mu\text{L}/\text{mL}$, y al final *T. delbrueckii* que produjo 41.62 $\mu\text{L}/\text{mL}$, con esto se comprobó lo descrito anteriormente por Benito (2018) en su estudio en vinos, donde afirma que *T. delbrueckii* se puede utilizar para producir una menor concentración de etanol.

En contraste con el Gráfico 5, la fermentación mixta en medio M11 con fenilalanina (Gráfico 6) fue la que produjo menor cantidad de etanol de todas las fermentaciones realizadas, siendo esta cantidad de 24.51 $\mu\text{L}/\text{mL}$, lo cual puede ser útil para las fermentaciones donde se busque una menor cantidad de este metabolito, ya que existe una nueva tendencia hacia las bebidas fermentadas con contenido reducido de etanol (Wilkinson y Jiranck, 2013), debido a que demasiado etanol puede comprometer la calidad del producto y el consumo excesivo de alcohol se asocia con varios problemas de salud (Dzialo *et al.*, 2017). Se ha estudiado anteriormente el uso de levaduras no-*Saccharomyces* para disminuir el grado alcohólico en vinos (Morales *et al.*, 2015).

En el Grafico 6, también se observa que en el medio M11 con fenilalanina, *S. cerevisiae* pura fue la fermentación que produjo mayor cantidad de alcohol (45.75 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y al final *T. delbrueckii* pura con una cantidad de 35.90 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de etanol. La

reducción del contenido de etanol en la fermentación pura de *Torulaspota delbrueckii* se debe a que al ser una levadura no-*Saccharomyces* posee una baja eficiencia en la fermentación alcohólica (Contreras *et al.*, 2014; Gobbi *et al.*, 2014; Quirós *et al.*, 2014).

De manera general, en las fermentaciones en medio M11 con fenilalanina se obtuvieron cantidades menores de etanol a las observadas en el medio M11 con extracto de levadura.

En la Tabla 6, se muestran los rendimientos de etanol de las fermentaciones efectuadas en medio M11 con extracto de levadura y M11 con fenilalanina, donde se observa que el mayor rendimiento fue el de la fermentación mixta con extracto de levadura con un 98.51% de producción de etanol. Contrastantemente la fermentación mixta con fenilalanina fue la que menor rendimiento tuvo con un 47.93% de producción de etanol. De acuerdo con Ivey *et al.* (2013) y Oro *et al.* (2014) durante las fermentaciones mixtas, el uso de diferentes fuentes de nitrógeno puede influenciar el dominio de una especie de levadura en la competencia por los nutrientes, por lo que se infiere que esta diferencia en la producción de etanol es debida al cambio de la fuente de nitrógeno amínico en el mosto.

Sin embargo, de manera general el rendimiento de etanol de todas las fermentaciones, a excepción de la mixta con fenilalanina, fue alto. Esto se puede deber a que la tasa de crecimiento de todas las fermentaciones fue muy baja (Gráficos 3 y 4), así que no se generó una cantidad significativa de biomasa, por lo que todo se pudiera haber transformado en producto. De acuerdo con Alves *et al.* (2007) *S. cerevisiae* muestra un menor rendimiento de biomasa a bajas tensiones de oxígeno con respecto a *T. delbrueckii*, posible razón por la que *S. cerevisiae* tuvo un mayor rendimiento de etanol.

Es importante tomar en cuenta que las fermentaciones se dieron en condiciones anaerobias, de acuerdo con Morales *et al.* (2015), las fermentaciones en condiciones anaerobias generan mayor cantidad de etanol que las que se dan en condiciones aerobias, por lo que es un factor importante por la que se pudo haber tenido un alto rendimiento de etanol en las fermentaciones efectuadas.

8.7 Cuantificación de la producción de glicerol a lo largo de la fermentación, mediante HPLC

Por medio de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, CLAR, se cuantificó la cantidad de glicerol producida durante las seis fermentaciones realizadas. Cada fermentación se hizo por duplicado y se sacó un promedio de estas para los resultados, se monitoreo la producción de glicerol cada 24h a lo largo de cada fermentación, tanto en medio M11 como en medio M11 con fenilalanina.

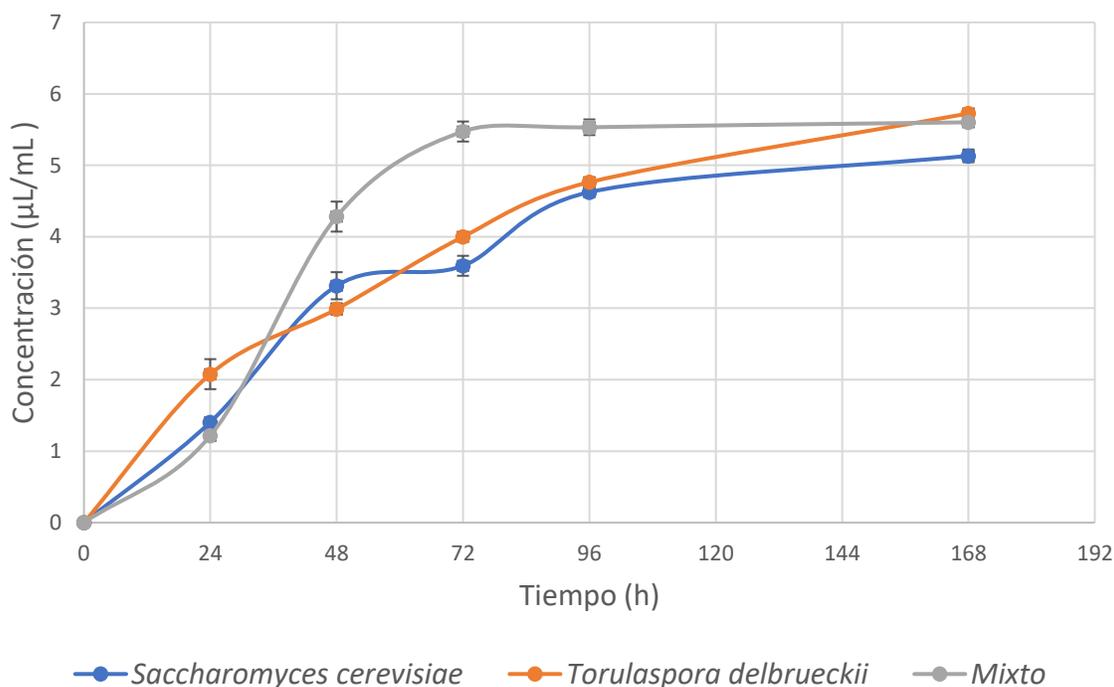


Gráfico 7. Producción de glicerol en ($\mu\text{L}/\text{mL}$) con respecto al tiempo de las tres fermentaciones en medio M11, cuantificado mediante HPLC-IR, columna Aminex HPX-87H. Cada serie representa el promedio de un duplicado por fermentación, con su respectiva desviación estándar (\pm).

En el Gráfico 7, se muestra como fue la producción de glicerol durante la fermentación en medio M11 de las tres primeras fermentaciones cada 24h, donde se observa que *T. delbrueckii* fue la levadura que produjo mayor cantidad de glicerol ($5.73 \mu\text{L}/\text{mL}$) al final de la fermentación a las 168h, este valor es muy cercano al de la fermentación mixta que fue de $5.60 \mu\text{L}/\text{mL}$ al final de la fermentación, y estas dos cantidades a su vez, difieren de la cantidad de glicerol producido por *S. cerevisiae* ($5.13 \mu\text{L}/\text{mL}$). De acuerdo con lo mencionado por Benito (2018) *T. delbrueckii*

incrementa la cantidad de glicerol en las fermentaciones, lo cual concuerda con lo encontrado en los resultados, donde se observa que, tanto en la fermentación individual como en la fermentación mixta, *T. delbrueckii* si incrementó la cantidad de glicerol, en comparación con la fermentación individual de *S. cerevisiae*.

De acuerdo con lo descrito por Escalante *et al.* (2012), el glicerol brinda un sabor dulce y da cuerpo a la bebida fermentada, por lo que se esperaría que la fermentación mixta y la individual de *T. delbrueckii*, al tener mayor cantidad de glicerol posean un sabor más dulce y con mayor cuerpo.

El incremento de glicerol en la fermentación mixta se puede deber a un cambio en el metabolismo de las levaduras cuando se encuentran de manera conjunta, de acuerdo con lo descrito por Mairoella *et al.* (1984) el glicerol es producido como respuesta al estrés osmótico. Tijerina *et al.* (2014) afirma que los hongos pueden sintetizar solutos en respuesta al estrés osmótico para mantener la turgencia celular y mantener el metabolismo enzimático; el glicerol es el soluto compatible de mayor producción en los hongos dado que es una molécula pequeña de tres átomos de carbono que representa una estrategia de ahorro de energía para el mantenimiento de la presión osmótica y la turgencia, esto podría explicar el porqué del aumento de glicerol en esta fermentación.

Por otro lado, es destacable que en la fermentación mixta la producción de la cantidad de glicerol fue más rápida que las fermentaciones individuales, ya que desde las 48h hubo un notable incremento en la concentración de glicerol, y a partir de las 72h llegó a una concentración muy alta a comparación de las demás (5.5 $\mu\text{L/mL}$) y se mantuvo casi constante, es decir se produjo la mayor cantidad de glicerol en menor tiempo que en las fermentaciones individuales, lo cual se puede ligar con lo observado en el Grafico 5 de producción de etanol en medio M11, donde la concentración de etanol tuvo la misma tendencia de producción.

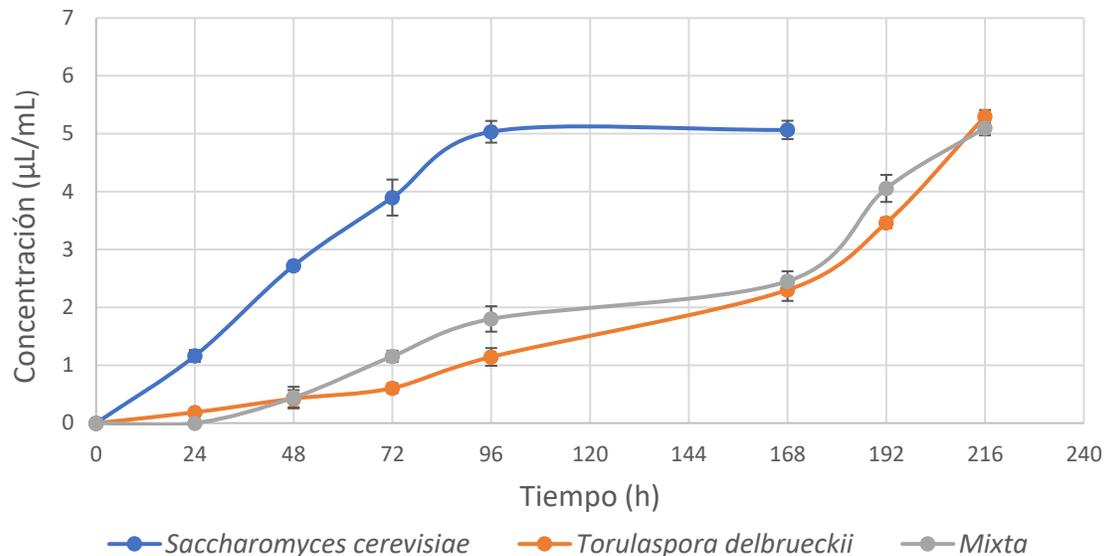


Gráfico 8. Producción de glicerol en ($\mu\text{L}/\text{mL}$) con respecto al tiempo de las tres fermentaciones en medio M11 con fenilalanina, cuantificado mediante HPLC-IR, columna Aminex HPX-87H. Cada serie representa el promedio de un duplicado por fermentación, con su respectiva desviación estándar (\pm).

La producción de glicerol en medio M11 con fenilalanina como fuente orgánica de nitrógeno, se muestra en el Gráfico 8, donde se observa que *T. delbrueckii* pura tuvo la mayor producción de 5.3 $\mu\text{L}/\text{mL}$, mientras que la fermentación mixta y *S. cerevisiae* pura produjeron casi la misma cantidad de glicerol de 5.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 5.06 $\mu\text{L}/\text{mL}$ respectivamente. Estos valores fueron muy parecidos a los obtenidos en la fermentación en medio M11 con extracto de levadura (Gráfico 7), sin embargo, las fermentaciones en medio M11 produjeron un poco más de glicerol, esto se debe a la diferente fuente de nitrógeno utilizada, ya que la producción de glicerol depende de factores como el nitrógeno del medio (Lozano y Muñoz, 1988; Gardner *et al.*, 1993), por lo que se puede inferir que la fuente de nitrógeno orgánico utilizado afecta la cantidad de glicerol producido.

Se puede inferir que el uso de fenilalanina como única fuente orgánica de nitrógeno no fue favorable para la producción de glicerol tanto en la fermentación individual de *T. delbrueckii* como para la fermentación mixta, ya que independientemente de la concentración final de glicerol, su producción a lo largo de la fermentación fue muy lenta, en comparación con la fermentación pura de *S. cerevisiae* que obtuvo

valores de concentración más altos, esta diferencia se observa desde las 24h hasta las 168h de fermentación.

8.8 Determinación y cuantificación de compuestos congénicos al final de la fermentación.

Se identificaron y cuantificaron los alcoholes superiores y ésteres de acetato encontrados al final de cada fermentación en medio M11 con extracto de levadura y en medio M11 con fenilalanina. Cada fermentación se hizo por duplicado y se obtuvo su promedio para los resultados, representados en los Gráficos 9-12. La determinación y cuantificación se realizó mediante cromatografía de gases. Se realizó una curva patrón para los compuestos solubles en agua, y otra para los no solubles en agua, los cuales se solubilizaron en etanol.

Los compuestos solubles en agua encontrados fueron: etil lactato, 1-propanol, 2-butanol y metanol. Y los compuestos no solubles en agua encontrados fueron: 2-fenil etanol, 2-fenilacetato, isoamil acetato, 2-metil-1-propanol y 2 metil-1-butanol.

8.8.1 Cuantificación de alcoholes superiores encontrados al final de la fermentación, mediante cromatografía de gases.

Los alcoholes superiores encontrados al final de cada fermentación en medio M11 con extracto de levadura y en medio M11 con fenilalanina, se muestran en el Gráfico 9 y 10 respectivamente.

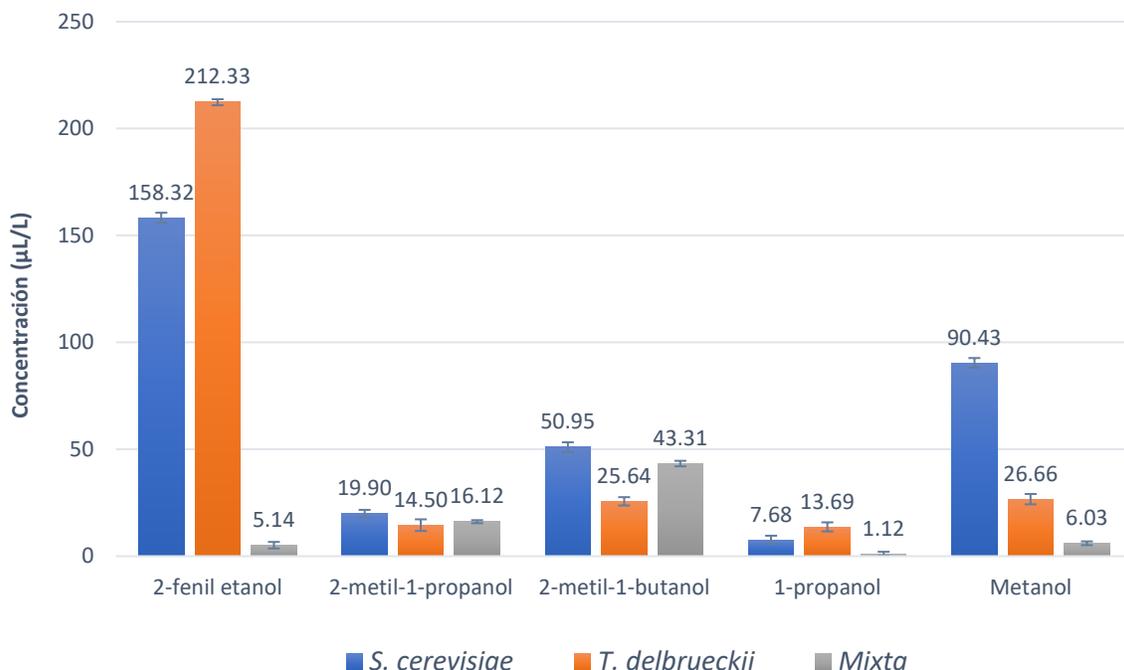


Gráfico 9. Concentración en (μL/L) de los alcoholes superiores encontrados al final de cada fermentación en medio M11, cuantificados mediante cromatografía de gases, mediante un detector de ionización de flama (FID). Cada barra representa el promedio de un duplicado por fermentación, con su respectiva desviación estándar (±).

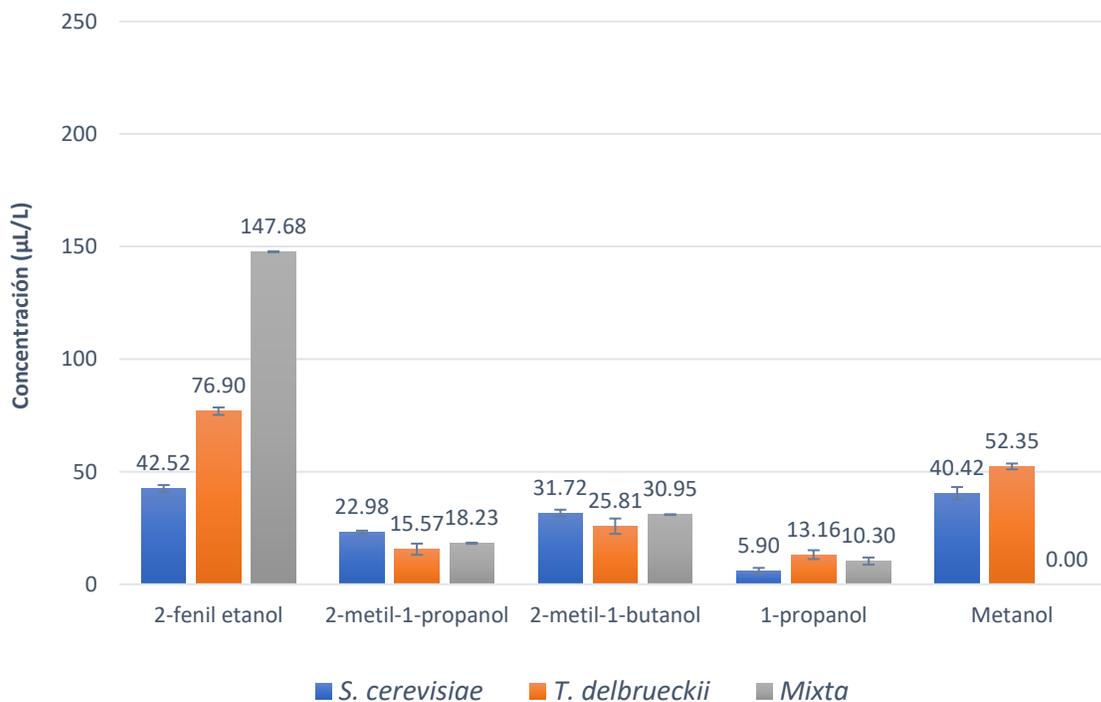


Gráfico 10. Concentración en (μL/L) de los alcoholes superiores encontrados al final de cada fermentación en medio M11 con fenilalanina, cuantificados mediante cromatografía de gases,

mediante un detector de ionización de flama (FID). Cada barra representa el promedio de un duplicado por fermentación, con su respectiva desviación estándar (\pm).

Los alcoholes superiores encontrados al final de las seis fermentaciones en medio M11 con extracto de levadura y con fenilalanina como fuente orgánica de nitrógeno fueron: 2-fenil etanol (aroma a rosas, floral), 2-metil-1-propanol, también llamado isobutanol (aroma alcohólico, pungente) , 2-metil-1-butanol, también llamado alcohol amílico (aroma a rosas), 1-propanol (aroma disolvente, pungente) (Escalante *et al.*, 2012; Zumárraga y Barbero, 2014) y metanol, mostrados en los Gráficos 9 y 10 respectivamente.

Algunos de los alcoholes superiores detectados en el jugo de fermentación del Sotol son: 2-fenil etanol, limoneno, alcohol isoamílico, 3-metil 2-butanol, 4-metil-1-butanol, metanol, propanol, 2-metil-1-propanol y 3-metil-1-butanol (López y Guevara, 2001; Flores *et al.*, 2019). Por lo que varios alcoholes superiores presentes en el Sotol también fueron encontrados en las fermentaciones realizadas en el medio sintético M11.

Se ha mencionado anteriormente por Basso *et al.* (2016), Etschmann *et al.* (2015) y Pires *et al.* (2014), la producción de diferentes aromas frutales, como β -fenil etanol, n-propanol, isobutanol y alcohol amílico por parte de *T. delbrueckii*, lo cual se comprueba con los resultados obtenidos.

En la fermentación con extracto de levadura (Gráfico 9), las fermentaciones puras, tanto *S. cerevisiae* cepa *SCH2* como *T. delbrueckii*, produjeron una mayor cantidad de 2-fenil etanol, seguido de metanol, 2-metil-1-butanol (alcohol amílico), 2-metil-1-propanol (isobutanol) y al final 1-propanol. En la fermentación mixta hubo una mayor producción de alcohol amílico, seguido de isobutanol, metanol, 2-fenil etanol, y por último 1-propanol. Lo cual significa que el perfil aromático fue parecido en las dos fermentaciones puras, predominando el olor a rosas. A diferencia de la fermentación mixta, donde el perfil aromático cambió respecto a las individuales, al no tener la misma proporción de los alcoholes superiores.

En las fermentaciones con fenilalanina (Gráfico 10), en las puras se observa la misma proporción de alcoholes superiores que en las fermentaciones con extracto

de levadura. Sin embargo, la mixta si difiere en la proporción de compuestos producidos con respecto a la mixta con extracto de levadura, donde la mayor proporción fue de 2-fenil etanol, seguido de alcohol amílico, isobutanol y 1-propanol. Por lo tanto, el perfil aromático no solo depende de la interacción entre levaduras, sino que también del medio de fermentación.

Notablemente en la fermentación mixta en medio M11 con fenilalanina no se produjo metanol, en contraste con las fermentaciones puras, esto puede ser útil para las fermentaciones donde no se quiere la presencia de metanol, debido a que puede llegar a ser altamente tóxico, dependiendo de la cantidad ingerida, puede provocar desde una embriaguez, hasta una ceguera o la muerte (Ruiz, 2017).

De manera general, en la fermentación mixta con extracto de levadura (Gráfico 9) se observó un incremento de la cantidad de 2-metil-1-propanol y 2-metil-1-butanol con respecto a la fermentación pura de *T. delbrueckii*, pero no se observó ningún incremento de ningún alcohol con respecto a la pura de *S. cerevisiae*. En la fermentación mixta con fenilalanina (Gráfico 10) se observó un incremento en los alcoholes 2-fenil etanol, isobutanol y alcohol amílico al comparar con la fermentación pura de *T. delbrueckii*. Asimismo, la cantidad de 1-propanol incrementó en la fermentación mixta con respecto a la fermentación pura de *S. cerevisiae*.

Ambas levaduras produjeron los mismos alcoholes superiores, pero en diferentes cantidades, los compuestos producidos concuerdan con lo encontrado en la literatura, ya que *T. delbrueckii* se caracteriza por producir diferentes aromas frutales, como β -fenil etanol, n-propanol, isobutanol, alcohol amílico (Basso *et al.*, 2016; Etschmann *et al.*, 2015; Pires *et al.*, 2014).

En el Gráfico 9 y 10 se observa que el alcohol superior más abundante en las fermentaciones de ambos medios fue el 2 -fenil etanol. En medio M11 con extracto de levadura (Gráfico 9), hubo mayor producción de este alcohol en la fermentación pura de *T. delbrueckii* (212.33 $\mu\text{L/L}$), mientras que *S. cerevisiae* pura produjo (158.32 $\mu\text{L/L}$) y la menor producción de 2-fenil etanol se dio en la fermentación mixta (5.14 $\mu\text{L/L}$). En contraste, en medio M11 con fenilalanina (Gráfico 10), la mayor

producción de 2-fenil etanol se obtuvo en la fermentación mixta (147.68 $\mu\text{L/L}$), seguida de la fermentación pura de *T. delbrueckii* (76.90 $\mu\text{L/L}$) y al final la de *S. cerevisiae* cepa SCH2 (42.52 $\mu\text{L/L}$).

El hecho de que en la fermentación mixta en medio M11 con fenilalanina, se haya dado notablemente la mayor producción de 2-fenil etanol indica un efecto sinérgico entre estas dos levaduras, al incrementar el nivel de este metabolito (Ciani y Comitini, 2015; Ivey *et al.*, 2013), dando así, una interacción positiva entre estos dos géneros de levadura, utilizando fenilalanina como fuente orgánica de nitrógeno. A diferencia de la fermentación mixta en medio M11 con extracto de levadura, donde la producción de este metabolito por *T. delbrueckii* se ve afectada por la presencia de *S. cerevisiae*, dando como resultado un efecto negativo (Ciani y Comitini, 2015), al existir la marcada reducción de la cantidad de 2-fenil etanol.

En la realización del vino, se ha demostrado que el uso de *T. delbrueckii* en fermentaciones mixtas con *S. cerevisiae* aumenta la cantidad de β -fenil etanol (Comitini *et al.*, 2011; Azzolini *et al.*, 2015), esto concuerda con los resultados obtenidos en medio M11 con fenilalanina, y contrasta con los resultados obtenidos en medio M11 con extracto de levadura que mostraron una tendencia opuesta. Sin embargo, también existen estudios por Canonico *et al.* (2016) y Canonico *et al.* (2017) en cerveza donde el uso conjunto de estas dos levaduras disminuye la cantidad de β -fenil etanol, como es el caso del medio M11 con extracto de levadura.

Por lo que se puede inferir que la interacción que exista entre estas levaduras está relacionada con la composición del medio de fermentación, ya que no siempre se comportarán de la misma forma y por lo tanto esto afectará la producción de metabolitos.

De acuerdo con el Esquema 2. La ruta de Ehrlich (Dzialo *et al.*, 2017), la fenilalanina es el precursor directo del 2-fenil etanol, por lo que, al ser la única fuente amínica de nitrógeno en el medio, se esperaba tener una mayor cantidad de este alcohol superior, observándose notablemente este fenómeno en la fermentación mixta. Lo cual concuerda con lo mencionado anteriormente por Mas *et al.* (2013) que describió que la mayoría de las fuentes nitrogenadas del mosto (amonio y aminoácidos) son

a su vez precursores aromáticos, determinando igualmente la calidad aromática. Esto se comprobó en el presente estudio ya que, al cambiar la fuente de nitrógeno, la calidad aromática también cambió.

El aumento del nivel de 2-fenil etanol en la fermentación mixta, observados en el Gráfico 10, se puede deber a que la fenilalanina es un nutriente más escaso que el extracto de levadura, ya que el extracto de levadura al ser un autolisado de células de levaduras, se compone de un conjunto de aminoácidos y vitaminas, especialmente complejo B y otros factores de crecimiento (MCD-LAB, 2020). En cambio, la fenilalanina es únicamente un aminoácido, por lo que al ser menor la cantidad de aminoácidos la competencia por los nutrientes podría aumentar y por lo tanto la producción de 2-fenil etanol también aumentar, esto conlleva un cambio en el metabolismo en las levaduras (Tronchoni *et al.*, 2017), de igual forma, este fenómeno se observó anteriormente en los otros parámetros realizados en el presente estudio.

Además, varios alcoholes superiores como el 2-fenil etanol, pueden actuar como moléculas quorum-sensing en levaduras, y con esto regular algunas actividades fisiológicas como la adquisición de nutrientes (March y Eiros, 2013), lo cual concuerda con lo descrito anteriormente, en el aumento de este metabolito en la fermentación mixta. De la misma manera, se ha especulado que estas moléculas quorum-sensing pueden tener un papel a nivel poblacional ya que pueden influir en el establecimiento de comunidades microbianas en fermentaciones semi-espontáneas (Ciani y Comitini, 2015). Mediante este mecanismo las levaduras pueden conocer su concentración en un ambiente determinado y decidir el momento en el que se va a poner en marcha la expresión de un determinado conjunto de genes con el fin de desarrollar una respuesta concreta y de forma simultánea (March y Eiros, 2013).

Adicionalmente, en un estudio realizado por Chen y Fink (2006) se ha visto que los alcoholes aromáticos triptófol y fenil etanol estimulan la transición de *S. cerevisiae* a la forma filamentosa en respuesta bajos niveles de nitrógeno, a manera de protección.

Por lo que se comprobó lo descrito anteriormente por He *et al.* (2014), donde se menciona que la competencia entre levaduras por el uso de nitrógeno asimilable en fermentaciones mixtas podría tener un papel importante en la formación de alcoholes superiores, puesto que al cambiar la fuente de nitrógeno en este estudio, se cambiaron los nutrientes del medio de fermentación, y con esto probablemente aumentó la competencia por los nutrientes, cambiando así el metabolismo de las levaduras en la fermentación mixta (Tronchoni *et al.*, 2017) y de esta manera, modificando la composición final de los compuestos congenéricos, en este caso de alcoholes superiores.

Por lo tanto, la concentración de alcoholes superiores si se ve afectada por la fuente de nitrógeno en el medio, lo cual concuerda con los mencionado anteriormente por Dzialo *et al.* (2017) que describió que la concentración de cada compuesto se ve dramáticamente afectada por la composición del medio, especialmente por la fuente de carbono y de nitrógeno.

8.8.2 Cuantificación de ésteres encontrados al final de la fermentación, mediante cromatografía de gases.

Los ésteres de acetato encontrados al final de cada fermentación en medio M11 con extracto de levadura y en medio M11 con fenilalanina, se muestran en el Gráfico 11 y 12 respectivamente.

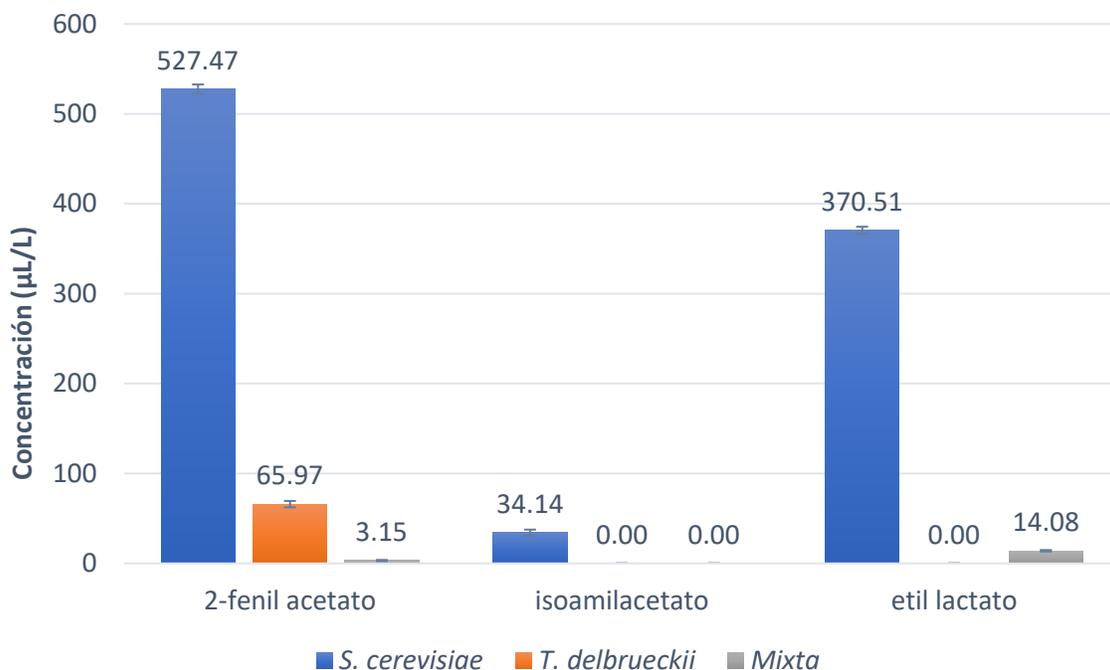


Gráfico 11. Concentración de los ésteres de acetato en (µL/L) cuantificados mediante cromatografía de gases, mediante un detector de ionización de flama, encontrados al final de cada fermentación en medio M11. Cada barra representa el promedio de un duplicado por fermentación, con su respectiva desviación estándar (±).

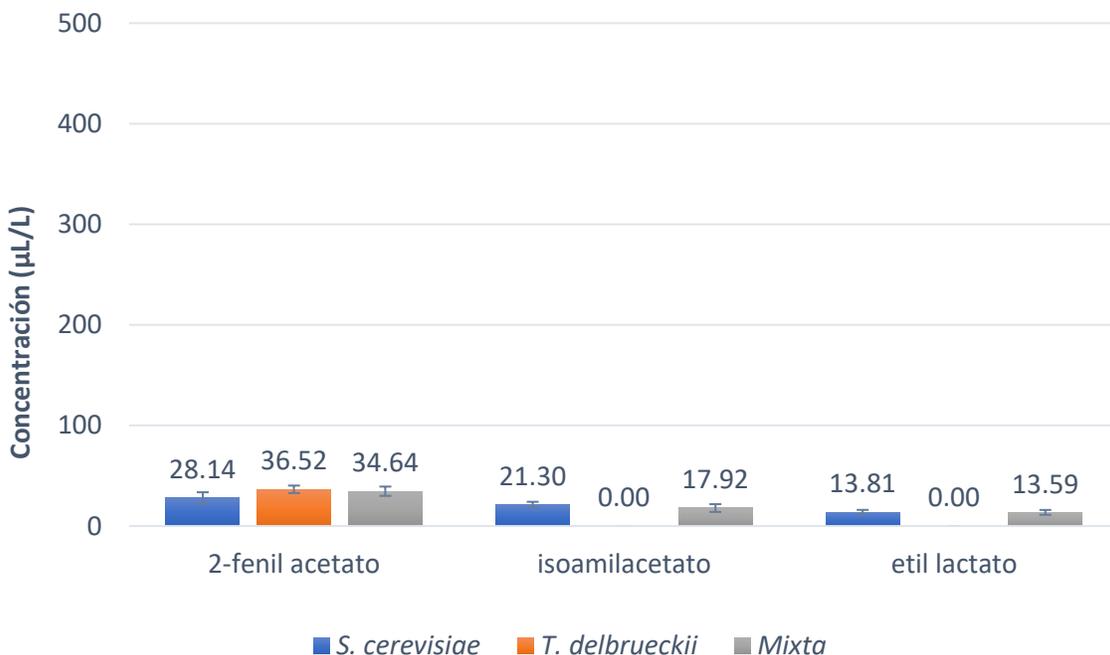


Gráfico 12. Concentración de los ésteres de acetato en (µL/L) cuantificados mediante cromatografía de gases, mediante un detector de ionización de flama, encontrados al final de cada fermentación en medio M11 con fenilalanina. Cada barra representa el promedio de un duplicado por fermentación, con su respectiva desviación estándar (±).

Los ésteres de acetato encontrados al final de las seis fermentaciones en medio M11 con extracto de levadura y con fenilalanina como fuente orgánica de nitrógeno fueron: 2-fenil acetato (aroma floral, miel, dulce), isoamilacetato (aroma a plátano, piña), y etil lactato (aroma frutal) (Pires *et al.*, 2014; Dzialo *et al.*, 2017), mostrados en los Gráficos 11 y 12 respectivamente.

Algunos de los ésteres de acetato detectados en el jugo de fermentación del sotol son: isoamilacetato, etil acetato, fenil acetato, y acetato de geranilo (Flores *et al.*, 2019). Por lo que dos de estos ésteres encontrados en el Sotol, también fueron encontrados en las fermentaciones realizadas en el medio sintético M11.

En el Gráfico 11, se muestran los ésteres encontrados en la fermentación con extracto de levadura como fuente orgánica de nitrógeno, donde se observa que *S. cerevisiae* cepa SCH2 produjo la mayor cantidad de ésteres de acetato con respecto a la fermentación pura de *T. delbrueckii* y la fermentación mixta. La fermentación pura de *T. delbrueckii* solo produjo 2-fenil acetato (65.97 $\mu\text{L/L}$). A diferencia de *S. cerevisiae* pura, que produjo una alta cantidad de 2-fenil acetato (527.47 $\mu\text{L/L}$) y de etil lactato (370.51 $\mu\text{L/L}$), seguido de isoamil acetato (34.14 $\mu\text{L/L}$). De esta manera, en la fermentación mixta, se observa que la presencia de *T. delbrueckii* afecta la producción de ésteres por *S. cerevisiae* cepa SCH2, ya que disminuyó significativamente la cantidad de estos, donde destaca el 2-fenil acetato que pasó de 527.47 $\mu\text{L/L}$ a un valor de 3.15 $\mu\text{L/L}$, en el caso del isoamil acetato inhibió su producción y disminuyó la cantidad de etil lactato a 14.08 $\mu\text{L/L}$. Esto indica un efecto negativo en la interacción entre estas dos levaduras, al existir la marcada reducción de los niveles de ésteres de acetato presentes en la fermentación, lo cual es contrastante con lo mencionado por Herraiz *et al.* (1990) que describió que la inoculación mixta *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* incrementa la concentración total de ésteres, en relación con la inoculación de *S. cerevisiae*.

Además, Benito (2018) afirmó que *T. delbrueckii* aumenta las cantidades de compuestos aromáticos como ésteres frutales en vinos, sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos, *T. delbrueckii* si bien produjo un éster no aumento la cantidad de este, pero es importante mencionar que en el Gráfico 12, se observa

que produjo una mayor cantidad de 2-fenil acetato que la fermentación de *S. cerevisiae* pura y la fermentación mixta.

En el Gráfico 12 es destacable el decremento de la cantidad de todos los ésteres cuantificados en la fermentación pura de *S. cerevisiae*, con respecto a la fermentación con extracto de levadura, sobre todo de 2-fenil acetato (28.14 $\mu\text{L/L}$) y de etil lactato (13.81 $\mu\text{L/L}$). Por otro lado, se observa la tendencia opuesta en la fermentación mixta, donde la cantidad de 2-fenil acetato aumentó con respecto a las fermentaciones efectuadas en medio M11 con extracto de levadura, durante las fermentaciones mixtas, el uso de diferentes fuentes de nitrógeno puede influenciar el dominio de una especie de levadura en la competencia por los nutrientes y con esto afectar la interacción entre las levaduras (Ivey *et al.*, 2013; Oro *et al.*, 2014).

Cabe destacar que en la fermentación mixta en M11 con fenilalanina si se produjo isoamilacetato (17.92 $\mu\text{L/L}$), sin embargo, no fue mayor a la cantidad producida por la fermentación de *S. cerevisiae* pura, esto es contrastante con lo mostrado por Canonico *et al.* (2017) en sus estudios con cerveza, donde menciona que el isoamilacetato aumenta en la fermentación mixta de *T. delbrueckii* con *S. cerevisiae*.

Es importante destacar que en los dos medios de fermentación *T. delbrueckii* no produjo ningún éster más que 2-fenil acetato, siendo esta cantidad menor en el medio con fenilalanina (36.52 $\mu\text{L/L}$).

De cualquier forma, al igual que en la fermentación con extracto de levadura, la cantidad de ésteres de acetato producidos durante la fermentación mixta en medio M11 con fenilalanina (Gráfico 12) mostraron una interacción negativa entre estas levaduras, al existir la reducción en la cantidad de los ésteres producidos con respecto a las fermentaciones puras de ambas levaduras.

En general, la cantidad de ésteres de acetato producidos en la fermentación en medio M11 con fenilalanina (Gráfico 12), fue baja en comparación con la fermentación M11 con extracto de levadura (Gráfico 11).

La marcada diferencia en la producción de ésteres de acetato entre un medio de fermentación y otro, tiene que ver con la fuente de nitrógeno en el medio, de acuerdo

con Procopio *et al.* (2013), la concentración de los aminoácidos y pequeños péptidos se correlaciona con la producción de ésteres de acetato por lo que la conexión directa con sus aminoácidos precursores hace a la producción de ésteres altamente dependiente de la fuente de nitrógeno. De igual forma, es importante tomar en cuenta la concentración y composición de la fuente fermentable de carbono, así como la relación carbono-nitrógeno ya que esto tiene efectos dramáticos sobre la producción de ésteres (Pidcocke *et al.*, 2009; Dekoninck *et al.*, 2012).

En contraste con la producción de alcoholes superiores en medio M11 con fenilalanina, la producción de ésteres de acetato mostró una tendencia negativa. En un estudio realizado por Canonico *et al.* (2017) en cerveza también se observa esta tendencia, donde en general los ésteres se produjeron en una menor cantidad que los alcoholes superiores, lo cual concuerda con los resultados obtenidos, a excepción de la fermentación pura de *S. cerevisiae* cepa *SCH2* en medio M11 con extracto de levadura (Gráfico 11), la cual produjo una alta cantidad de 2-fenil acetato ($> 500 \mu\text{L/L}$) y de etil lactato ($>350 \mu\text{L/L}$), siendo estos valores más altos a la cantidad de alcoholes superiores producidos, donde el alcohol superior producido en mayor cantidad fue el 2-fenil etanol ($212.33 \mu\text{L/L}$) en la fermentación pura de *T. delbrueckii* con extracto de levadura, Gráfico 9.

El comportamiento de las levaduras en los diferentes mostos de fermentación y la producción de compuestos congénicos se pueden relacionar con los diferentes sustratos iniciales utilizados como azúcares, composición de aminoácidos, compuestos precursores de sabor, entre otros (Canonico *et al.*, 2017).

Con respecto al ámbito toxicológico se debe considerar que la producción de alcoholes superiores en las fermentaciones debe ser controlada, sobre todo en algunos alcoholes muy específicos ya que podrían causar serios daños al consumidor en altas concentraciones (Mager, 1988; ANEXO II), tomando en cuenta que un factor influyente para el control de la fermentación es el cultivo iniciador (Sadoudi *et al.*, 2012) y los sustratos utilizados para inhibir o producir ciertos compuestos (Canonico *et al.*, 2017), como la fuente de nitrógeno asimilable (He *et al.*, 2014).

En relación con la aceptación por el consumidor, ésta ha sido alta de acuerdo con lo descrito por Catrileo et al., 2020 en su estudio en vino utilizando a las levaduras *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* como cultivos iniciadores en una misma fermentación, donde el análisis sensorial realizado arrojó que los consumidores tuvieron un nivel de agrado más alto por el vino con el inóculo mixto con respecto a las fermentaciones puras.

Se ha comprobado en diversos estudios (Loira et al., 2014; Renault et al., 2015; Catrileo et al., 2020) que el uso de inóculos mixtos, enriquecen y favorecen la composición del mosto con algunos congénéricos, consecuentemente esto se ha reflejado en un alto nivel de aceptación por parte del consumidor en los estudios mencionados, sin embargo, se deben realizar más estudios de carácter sensorial que contribuyan a demostrar esta inclinación.

9. Conclusiones

1. La composición de congenéricos en la fermentación mixta varió significativamente con respecto a las fermentaciones individuales, en ambos medios de fermentación, por lo que posiblemente existió una competencia por los nutrientes entre las dos especies de levadura.
2. Tanto en la fermentación mixta como en las fermentaciones individuales en medio M11, el tiempo de fermentación fue menor y hubo una mayor producción de etanol y glicerol, con respecto a las fermentaciones realizadas en medio M11 con fenilalanina.
3. El mayor porcentaje de consumo de fructosa se obtuvo en las fermentaciones efectuadas en medio M11, siendo la fermentación mixta la que consumió mayor cantidad de este azúcar.
4. En la fermentación mixta, el uso de fenilalanina como fuente orgánica de nitrógeno, tuvo un efecto favorable en la producción de compuestos congenéricos, ya que aumentó la concentración tanto de alcoholes superiores como de ésteres de acetato.
5. De acuerdo con los resultados obtenidos, la fuente de nitrógeno utilizada en el medio influye considerablemente en la concentración de congenéricos al final de la fermentación.
6. El alcohol superior producido en mayor cantidad fue el 2-fenil etanol, en ambos medios de fermentación.
7. La interacción que existe entre estas dos especies de levadura está relacionada con la composición del medio de fermentación, ya que al cambiar la fuente de nitrógeno su comportamiento fue diferente y por lo tanto esto repercutió en la producción de metabolitos.

10. Perspectivas

El uso de fermentaciones mixtas como herramienta biotecnológica para el desarrollo de nuevos productos como bebidas fermentadas, donde se mejoren las características organolépticas y se reduzca el contenido de alcohol ya que de acuerdo con estudios (Wilkinson y Jiranck, 2013; Dzialo *et al.*, 2017), puede contribuir a mejorar la salud de los consumidores.

Realizar el mismo estudio probando otras fuentes orgánicas de nitrógeno, para determinar cuáles son los compuestos producidos y poder relacionarlos con la fuente nitrogenada utilizada.

Cambiar la fuente de carbono, utilizando otros azúcares, ya que de acuerdo con Pidocke *et al.* (2009) y Dekoninck *et al.* (2012) la relación carbono-nitrógeno tiene efectos sobre la producción de algunos metabolitos, por lo cual también debe ser un factor de estudio complementario.

Emplear otras combinaciones de especies de levadura con el fin de ampliar los estudios de los compuestos producidos en la fermentación mixta y poder elegir a las especies que vayan de acuerdo con los productos deseados.

Explorar la presencia o ausencia de otros compuestos presentes en las fermentaciones aplicando como herramientas la Cromatografía de Gases/Espectroscopía de Masas.

11. Bibliografía

Alves, C., Pacheco, A., Almeida, M.J., Spencer, I., Leao, C., Sousa, M.J. (2007). Sugar utilization patterns and respiro-fermentative metabolism in the baker's yeast *Torulaspora delbrueckii*. *Microbiology*, 153, 898–904.

Anadon, A., Martínez, M.R., Martínez, M.A. (2006). Probiotics for animal nutrition in the European Union. *Regulatory Toxicol and Pharmacol.*, 91-95.

Ando, H., Hatanaka, K., Ohata, I *et al.* (2012). Antifungal activities of volatile substances generated by yeast isolated from Iranian commercial cheese. *Food Control*, 26, 472–8.

Azzolini, M., Tosi, E., Lorenzini, M., Finato, F., Zapparoli, G. (2015). Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspora delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(2), 277–293.

Badui, S. 2015. *La ciencia de los alimentos en la práctica*. (2ª ed.). Pearson Educación.

Balikci, E.K., Tanguler, H., Jolly, N.P., Erten, H. (2016). Influence of *Lachancea thermotolerans* cv. Emir wine fermentation. *Yeast*, 33, 313–321.

Barnett, J. A. (1992). The taxonomy of the genus *Saccharomyces meyenex reess*: A short review for non-taxonomists. *Yeast*, 8(1), 1–23.

Basso, R.F., Alcarde, A.R., Portugal, C.B. (2016). Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations? *Food Res. Int.* 86, 112–120.

Becher, P.G., Flick, G., Rozpedowska, E *et al.* (2012). Yeast, not fruit volátiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development. *Funct Ecol.*, 26, 822–8.

Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderon, F., Benito, S. (2015). Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspora delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 99, 1911–1922.

Belda, I., Ruiz, J., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., Rauhut, D., Benito, S., Santos, A. (2017). Influence of *Torulaspora delbrueckii* in varietal thiol (3-SH and 4-MSP) release in wine sequential fermentations. *Int J Food Microbiol.*, 257, 183–191.

Benito, Á., Calderón, F., Palomero, F, Benito, S. (2015a). Combine use of selected *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* yeast strains as an

alternative to the traditional malolactic fermentation in red wine production. *Molecules*, 20, 9510–9523.

Benito, Á., Calderón, F., Benito, S. (2016a). Combined use of *S. pombe* and *L. thermotolerans* in winemaking. Beneficial effects determined through the study of wines' analytical characteristics. *Molecules*, 21, 1744.

Benito, A., Calderon ,F., Benito, S. (2017). The combined use of *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans*-effect on the anthocyanin wine composition. *Molecules*, 22, 739.

Benito, S. (2018). The impact of *Torulaspota delbrueckii* yeast in winemaking. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(7), 3081–3094.

Boyle, R.J., Roy, M.R., Tang, M.L. (2006). Probiotic use in clinical practice: What are the risks? *Am. J. of Clin. Nutr.*, 83, 1256-64.

Camacho, A., Giles. M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B. 2009. *Manual de prácticas de Microbiología Experimental*. México D.F: UNAM.

Canonico, L., Agarbati, A., Comitini, F., y Ciani, M. (2016). *Torulaspota delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. *Food Microbiology*, 56, 45–51.

Canonico, L., Comitini, F., y Ciani, M. (2017). *Torulaspota delbrueckii* contribution in mixed brewing fermentations with different *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 259, 7–13.

Casas, A., Aguilar, C. N., De la Garza, H., Morlett, J. A., Montet, D., Rodríguez, R. (2015). Importancia de las levaduras no-*Saccharomyces* durante la fermentación de bebidas alcohólicas. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 65, 73-79.

Castelli, T. (1955). Yeasts of wine fermentations from various regions of Italy. *Am. J. Enol. Vitic.*, 6, 18–20.

Catrileo, D., Acuña-Fontecilla, A and Godoy, L. (2020). Adaptive Laboratory Evolution of Native *Torulaspota delbrueckii* YCPUC10 with Enhanced Ethanol Resistance and Evaluation in Co-inoculated Fermentation. *Frontiers in Microbiology*. 11, 1-13.

Chen, H., Fink, GR. (2006). Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev.*, 20, 1150–61.

Cherry JM, Hong EL, Amundsen C *et al.* (2012). *Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Res.*, 40, D700–5.

- Ciani, M. y Maccarelli, F. (1997). Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(2), 199-203.
- Ciani, M., y Comitini, F. (2015). Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. *Current Opinion in Food Science*, 1(1), 1–6.
- Ciani, M., Capece, A., Comitini, F., Canonico, L., Siesto, G., Romano, P. (2016). Yeast interactions in inoculated wine fermentation. *Front. Microbiol.*, 7, 555.
- Cocolin, L., Pepe, V., Comitini, F., Comi, G., Ciani, M. (2004). Enological and genetic traits of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from former and modern wineries. *FEMS Yeast Research*, 5, 37-245.
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M. (2011) Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.*, 28, 873–882.
- Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P.A., Chambers, P.J., Curtin, C., Varela, C. (2014). Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Appl Environ Microbiol*, 80, 1670–1678.
- Dacelis Borroto Mato, Magdalena Lorenzo Izquierdo, Roxana García Gutiérrez, Arlyn Reyes Linares. (2017). Aspectos generales sobre la determinación de alcoholes superiores en bebidas alcohólicas. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*, 51 (3), 58-64.
- De La Garza-Toledo, H., Martinez, M., Lara, L., Rodriguez-Herrera, R., Rodriguez, J., Aguilar, C. (2008). Production of a Mexican Alcoholic Beverage: Sotol. *Research Journal of Biological Sciences*, 3 (6), 566-571.
- Dekoninck TML, Verbelen PJ, Delvaux F *et al.* (2012). The importance of wort composition for yeast metabolism during accelerated brewery fermentations. *J Am Soc Brew Chem.*, 70, 195–204.
- Domene, M.A., Segura, M. (2014). Parámetros de calidad interna de hortalizas y frutas en la industria agroalimentaria. *Negocio Agroalimentario y Cooperativo Cajamar ADN Agro*. Disponible en: chilorg.chil.me/download-doc/86426
- Domizio, P., Liu, Y., Bisson, LF., Barile, D. (2017). Cell wall polysaccharides released during the alcoholic fermentation by *Schizosaccharomyces pombe* and *S. japonicus*: quantification and characterization. *Food Microbiol.*, 61, 136–149.
- Dzialo, M. C., Park, R., Steensels, J., Lievens, B., y Verstrepen, K. J. (2017). Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 41, S95–S128.

Enríquez, M., Acevedo, A. (2012). *Identificación molecular de levaduras presentes durante la fermentación de Sotol*. Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas, 42-43.

Escalante, W. (2012). Actividad fermentativa de *Hanseniaspora uvarum* y su importancia en la producción de bebidas fermentadas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 31(1), 57-63.

Esteve, B. *et al.* (1998). The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial wine making. *International Microbiology*, 1(2): 143-148.

Etschmann MMW, Bluemke W, Sell D *et al.* (2002). Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Appl Microbiol Biot*, 59, 1–8.

Etschmann, M., Huth, I., Walisko, R., Schuster, J., Krull, R., Holtmann, D., Wittmann, C., Schrader, J. (2015). Improving 2-phenylethanol and 6-pentyl- α -pyrone production with fungi by microparticle-enhanced cultivation (MPEC). *Yeast*, 32, 145–157.

Fernandez, C.L., Beaufort, S., Brandam, C., Taillandier, P. (2014). Interactions between *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in tequila must type medium fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 2223-2229.

Flores, A. C., Cruz, M., Castillo, F., Rutiaga, O. M., Torre, L. S., Paredes, A., Soto, O. N., Rodriguez, R. (2019). Sotol, an Alcoholic Beverage With Rising Importance in the Worldwide Commerce. *Alcoholic Beverages*, 141-160.

Folch, Garay, Lledías, F., Covarrubias, A. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 46, 1-2.

Franco, B. M. (2018). *Identificación de las levaduras que participan en la fermentación natural para la producción de Sotol*. Tesis de Licenciatura. UNAM.

García, G. *et al.* (2004). *Biología Alimentaria*. México, D.F., Limusa, 263-311.

Gardner, N., Rodrigue, N., Champagne, C.P. (1993). Combined effects of sulfites, temperature, and agitation time on production of glycerol in grape juice by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59 (7), 2022-2028.

Gobbi, M., De Vero, L., Solieri, L, Comitini, F., Oro, L., Giudici, L., Ciani, M. (2014). Fermentative aptitude of non-*Saccharomyces* wine yeast for reduction in the ethanol content in wine. *Eur Food Res Technol.*, 239, 41-48.

González, R., Barcenilla, J.M., Tabera, L. (2007). Cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* con bajo rendimiento en etanol. Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC. *ACE Revista de Enología*.

Hanl, L., Sommer, P., Arneborg, N. (2005). The effect of decreasing oxygen feed rates on growth and metabolism of *Torulaspora delbrueckii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67, 113–118.

He, Y., Dong, J., Yin, H., Zhao, Y., Chen, R., Wan, X., Chen, P., Hou, X., Liu, J., Chen, L. (2014). Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and éster formation of beer - A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(3), 157–163.

Herraiz, G., Reglero, M., Herraiz, P., Alvarez, M., Cabezudo, M. (1990). The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wine fermented without sulphur dioxide. *Am. J. Enol. Vitic.*, 41, 313–318.

Hernández, D.R. (1999). *Efecto de un cultivo de Saccharomyces cerevisiae en consumo, digestibilidad y variables ruminales en borregos alimentados con pasto ovillo (Dactylis glomerata) cosechado a dos intervalos de rebrote*. Tesis de maestría en ciencias. Colegio de Posgraduados, Montecillo México,74.

Hidalgo, J. (2003). *Tratado de Enología*. España: Mundi-Prensa,478-494.

Hidalgo, J. (2018). *Tratado de Enología*. Mundi-Prensa: 1 (3), 596-598.

IMPI. (2002). DECLARACION DE PROTECCION A LA DENOMINACION DE ORIGEN SOTOL. Diario Oficial de la Federación. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/494502/DO.Sotol.08.08.2002.pdf>

Ivey, M., Massel, M., Phister, T. G. (2013). Microbial Interactions in Food Fermentations. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4(1), 141–162.

Kim, B., Cho, B-R, Hahn, J-S. (2014). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of 2-phenylethanol via Ehrlich pathway. *Biotechnol Bioeng*, 111, 115–24.

King, A., Dickinson, J.R. (2000). Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, 16, 499–506.

Kurtzman, C.P. (1904). *In The Yeasts: A Taxonomic Study*, *Torulaspora lindner*, 5 (2), London: UK, 867–874.

Larone, D. (2011) *Medically Important Fungi: A Guide To Identification*, *Yeast and Yeast like Organisms*, ASM Press: Washington, D.C., 143 – 146, 485.

Latisnere, H., Virgen, M., Martinez, J., Ochoa, J.L. (2006). Levaduras marinas. CONABIO. *Biodiversitas*, 64, 7-9.

Leal, I., Tarantino, G., Hernández, R., Morán, H. (2014). Efecto de la temperatura y el pH en la fermentación del mosto de *Agave cocui*. *Multiciencias*, 14 (4), 375-381.

Lilly M, Lambrechts MG, Pretorius IS. (2000). Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Appl Environ Microb.*, 66, 744–53.

Liu, D., Zhang, H., Xu, B., Tan, J. (2014). Influence of fermentation temperature and source of enzymes on enological characteristics of rice wine. *Journal of the Institute of Brewing*, 120 (3), 231–237.

Liu P, Cheng Y, Yang M *et al.* (2014). Mechanisms of action for 2-phenylethanol isolated from *Kloeckera apiculata* in control of *Penicillium* molds of citrus fruits. *BMC Microbiol*, 14, 242.

Loira, I.; Vejarano, R.; Bañuelos, M.A.; Morata, A.; Tesfaye, W.; Uthurry, C.; Villa, A.; Cintora, I.; Suárez-Lepe, J.A. (2014). Influence of sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 915–922.

López, M., Guevara, S. (2001). Tequila, mezcal and sotol: volátiles marcadores de origen y planta (especie de *Agave*). *Investigación y Ciencia*, 24, 28–32.

Lozano, M.E., Muñoz, J.A. (1988). Determinación de glicerina en vinos y otras bebidas alcohólicas. Revisión crítica. *Alimentaria*, 25-32.

Mager, Jeanne. 1988. Guía de Productos Químicos. En la *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el trabajo*. (3, Vol. 4, 918). España: Ministerio de Trabajo y Seguridad Social.

Maiorella, B.L., Blanch, C.H., Wilkie, C.R. (1984). Feed component inhibition of ethanolic fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*, 26, 1155-1166.

Maqueda, M., Zamora, E., Álvarez, M., Ramírez, M. (2012). Characterization, Ecological Distribution, and Population Dynamics of *Saccharomyces Sensu Stricto* Killer Yeasts in the Spontaneous Grape Must Fermentations of Southwestern Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (3), 735-743.

March, G. A., y Eiros, J. M. (2013). Quorum sensing en bacterias y levaduras. *Medicina Clinica*, 141(8), 353–357.

Marongiu, A., Zara, G., Legras, J.L., Del Caro, A., Mascia, I., Fadda, C., Budroni, M. (2015).

Novel starters for old processes: use of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from artisanal sourdough for craft beer production at a brewery scale. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 42, 85–92.

Mas, A., Torija. MJ., Beltrán, G., Novo, M., Hierro, N., Oblat, M., Rozés, N., Guillamón, JM.(2006). *Selección de Levaduras*. México, DF.

Mas, A., Beltrán, G., Sancho, M., Gutiérrez, A., Chiva, R., Guillamón, J.M. (2013). Metabolismo nitrogenado de *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación vínica. *ACENOLOGÍA*. [Revista en Línea]. Disponible en: http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/metabolismo_nitrogenado_scerevisiae_cienc1013.htm

Masoud, W., Poll, L., Jakobsen, M. (2005). Influence of volatile compounds produced by yeasts predominant during processing of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *Yeast*, 22,1133–42.

Mauricio, J.C., Millán, C., Ortega, J.M. (1998). Influence of oxygen on the biosynthesis of cellular fatty acids, sterols and phospholipids during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 14, 405–410.

MCD-LAB. (2020). Extracto levadura. Disponible en: <http://www.mcdlab.net/products.html>

Medina, L., Gonzalez, E., Sieczkowski, N., Heras, J., Canals, JM., Zamora, F. (2017). Effect of sequential inoculation (*Torulaspora delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae*) in the first fermentation on foaming properties of sparkling wine. *Eur Food Res Technol*, 243, 681-8.

Michel, M., Kopecká, J., Meier-Dörnberg, T., Zarnkow, M., Jacob, F., Hutzler, M. (2016). Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspora delbrueckii* as model. *Yeast*, 33, 129–144.

Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F. J., Wagner, R. S., Hutzler, M. (2016). Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 569–587.

Morales, P., Quirós, M., Virginia, M., Rodrigues, A., Raimbourg, T., Tronchoni, J., Curiel, J.A., González, R. (2015). Levaduras no-*Saccharomyces* como herramientas para controlar el grado alcohólico de los vinos: importancia del oxígeno y la respiración. *ACENOLOGÍA*. [Revista en línea]. Disponible en: http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/no_saccharomyces_y_oxigeno_cienc0515.htm

Nally, M. C. *et al.* (2005). Comportamiento de una cepa salvaje de *Saccharomyces cerevisiae* killer y su isogénica sensible respecto de diferentes fuentes de nitrógeno en cultivos mixtos. *Revista Argentina de Microbiología*, 37(2): 73-77.

NOM-159-SCFI-2004. (2004). Norma Oficial Mexicana. Bebidas alcohólicas-Sotol-Especificaciones y métodos de prueba.

Nordstrom K. (1966). Formation of ésters from acids by Brewer's yeast: formation from unsaturated acids. *Nature*, 210, 99–100.

Ochoa, J.L., Vázquez, R. (2004). Las Levaduras Marinas como Herramienta Científica y biotecnológica. *Universidad y Ciencia*, 1, 39-50.

Oro, L., Ciani, M., Comitini, F. (2014). Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J Appl Microbiol*, 116, 1209-1217.

Piddocke, MP., Kreis, S, Heldt-Hansen, HP *et al.*(2009). Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. *Appl Microbiol Biot.*, 84, 453–64.

Pires, E.J., Teixeira, J.A., Brányik, T., Vincente, A.A. (2014). Yeast: The soul of beer's aroma and a review of flavour-active ésters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 98, 1937–1949.

Pretorius, I.S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 675-729.

Procopio S, Krause D, Hofmann T *et al.* (2013). Significant amino acids in aroma compound profiling during yeast fermentation analyzed by PLS regression. *LWT - Food Sci Technol*, 51, 423–32.

Quirós, M., Rojas, V., Gonzalez, R., Morales, P. (2014). Selection of non-*Saccharomyces* yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration. *Int J Food Microbiol.*, 181, 85-91.

Ramírez, M., Velázquez, R. (2018). The yeast *Torulasporea delbrueckii*: An interesting but difficult-to-use tool for winemaking. *Fermentation*, 4(4), 1-15.

Ravasio, D. *et al.* (2014). An indirect assay for volatile compound production in yeast strains. *Scientific Reports*, 4(3707), 1-4.

Renault, Philippe; Coulon, Joana; de Revel, Gilles; Barbe, Jean-Christophe; Bely, Marina (2015). Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement. *International Journal of Food Microbiology*, 207, 40–48.

Rojas, V. *et al.* (2001). Studies on acetate éster production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 70(3), 283-289.

Ruíz, C. (2017). Metanol, el alcohol que te deja ciego... ¿Lo tiene el mezcal?. *Mezcológia*. [En línea] Disponible en: <https://mezcologia.mx/metanol-en-el-mezcal/>

Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal. R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach. J., Alexandre, 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 Microbiol.* 32(2), 243-53.

Saerens, F. Delvaux, K.J. Verstrepen, P. Van Dijck, J. M. Thevelein, F. R. Delvaux. (2008). Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied Environmental Microbiology*, 74(2), 454-461.

Santillana, M. C. y García, M. (1998). Biosíntesis de congenéricos durante las fermentaciones alcohólicas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 40 (1), 109-119.

Secretaria de Salubridad y Asistencia (1963). Reglamento Sanitario de Bebidas Alcohólicas. *Salud Pública de México*, 5 (6), 985-1003.

Sobrino, P. (2019). *Sotol: una revisión histórica, química y microbiológica*. Tesis de Licenciatura. UNAM, 39-40.

Suárez, C., Garrido, N. A., Guevara, C., A. (2016). *Levadura Saccharomyces cerevisiae y la producción de alcohol*. ICIDCA, 50 (1), Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. Ciudad de La Habana, Cuba, 20-28.

Tataridis, P. *et al.* (2013). Use of non-*Saccharomyces Torulaspora delbrueckii* yeast strains in winemaking and brewing. *Matica Srpska Journal for Natural Sciences*, 124(2), 415-426.

Tijerina, N., Lira, K., Moreno., V., González, J.M., Mayek, N. (2014). Efecto del estrés osmótico *in vitro* en el crecimiento, patogenicidad y producción de osmolitos en *Macrophomina phaseolina*. *Revista Mexicana de Micología*, 39, 31-39.

Thaillandier, P., Ramon, F., Fuster A., Strehaiano, P. (2007). Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. *Food Microbiology*, 24, 95-100.

Tronchoni, J., Curiel, J. A., Morales, P., Torres-Pérez, R., Gonzalez, R. (2017). Early transcriptional response to biotic stress in mixed starter fermentations involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 60–68.

Tronchoni, J., Morales, P., González, R. (2017). Aplicación de levaduras no-*Saccharomyces* en enología. *ACENOLOGÍA*. [Revista en línea]. Disponible en: http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/aplicacion_levaduras_no_saccharomyces_cienc0817.htm

UNSA. (2007). UNIVERSIDAD DE LA SALUD DEL ESTADO DE MEXICO. *Manual de Microbiología de los Alimentos*. (4), 40-46. [En Línea]. Disponible en: <http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim2007/4%20levaduras.pdf>

Varela, C. (2016). The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 9861–9874.

Vázquez, H., y Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*, 8(4), 249–259.

Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Dufour J-P *et al.* (2003). Flavor-active ésters: adding fruitiness to beer. *J Biosci Bioeng*, 96, 110–8.

Viramontes, R., Pérez, R. (2014). Levaduras vínicas. *ACENOLOGÍA*. [Revista en línea]. Disponible en: http://www.acenologia.com/correspondencia/levaduras_vinicas_cor0214.htm

Visser, W., Scheffers, W.A., Batenburg-van der Vegte, W.H., van Dijken, J.P. (1990). Oxygen requirements of yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 3785–3792.

Waldir, E., Mojmír, R., Melzoch, K., Egoavil, E. (2007). Synthesis of compounds of sensory importance by *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeast during cider fermentation. In: 6º Simposio internacional de alcoholes y levaduras. Bogotá, Colombia.

Waldir, E. *et al.* (2012). Influencia de la aireación en la actividad fermentativa de *Kloeckera apiculata* durante la fermentación de jugo de manzana. *Acta Biológica Colombiana*, 17(2), 309-322.

Waldir, E., Mojmír, R., Melzoch, K., Torres, F., Calixto, R., Bravo, N., Memenza, M., Chávez, Y. (2014). Efecto de la aireación en la producción de compuestos volátiles por cultivo mixto de *Brettanomyces intermedius* y *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación de sidra. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 17(1), 5-14.

Walker, G.M. (1998). *Yeast physiology and biotechnology*. Arkansas. EE.UU: Chidéster.

Wang, C., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B. (2016). The interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast during alcoholic fermentation is species and strain specific. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–11.

Wilkinson K, Jiranck V. (2013). Wine of reduced alcohol content: Consumer and society demand vs industry willingness and ability to deliver. *Conference: 1st International Symposium on Alcohol Level Reduction in Wine Oenoviti International*

Network. France: Institut des Sciences de la Vigne et du Vin; Villenave d'Ornonm cedex, 15, 98–104.

Yang, S., Mei, X-D., Zhang, X-F *et al.* (2016). Attraction of coffee Bean Weevil, *Araecerus fasciculatus*, to volatiles from the industrial yeast *Kluyveromyces lactis*. *J Chem Ecol.*,1–8.

Yarrow, D. (1984). *Torulaspota lindner*. In *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 3, Amsterdam, The Netherlands, 434–439.

Zumárraga, M., y Barbero, F. (2014). Contribución organoléptica en la vinificación. *Asociación de Bodegas de Rioja Alavesa*, 1–4.

ANEXO I

Porcentaje de Consumo de Fructosa

Concentración inicial de Fructosa: 100 µg /mL (equivalente a 100 g /L de fructosa)

Concentración de Fructosa residual:

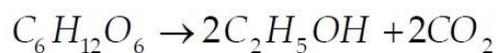
<i>S. cerevisiae</i> pura	2.21 µg/mL
<i>T. delbrueckii</i> pura	4.45 µg/mL
Mixta	2.12 µg/mL,

Ejemplo de cálculo:

$$\begin{array}{l} 100 \mu\text{g} \longrightarrow 100\% \\ 2.21 \mu\text{g} \longrightarrow X \\ X = 2.21 \\ 100 - 2.21 = 97.79\% \end{array}$$

Rendimiento de etanol

De acuerdo con la ecuación de fermentación alcohólica:



1 mol de fructosa equivale a 2 mol de etanol

Por lo que de acuerdo con el peso molar de la fructosa (180.16 g/mol), los gramos de fructosa en la reacción serían 180.16 g, y si el peso molar del etanol es de 46.07 g/mol, los gramos de etanol en la reacción serían 92.14 g. Por lo tanto, un poco más de la mitad de la cantidad de fructosa se transforma en etanol.

Partiendo de la reacción, primero se calculó el rendimiento teórico de etanol en la fermentación.

Rendimiento teórico de etanol:

Considerando que se añadieron 100 g/ L de fructosa al mosto.

$$100 \text{ g fructosa} \left(\frac{1 \text{ mol fructosa}}{180.16 \text{ g fructosa}} \right) = 0.555 \text{ mol fructosa}$$

$$0.555 \text{ mol fructosa} \left(\frac{2 \text{ mol etanol}}{1 \text{ mol fructosa}} \right) = 1.11 \text{ mol etanol}$$

$$1.11 \text{ mol etanol} \left(\frac{46.07 \text{ g etanol}}{1 \text{ mol etanol}} \right) = 51.13 \text{ g etanol}$$

$$51.13 \text{ g /L} = 51.13 \mu\text{g /mL}$$

Por lo que el rendimiento teórico de etanol es de 51.13 $\mu\text{g/mL}$

Ahora para calcular el rendimiento de etanol de cada fermentación se hizo el siguiente calculo:

Ejemplo de cálculo:

Fermentación	Concentración de etanol al final de la fermentación.
<i>S. cerevisiae</i> pura	47.28 $\mu\text{L/mL}$

$$51.13 \mu\text{L/mL} \longrightarrow 100\%$$

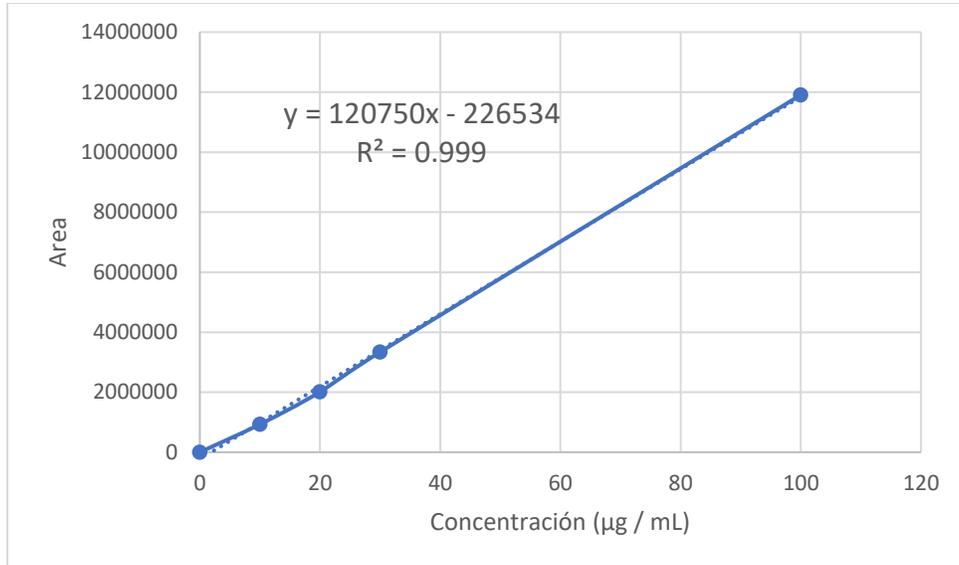
$$47.28 \mu\text{L/mL} \longrightarrow X$$

$$X = 92.47 \%$$

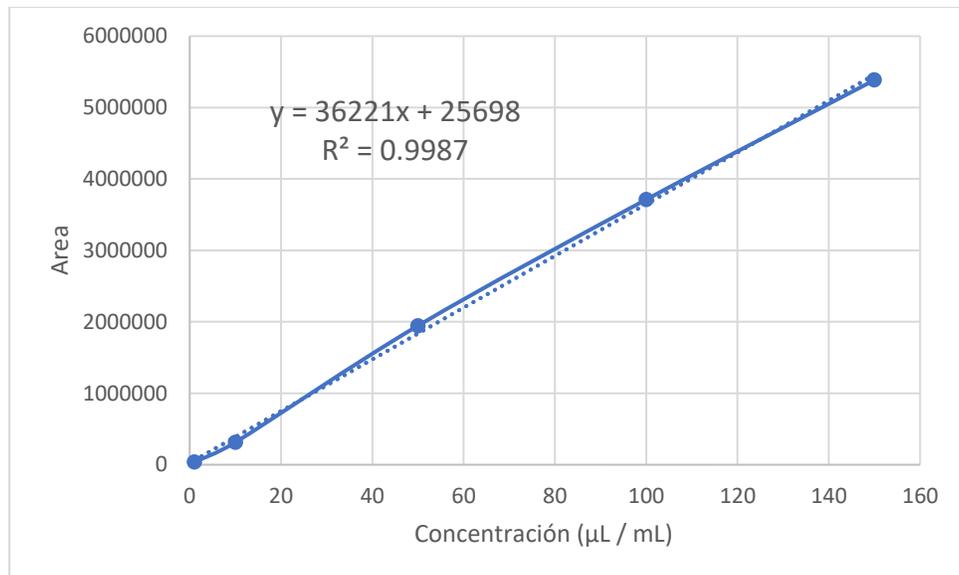
Este cálculo se realizó para cada una de las seis fermentaciones.

Curvas patrón

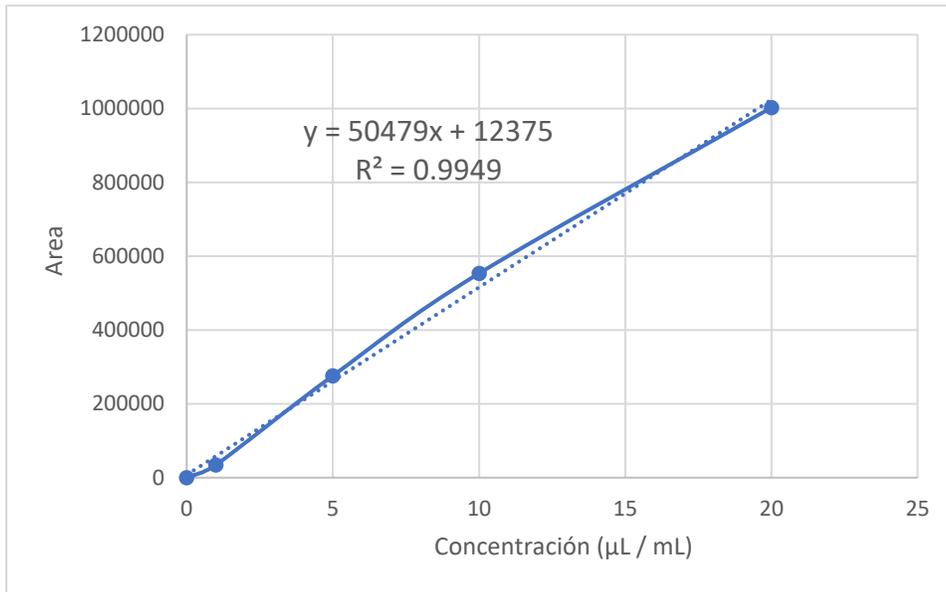
Curva patrón para la cuantificación de fructosa.



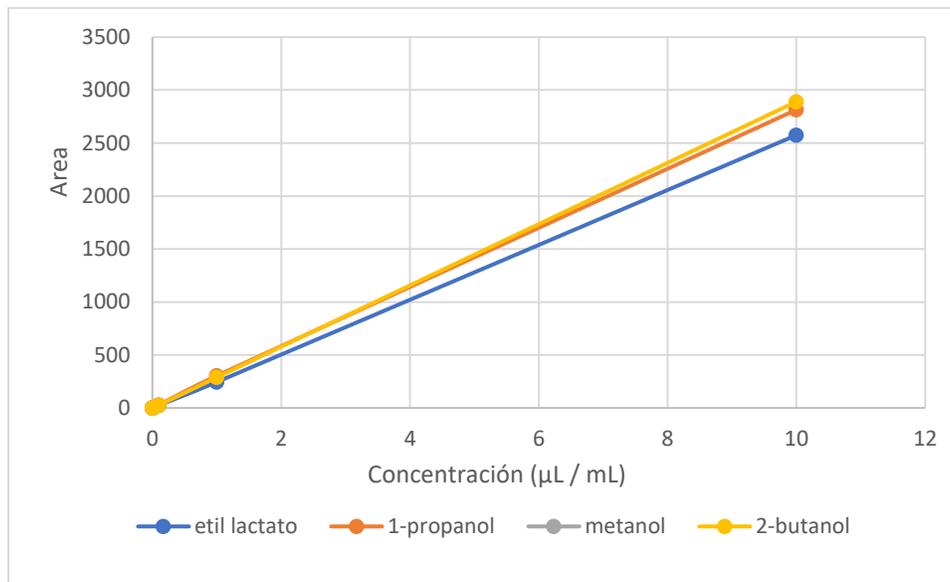
Curva patrón para la cuantificación de etanol.



Curva patrón para la cuantificación de glicerol.



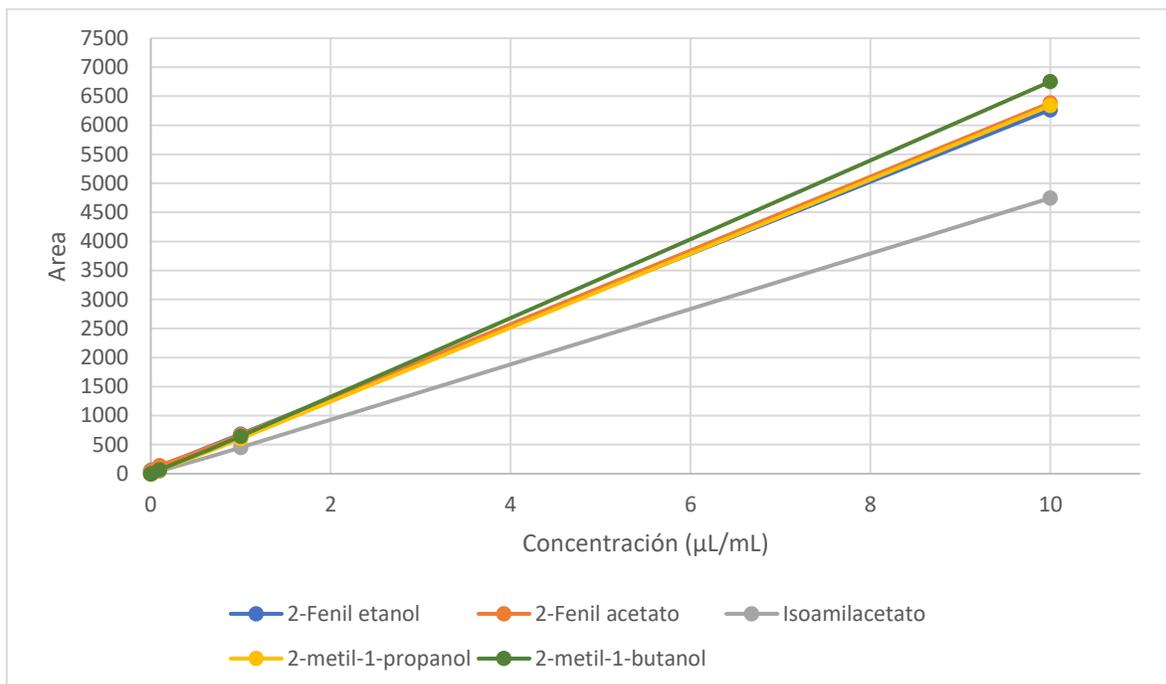
Curva patrón para la cuantificación de compuestos congénicos solubles en agua.



etil lactato	1-propanol	metanol	2-butanol
$y = 257.71x - 3.3381$	$y = 280.98x + 6.1209$	$y = 170.39x + 2.0199$	$y = 289.16x - 1.2427$
$R^2 = 0.9998$	$R^2 = 0.9998$	$R^2 = 0.9999$	$R^2 = 0.9999$

*La concentración de las curvas se encuentra desde 0.001 a 10 (µL / mL), al ser rangos pequeños no se aprecian claramente en el Gráfico.

Curva patrón para la cuantificación de compuestos congénéricos no solubles en agua.



2-fenil etanol	2-fenilacetato	isoamil acetato	2-metil-1-propanol	2-metil-1-butanol
$y = 621.12x + 57.327$	$y = 633.55x + 51.259$	$y = 475.04x - 5.3535$	$y = 634.7x - 6.5749$	$y = 675.72x - 6.7461$
$R^2 = 0.9999$	$R^2 = 0.9987$	$R^2 = 0.9998$	$R^2 = 0.9988$	$R^2 = 0.9999$

*La concentración de las curvas se encuentra desde 0.001 a 10 (µL / mL), al ser rangos pequeños no se aprecian claramente en el Gráfico.

ANEXO II

Desde el ámbito toxicológico Mager (1988) describe lo siguiente respecto a los alcoholes superiores encontrados en este estudio:

2-fenil etanol

En periodos largo de exposición podría dañar el sistema nervioso central, en periodos cortos puede causar tos, enrojecimiento de ojos.

2-metil-1-propanol

El 2-metil-1-propanol puede causar irritación de ojos, de garganta, cefalea, mareos, agrietamiento de la piel. Puede causar daño en ojos, tracto respiratorio, sistema nervioso central y piel.

2-metil-1-butanol

Este alcohol irrita las mucosas de los ojos, la nariz y la garganta cuando alcanza concentraciones de 100 ppm. Si bien se absorbe por vía digestiva, respiratoria y cutánea, la incidencia de enfermedades es muy baja. Los síntomas de enfermedad generalizada son cefalea, mareo, náuseas, vómitos, diarrea, delirio y narcosis.

1-propanol

No se han notificado casos de intoxicación relacionados con el uso industrial de n-propanol. Para los animales de experimentación es moderadamente tóxico cuando se administra por vías respiratoria, oral o percutánea. Irrita las mucosas y deprime el sistema nervioso central. Se conoce un caso de fallecimiento por ingestión de 400 mL de n-propanol.

Metanol

El alcohol metílico tiene propiedades tóxicas que pueden hacerse evidentes tanto por exposición aguda como crónica. En experimentos con animales se ha demostrado que el alcohol metílico puede penetrar en la piel en cantidad suficiente como para causar una intoxicación mortal. En casos de intoxicación grave, generalmente por ingestión, el alcohol metílico actúa de forma específica en el

nervio óptico, causando ceguera como resultado de la degeneración del nervio óptico.

Etanol

La exposición prolongada a concentraciones superiores a 5 000 ppm causa irritación de los ojos y la nariz, cefalea, sopor, fatiga y narcosis. El peligro de este consumo anómalo depende de la concentración de etanol, que si es superior al 70 % puede producir lesiones esofágicas y gástricas, y presencia de desnaturalizantes.