

20  
9ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LEVADURAS  
ZIMOCIDAS DE MELAZAS DE CAÑA**

**T E S I S**

Que para obtener el título de

**B I O L O G A**

**P r e s e n t a :**

**BONILLA SALINAS MONICA DEL PILAR**



MEXICO D. F.



1995

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

**FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE**  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Facultad de Ciencias  
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron LA pasante(s) BONILLA SALINAS MONICA DEL PILAR

con número de cuenta 8117325-9 con el Título: \_\_\_\_\_

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LEVADURAS ZIMOCIDAS DE MELAZAS  
DE CAÑA

Otorgamos nuestro **Voto Aprobatorio** y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de BIOLOGO

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
M. EN C.	JOSE MARIANO	GARCIA GARIBAY	<i>[Firma]</i>
Director de Tesis			
DRA.	PATRICIA ESTHER	LAPPE OLIVERAS	<i>Patricia Lappe O.</i>
DR.	TEOFILO	HERRERA SUAREZ	<i>T. Herrera</i>
DR.	MIGUEL ARMANDO	ULLOA SOSA	<i>Miguel Ulloa Sosa</i>
Suplente			
BIOLOGA	MARIA CRISTINA JULIA	PEREZ REYES	<i>Cristina Perez Reyes</i>
Suplente			

Esta tesis fue realizada de manera interinstitucional en La Planta Piloto 2 de la Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa y el Laboratorio de Micología del Instituto de Biología de la UNAM, bajo la dirección del M. en C. José Mariano García Garibay y la Dra. Patricia Esther Lappe Oliveras.

**AGRADECIMIENTOS:**

Agradezco especialmente al M. en C. Mariano García Garibay por la oportunidad y el apoyo brindados en todo momento y a la Dra. Patricia Lappe Oliveras por su excelente contribución en esta investigación, a ambos por la acertada dirección y por la amistad brindada.

A la M. en C. Lorena Gómez Ruiz por sus importantes aportaciones para realizar la investigación.

Mi gratitud al Dr. Teófilo Herrera, Dr. Miguel Ulloa, Biol. Cristina Pérez por sus críticas y originales comentarios que permitieron mejorar la calidad de este trabajo

A mis compañeros del laboratorio, por compartir conmigo los momentos más importantes en la realización del experimento.

Al Biol. Pedro Joaquín Gutiérrez Yurrita por la fotografía.

A todas las personas que contribuyeron de alguna manera en la realización del trabajo.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág
<b>1. RESUMEN</b>	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>3. ANTECEDENTES</b>	6
<u>3.1 Factor zimocida</u>	6
3.1.a. Pruebas para la identificación de levaduras zimocidas	6
3.1.b. Clasificación de las toxinas zimocidas	7
3.1.c. Biosíntesis de la toxina zimocida	8
3.1.d. Modo de acción de la toxina zimocida	9
3.1.e. Biología de la toxina zimocida	9
3.1.f. Distribución del fenómeno zimocida en la naturaleza	10
3.1.g. Estabilidad de la característica zimocida en cultivos de colección	11

<u>3.2. Importancia industrial de las levaduras zimocidas</u>	11
3.2.a. Levaduras zimocidas contaminantes en diversos procesos de fermentaciones	11
<u>3.3. Levaduras</u>	14
3.3.a. Historia	14
<u>3.4. Sustratos para producción de levaduras</u>	15
3.4.a. Melazas	15
<u>3.5. Contaminación</u>	16
3.5.a. Contaminación en melazas	16
3.5.b. Contaminación en levaduras de panificación	18
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	20
<u>4.1. Melazas</u>	20

4.1.a. Muestreo	20
<u>4.2. Aislamiento de levaduras procedentes de melazas</u>	20
4.2.a. Enriquecimiento y dilución de las muestras	20
4.2.b. Mantenimiento de las cepas puras	20
<u>4.3. Identificación de las levaduras</u>	20
<u>4.4 Actividad zimocida en levaduras aisladas de melazas</u>	22
4.4.a. Determinación de condiciones óptimas para el experimento	22
4.4.b. Medios de cultivo	22
4.4.c. Evaluación de la actividad zimocida de las cepas de levaduras	23
<u>4.5 Efecto zimocida y sensibilidad en levaduras</u>	23
4.5.a. Determinación del efecto de las levaduras zimocidas aisladas de las melazas contra las cepas sensibles de colección	23
4.5.b. Efecto de las levaduras zimocidas aisladas de las melazas contra las levaduras de panificación	24



4.5.c. Efecto de la levadura zimocida de colección contra las levaduras de melazas	24
<u>4.6. Levaduras de panificación</u>	24
4.6.a. Muestreo	24
4.6.b. Identificación	24
<u>4.7. Efecto zimocida en levaduras de panificación</u>	24
4.7.a. Efecto de la cepa zimocida de colección contra las levaduras de panificación	25
4.7.b. Efecto de las levaduras de panificación contra la cepas sensibles de colección	25
<b>5. RESULTADOS</b>	26
<u>5.1. Melazas</u>	26
5.1.a. Aislamiento e identificación de levaduras	26

<b><u>5.2. Actividad zimocida de levaduras aisladas de melazas</u></b>	<b>27</b>
5.2.a. Se determinó el efecto zimocida de las levaduras de melazas contrados levaduras sensibles de colección	27
5.2.b. Efecto de la levadura de colección contra las levaduras aisladas de melazas	28
5.2.c. Efecto de las levaduras de las melazas contra las levaduras de panificación	27
5.2.d. Sensibilidad de las cepas de colección usadas como tapetes	27
<b><u>5.3 Levaduras de panificación</u></b>	<b>27</b>
5.3.a. Identificación	28
<b><u>5.4. Actividad zimocida en levaduras de panificación</u></b>	<b>29</b>
5.4.a. Efecto de la cepa zimocida de colección contra las levaduras de panificación	29

5.4.b. Efecto de las levaduras de panificación contra las cepas sensibles de colección	30
<u>5.5. Determinación de los de los fenotipos de las cepas probadas</u>	30
<b>6. DISCUSIÓN</b>	33
<u>6.1. Melazas</u>	33
6.1.a. Identificación de las levaduras aisladas de las melazas	33
<u>6.2. Determinación de la característica zimocida en levaduras aisladas en melazas</u>	34
6.2.a. Sensibilidad de las cepas utilizadas como tapetes	35
<u>6.3. levaduras de panificación</u>	35
6.3.a. Contaminación en levaduras de panificación	35
6.3.b. Actividad zimocida en levaduras de panificación	35
6.3.c. Contaminación en levaduras de panificación	35

6.4 Fenotipos zimocidas de las levaduras analizadas 36

**7. CONCLUSIONES** 37

**8. LITERATURA CITADA** 38

## 1. RESUMEN

El propósito de esta tesis fue identificar las levaduras silvestres zimocidas que existen comúnmente en la microbiota de las melazas de caña de azúcar y evaluar el efecto que tienen sobre levaduras comerciales para panificación.

Se colectaron asepticamente 10 muestras de melazas procedentes de diversos ingenios azucareros del estado de Veracruz, México. Las que se diluyeron en un medio nutritivo. A partir de dicho medio enriquecido se hicieron resiembras en Papa Dextrosa Agar con el fin de obtener colonias puras de levaduras, las que se identificaron a especies según el manual compilado por Kreger-van Rij (1984). El efecto zimocida de las levaduras aisladas e identificadas se determinó mediante el espectro de actividad contra dos cepas sensibles, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 y *Candida glabrata* Y55, modificando el método descrito por Woods y Bevan (1968).

Se aislaron trece especies de levaduras, de las cuales siete correspondieron a *Schizosaccharomyces pombe*, tres a *Saccharomyces cerevisiae*, 2 a *Torullespora delbrueckii* y una a *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. De estas especies 9 tuvieron actividad zimocida, tres correspondieron a *Schizosaccharomyces pombe*.

Además se obtuvieron cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en la industria de panificación, las que mostraron sensibilidad frente a la cepa zimocida *S. cerevisiae* NCYC 190, pero se mostraron resistentes frente a las cepas con actividad zimocida aisladas de las melazas de caña.

Se demuestra con este estudio una alta incidencia de levaduras zimocidas silvestres en las melazas de caña de azúcar, así que podríamos considerar la posible inhibición de las cepas industriales usadas en la producción de alcohol o en levaduras para panificación.

No existen reportes anteriores sobre la identificación de levaduras silvestres zimocidas en este sustrato y se registra por primera vez actividad zimocida en *Schizosaccharomyces pombe*.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las fermentaciones comerciales, particularmente aquellas que emplean *Saccharomyces cerevisiae*, están sujetas a la contaminación por las llamadas "levaduras silvestres", que son levaduras distintas a las empleadas como cultivos iniciadores. Las bebidas alcohólicas de relativamente bajo contenido de alcohol (ej. cervezas) también están sujetas a contaminación por este tipo de levaduras. Claramente, la presencia de levaduras zimocidas en fermentaciones o en los productos de fermentación podría dar alguna protección contra la contaminación por levaduras silvestres, las cuales son sensibles a la acción de las toxinas producidas por las levaduras zimocidas (Young, 1987).

La frecuencia de cepas zimocidas aisladas de habitat naturales es mayor que la encontrada en cultivos de colección. La ventaja competitiva de las levaduras zimocidas sobre las sensibles podría explicar esta observación. Similarmente, en las industrias de fermentaciones las levaduras contaminantes muestran una alta incidencia del carácter zimocida, y tienen ventaja competitiva sobre las levaduras comerciales, la mayoría de las cuales son sensibles a la acción zimocida (Young, 1987).

Actualmente existe gran interés en estudiar y comprender mejor la naturaleza de las levaduras zimocidas, ya que su presencia en los procesos fermentativos industriales tiene un efecto adverso en la calidad de los productos finales. Lo que provoca importantes pérdidas económicas.

Según Saleck, *et al.*, (1992) la utilización de levaduras zimocidas, o bien de cepas que han adquirido la característica zimocida mediante técnicas de transferencia genética, como cultivos iniciadores de procesos fermentativos como la producción de vino, cerveza y destilados tiene varias ventajas como disminuir la contaminación por levaduras indeseables y evitar alteraciones de los productos finales.

Las levaduras zimocidas prevalecen en cultivos mixtos durante los procesos de fermentación, ejerciendo un control biológico en la producción de especies de las levaduras presentes (Fleet y Heard, 1987; Pasqual, *et al.*, 1990; Jacobs 1991; Palpacelli, *et al.*, 1991 y Jacobs 1991).

Según Fowell (1965) las levaduras de panificación son producidas principalmente a partir de melazas, siendo la aireación un factor esencial para lograr una alta producción.

Desafortunadamente la aireación favorece el desarrollo de levaduras silvestres y en consecuencia esta contaminación por levaduras causa mayor problema en la producción de biomasa de levaduras de panificación que en los procesos de producción de cerveza.

Las fermentaciones industriales más afectadas por la contaminación de levaduras zimocidas son las productoras de bebidas alcohólicas, como vino, cerveza y sake, principalmente. Ya que las melazas de caña de azúcar son ampliamente usadas como fuente de carbono en las industrias fermentativas, particularmente en las productoras de ron, etanol y levaduras de panificación, y que no se cuenta con estudios sobre la ocurrencia de levaduras zimocidas en este sustrato, podríamos suponer que las levaduras silvestres zimocidas naturalmente presentes en las melazas de caña de azúcar podrían inhibir el crecimiento de cepas sensibles usadas como cultivos iniciadores para la manufactura de estos productos fermentados.



## **Objetivos**

El objetivo general de este trabajo fue aislar e identificar las levaduras que forman parte de la microbiota contaminante de las melazas, determinar si eran zimocidas, y observar su efecto sobre el crecimiento de levaduras usadas en la industria de la panificación.

Como objetivos particulares, se plantearon los siguientes:

1. Aislar e identificar las levaduras que forman parte de la microbiota contaminante de las melazas.
2. Determinar las condiciones óptimas de temperatura, pH, y tiempo de incubación para la técnica de identificación del factor zimocida.
3. Determinar la presencia del carácter zimocida en las cepas aisladas de melazas dos cepas sensibles de colección.
4. Observar el efecto de las levaduras aisladas de melazas contra las levaduras de panificación.
5. Realizar pruebas cruzadas en las levaduras estudiadas para designar los fenotipos zimocidas.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Factor zimocida

El término "aniquilante" o "zimocida" se da a aquellas cepas de levaduras capaces de secretar una toxina proteica, en particular glicoproteica que puede matar a otras cepas de levaduras sensibles (Young, 1987). El fenómeno zimocida se descubrió por primera vez en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y posteriormente en otros géneros más, como *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis* (sin. de *Candida*, según criterio de Kreger-van Rij, 1984 (Young, 1987), *Metchnikowia* (Farris *et al.*, 1991; Lachance, 1993), *Torulaspota* (Radler *et al.*, 1992), *Kloeckera*, *Zygosaccharomyces* (Goto *et al.*, 1991) y *Hanseniaspora* (Zorg *et al.* 1988; Starmer, 1992). Generalmente las interacciones zimocidas ocurren entre especies dentro de un mismo género, pero se han reportado también reacciones entre especies de diferentes géneros (Heard y Fleet, 1987)

#### 3.1.a. Pruebas para la identificación de levaduras zimocidas

La identificación de las toxinas puede realizarse por: (i) determinación del espectro de actividad contra las cepas sensibles, (2) ensayo de actividad contra mutantes resistentes a ciertas toxinas, (3) determinación de la estructura de la toxina y (4) ensayo de la reacción cruzada de la toxina producida (interacción entre cepas). La forma mas simple y efectiva de identificación es el análisis de la interacción entre cepas de levaduras zimocidas; este tipo de análisis ha sido aplicado para clasificar cepas zimocidas de *Ustilago maydis* y levaduras zimocidas. Sin embargo, la principal limitante para la detección de las levaduras zimocidas es la selección apropiada de la cepa sensible. Las cepas zimocidas son inmunes a la acción de su propia toxina, por lo tanto, cuando una cepa zimocida mata a otra, la cepa que muere no tiene inmunidad a la toxina a la cual es susceptible, así que esta toxina letal debe ser bioquímicamente diferente de la producida por la cepa susceptible.

Las reacciones cruzadas proporcionan dos criterios para clasificación, el primero es el "grupo zimocida" y el segundo el espectro de resistencia a la actividad de otras levaduras zimocidas "grupos de resistencia" (Young, 1987).

Wickner y Leibowitz (1979), Young (1987) y Salek *et al.*, (1990) citan una nomenclatura para los fenotipos de las levaduras en las reacciones cruzadas: K-R+ (levaduras zimocidas, inmunes a la acción de su propia toxina), K-R- (levaduras no zimocidas, y sensibles contra la toxina), K-R+ (levaduras neutras que no producen toxina y que son inmunes contra las toxinas de otras levaduras. Por otra parte Young (1987), Rosini (1989), y Van Vuuren y Jacobs (1992) nombran tres diferentes fenotipos con respecto a esta característica: "zimocidas", "sensibles" y "neutras". Las células con el fenotipo zimocida (z) son capaces de matar a las cepas "sensibles"(s) mientras que las células con el tipo "neutral" (n) son incapaces de matar y son insensibles a la acción de los cultivos zimocidas. Posteriormente se descubrieron las cepas "zimocidas-sensibles" (zs), que no son sensibles a sus propias toxinas pero pueden ser sensibles a toxinas de otras cepas zimocidas (Van Vuuren y Jacobs, 1992).

### 3.1.b. Clasificación de las toxinas zimocidas

Young (1987) reportó diez distintos tipos de espectro de actividad zimocida K1 a K10 y diez diferentes espectros de resistencia. Con base en el tamaño de las moléculas del ds RNA y en las propiedades de las toxinas, las levaduras zimocidas se han clasificado dentro de 11 grupos, K1 a K11 (Salek *et al.*, 1990).

Según Jacobs y Van Vuuren (1991) se han determinado al menos 11 distintas actividades zimocidas que probablemente corresponden a 11 toxinas bioquímicamente diferentes. Cinco clases zimocidas han sido reportadas en *S. cerevisiae*, incluyendo los

tipos K1, K2, K3; K T28, y K3 GR1. Sin embargo, se ha mostrado recientemente que el tipo K3 es un mutante de K2.

Según Young (1987), *S. cerevisiae* NCYC 190 presenta una toxina del tipo K1, que es zimocida contra las cepas del tipo K2, K3 y K4. *C. glabrata* Y 55 presenta el tipo K4, es resistente a otras levaduras de este mismo tipo, y sin embargo también es sensible a la mayoría de las toxinas zimocidas conocidas (Starmer *et al.*, 1987).

### 3.1.c. Biosíntesis de la toxina zimocida

De acuerdo a Starmer *et al.* (1987) las toxinas zimocidas son producidas preferentemente en la fase exponencial, cuando en el medio de cultivo se mantiene un pH bajo y los nutrientes son abundantes. Kotani *et al.* (1977) reportan que el fenotipo zimocida de *S. cerevisiae* está determinado por un elemento genéticamente no mendeliano que da a la cepa la capacidad de producir la toxina zimocida y le proporciona inmunidad frente a la acción de la misma toxina; existen evidencias de que el elemento genético es una doble hélice de ácido ribonucleico.

Según Vodkin (1977), Skipper y Bussey (1977), Wickner y Leibowitz (1979), Gunge (1983), Young (1987) y Huan *et al.* (1991), en la mayoría de las cepas zimocidas del género *Saccharomyces*, que ha sido el más estudiado, la toxina zimocida es producida por una doble hélice (ds)lineal de RNA llamada M, que codifica para la toxina y que produce inmunidad contra la misma, cada cepa zimocida también contiene una segunda doble hélice llamada L, la cual produce la cápside proteica, ambas están encapsuladas individualmente, la transmisión ocurre solo por mezcla citoplasmática durante la citocinesis. Young (1987) y Radler *et al.* (1993) mencionan que los plásmidos de ds RNA o de ds DNA han sido observados sólo en algunas cepas de los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Pichia* y por lo tanto asumen que las toxinas zimocidas de otros géneros están codificadas por genes cromosómicos.

#### 3.1.d. Modo de acción de la toxina zimocida

Bussey y Skipper (1975) y Young (1987) reportan la purificación de dos toxinas zimocidas, una de *S. cerevisiae* y otra de *Pichia kluyveri*. Ambas moléculas parecen unirse a la célula sensible en dos estadios, primero a la pared y después a la membrana. La unión con la membrana posiblemente crea poros, destruyendo su potencial electroquímico y provocando la muerte de la célula. De acuerdo a Radler y Schmitt (1987), la toxina de tipo KI de *S. cerevisiae* primero es absorbida por un glucano de la pared celular y después se une a un receptor de la membrana celular, produciendo la liberación de iones potasio, ATP y otros metabolitos, entonces el gradiente de pH de la membrana es destruido, provocando la inactivación de la célula sensible de levadura.

#### 3.1.e. Biología de la toxina zimocida

Young (1987) reporta que las toxinas producidas por los diferentes tipos zimocidas son activas en distintos valores de pH y tienen diferentes estabilidades al calor y pesos moleculares. Kotani *et al.* (1977) reportan que algunos estudios han mostrado que el crecimiento de levaduras zimocidas de *S. cerevisiae* a altas temperaturas, las convierte en sensibles. De acuerdo a Michalcáková y Repová (1992) el pH del medio, y la actividad proteolítica de las enzimas, así como la presencia de compuestos químicos, pueden provocar inestabilidad en la toxina. Por lo tanto es muy probable que la identificación de muchas cepas zimocidas espere sólo la aplicación de las condiciones correctas, particularmente los valores de pH y la selección de una apropiada cepa sensible; ambos parámetros son críticos para lograr éxito en el procedimiento.

Rosini (1989) indica que para el estudio de la característica zimocida se use un medio con un pH entre 4.2 y 4.7. De acuerdo a Young (1987), se purificó una toxina de la cepa 28 de *S.cerevisiae*, la cual mostró estabilidad a valores de pH mayores de 5.0, y que es diferente de las otras toxinas purificadas en otros trabajos. Según Pasqual (1990) el pH óptimo para algunas toxinas es alrededor de 4.2, y se ha observado que las toxinas no tienen actividad a pH de 5.4.

#### 3.1.f. Distribución del fenómeno zimocida en la naturaleza

La ocurrencia del factor aniquilante o zimocida se extiende a diferentes ambientes incluyendo cultivos de colecciones y levaduras aisladas de hábitat naturales. Starmer *et al.* (1987, 1992), Young (1987) y Van Vuuren y Jacobs (1992) reportan aislamientos a partir de fuentes clínicas y hábitat naturales como frutas, setas, plantas en descomposición y suelo.

Para Starmer *et al.* (1987) la naturaleza del fenómeno zimocida se extiende a levaduras, bacterias, y protoctistas, y sugiere que es potencialmente un mecanismo de competencia.

Las levaduras con actividad zimocida del tipo K1 son fácilmente encontradas en cultivos de colecciones, mientras que las levaduras con el tipo K2 se han encontrado en la naturaleza como parte de la microbiota de uvas usadas para fermentaciones (Rosini, 1989).

### 3.1.g. Estabilidad de la característica zimocida en cultivos de colección.

Makower y Bevan (1963) fueron los primeros en demostrar la actividad zimocida utilizando las cepas de la colección de Oxford, Fink y Styles en (1972) reportaron que varias cepas de diferentes colecciones de EUA mostraron actividad zimocida, Philliskirk y Young (1975) analizaron el efecto zimocida en cepas de la NCYC (National Collection of Yeast Cultures) en Inglaterra.

## 3.2. Importancia industrial de las levaduras zimocidas

### 3.2.a. Levaduras zimocidas contaminantes en diversos procesos de fermentaciones industriales

La frecuencia de cepas zimocidas aisladas de hábitat naturales es mayor que la encontrada en cultivos de colección. La ventaja competitiva de las levaduras zimocidas sobre las sensibles podría explicar esta observación. Similarmente, en las industrias de fermentaciones las levaduras contaminantes muestran una alta incidencia del carácter zimocida, y tienen ventaja competitiva sobre las levaduras comerciales empleadas como inóculo, la mayoría de las cuales son sensibles a la acción zimocida. Las fermentaciones comerciales, particularmente aquellas que emplean *S. cerevisiae* (producción de cerveza, vino, levaduras de panificación) están sujetas a contaminación de las llamadas "levaduras silvestres", que son levaduras distintas a las usadas como cultivos iniciadores. Claramente la presencia de levaduras comerciales zimocidas en fermentaciones o en los productos de fermentación podría dar alguna protección contra la contaminación por levaduras silvestres, las cuales son sensibles a la acción de la toxina (Young, 1987).

Maule y Thomas (1973) y Talbot (1982) determinaron la actividad zimocida de cepas aisladas como contaminantes en diversos procesos de fermentaciones comerciales.

Las levaduras zimocidas fueron responsables de contaminaciones en cervezas, provocando la muerte de la levadura empleada como inóculo y sabores desagradables en el producto.

Naumov *et al.* (1973) describieron los procesos para producción de vino como nicho ecológico adecuado para el desarrollo de levaduras zimocidas e Imamura *et al.* (1974) aislaron cepas zimocidas de koji y del martajado de granos de arroz durante la producción de sake. Mas recientemente, Taylor y Kirsop (1979) reportaron una cepa zimocida causante de serios problemas en una tina de fermentación usada para producción de cervezas...

De acuerdo a Palpacelli *et al.* (1991), durante la producción y almacenamiento de varios alimentos fermentados está frecuentemente involucrado el crecimiento de ciertas levaduras indeseables, tales como *Kloeckera apiculata* la cual produce bajas concentraciones de etanol e indeseables productos de fermentación; *Saccharomyces ludwigii* que tiene una alta resistencia a los compuestos antisépticos tales como SO<sub>2</sub>, y algunas especies de los géneros *Schizosaccharomyces* y *Zygosaccharomyces*, que pueden crecer en 50% de azúcar. Para solucionar estos problemas de contaminación, dichos autores proponen un control biológico de estas levaduras indeseables por mediante el empleo de cultivos iniciadores de levaduras zimocidas que producen metabolitos antifúngicos, como toxinas zimocidas.

Varios estudios realizados en diversos países indican que las levaduras silvestres zimocidas pueden ser un problema significativo en fermentaciones de vino (Radler y Schmitt, 1987; Pasqual *et al.*, 1990; Michalcáková *et al.*, 1991; Petering *et al.*, 1991; Cansado *et al.*, 1992; Van Vuuren y Jacobs, 1992).



Heard y Fleet (1987) indican que la acción de las cepas zimocidas depende de la proporción de levaduras zimocidas y sensibles al comienzo de la fermentación. La dominancia de levaduras zimocidas en fermentaciones con cepas mixtas se reflejó en la producción de etanol, ácido acético y glicerol. El pH y la temperatura de fermentaciones de vino pueden afectar la proporción del crecimiento de células zimocidas tanto en relación a las células sensibles como a la producción y a la actividad de la toxina zimocida.

Como consecuencia de estos problemas potenciales, se ha considerado que si las cepas zimocidas se usan como cultivos iniciadores podrían prevenir el crecimiento de levaduras silvestres sensibles, mientras que ellas mismas serían inmunes a los efectos de cualquier levadura silvestre zimocida presente. Los trabajos en levaduras zimocidas para aplicaciones en la industria son relativamente nuevos. Puede integrarse la característica zimocida a las levaduras industriales para vino y otras industrias más, para que actúen contra un amplio gama de levaduras silvestres (Van Vuuren y Jacobs, 1992).

Según Bortol *et al.*(1986), el carácter zimocida ha sido introducido en cepas usadas en la producción de los siguientes productos: sake, vino blanco, alcohol y cervezas. Se hicieron aislamientos de cepas zimocidas de alimentos naturales y procesados (frutas y vegetales frescos, productos lácteos y de panificación), y transfirieron la característica zimocida a una cepa industrial de *S.cerevisiae* (usualmente usada para panificación y producción de alcohol) por la técnica de fusión de protoplastos; se considera que la transferencia de la capacidad zimocida en cepas industriales puede ser interesante en la producción de alcohol.

Existen reportes de contaminación de levaduras zimocidas en distintos productos por ejemplo: Lachance (1992) aisló levaduras zimocidas del agave tequilero, Marquina *et al.* (1992) aislaron levaduras zimocidas de fermentaciones espontaneas de aceitunas en salmuera.

Kitamoto en (1992), propone el uso de levaduras zimocidas para inhibir el crecimiento de cepas contaminantes en la fermentación en forrajes.

### 3.3. Levaduras

#### 3.3.a. Historia

Probablemente los primeros en usar las levaduras en forma empírica en procesos de fermentación para producción de pan y cerveza fueron los asirios y los egipcios. En la época medieval las levaduras que quedaban como residuos de la fermentación de cerveza eran aprovechadas también para la producción de pan. La producción específica de levaduras para la producción de pan empezó en Europa a finales del siglo XVIII y a principios del XIX; dicha producción era baja y se realizaba mediante procesos anaeróbicos, empleando granos molidos como sustrato. La utilización de cultivos puros, así como una oxigenación eficiente del inóculo, y la adición de nutrientes como fuente de carbono, mejoraron significativamente el proceso de producción de levadura para panificación en los siguientes 100 años. Durante la primera guerra mundial, la escasez de alimento llevó al reemplazamiento de los granos molidos (usados hasta entonces como único sustrato) por melazas de caña o de remolacha o una mezcla de ambas, ya que éstas eran más baratas que los granos y más fáciles de utilizar. Las mejoras que se han realizado en los procesos de manufactura de levaduras para panificación han llevado su producción muy cerca del máximo teórico (Evans, 1990).

Las levaduras para la producción de pan no pueden ser recicladas porque mueren durante los procesos de panificación, y en consecuencia su producción se ha llevado a escala industrial, y desde la última parte del siglo XIX, las levaduras para panificación han sido producidas por compañías especializadas. Sin embargo, no es totalmente correcto decir que las levaduras para panificación no pueden ser recicladas ya que por varios milenios han sido reutilizadas al guardar una porción de la pasta de levaduras (pie ó inoculo) mezclandola con agua fresca y harina para formar la siguiente pasta; aún en la actualidad se sigue practicando en algunos países (Reed y Nagodawithana, 1991).

#### 3.4. Sustratos para producción de levaduras

##### 3.4.a. Melazas

Según Perry *et al.* (1990), los sustratos comerciales para el crecimiento de levaduras son frecuentemente subproductos, los cuales pueden mostrar considerable variabilidad. Las melazas son el producto de desecho de la industria del azúcar, se obtienen durante el proceso de extracción de la sacarosa de la caña o de la remolacha. Se les ha encontrado aplicación como materia prima para la producción de levaduras de panificación: *Saccharomyces cerevisiae* y para la producción de etanol y debido a su composición, son el primer sustrato a elegir para la producción de levaduras para alimentos. La cantidad y número de aditivos requeridos para complementarlas son limitados (ácido sulfúrico y amoníaco para regular el pH).

De acuerdo a Perry *et al.* (1990) las características que hacen apropiadas a las melazas como sustrato para el crecimiento de levaduras dependen en primer término de los procesos técnicos usados durante la producción del azúcar, aunque algunos factores y tratamientos agronómicos en la remolacha o caña son también significativos. La evaluación de las melazas por métodos físicos y químicos requiere de una extensa labor y la mayoría de los laboratorios han desarrollado métodos fermentativos o para el

crecimiento de levaduras. De acuerdo a Evans (1990), otro problema asociado con las melazas como nutrimentos son las impredecibles variaciones en cuanto a su calidad, causadas por fluctuaciones en los contenidos de azúcares y vitaminas, así como la presencia ocasional de inhibidores como el dióxido de azufre ( empleado en el precesamiento de melazas de remolacha), el hidroximetilfurfural (formado en melazas de caña sobrecalentadas durante su procesamiento) el imidodisulfonato de potasio (formado por derivados de nitritos bacterianos durante el procesamiento de melazas de remolacha) y los ácidos grasos.

En la práctica, algunas melazas no son satisfactorias para la producción de levaduras (y las razones no siempre se han establecido, lo que puede deberse a la ausencia o a la insuficiente concentración de un nutrimento o bien a la presencia de algún inhibidor del crecimiento de levaduras, como ácidos grasos, nitritos, varios insecticidas o herbicidas usados en el campo, o bactericidas usados en la fábrica (Reed y Nagodawithana, 1991)

### 3.5 Contaminación

#### 3.5.a. Contaminación en melazas

Tilbury (1967) realizó un estudio en Inglaterra para conocer los microorganismos contaminantes en melazas de caña, sin embargo, por razones comerciales el lugar de donde se tomaron las muestras permaneció anónimo y se le dio el nombre de "Anonland". Las levaduras osmófilas fueron los microorganismos predominantes, particularmente *Saccharomyces rouxii* (sin. de *Zygosaccharomyces rouxii*), aunque también se aislaron varias especies de *Torulopsis* (sin. de *Candida*) como *T. famata* (sin. *Candida famata*) según Kreger-van Rij, 1984. Los mohos predominantes fueron *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum* y especies de *Paecilomyces*; mientras que *Aspergillus glaucus* fue raro. Se demostró el patrón de deterioro producido por levaduras osmófilas en la melaza de caña, y se hizo una estimación de la pérdida económica en 27 000 libras por año

debido al deterioro microbiológico. La principal fuente de contaminación por levaduras osmófilas fueron los residuos de azúcar infectados en las plantas concentradoras, mientras que el aire fue el factor mas importante para la contaminación por esporas de hongos. Ni el uso de germicidas quimicos ni la radiación UV fueron efectivos en la prevención del crecimiento de levaduras osmófilas en las melazas de caña, pero se logró un control satisfactorio reduciendo el  $a_w$  por debajo de 0.65 mediante el secado del azúcar. La mayoría de los microorganismos mueren durante los procesos de clarificación y evaporación de los jarabes excepto algunas esporas de bacterias. Los tanques que contienen los jarabes, así como los que contienen las melazas permanecen frescos por largos periodos, lo cual permite que sobrevivan algunos microorganismos, pero estos posteriormente mueren en los procesos al vacío.

Nagassar-Mohit y Desmond (1989) realizaron estudios sobre levaduras contaminantes en la industria de caña de azúcar en Trinidad y Tobago; mediante muestreos tomados tanto de paredes, pisos, escalones, tuberías de ingenios azucareros como de destilerías aislaron 170 cepas que pertenecían a las siguientes especies: *Cryptococcus laurentii*, *Pichia membranaefaciens*, *Rhodotorula glutinis*, *R. rubra* y *Zygosaccharomyces bailii*.

Así mismo se realizaron estudios sobre levaduras termotolerantes aisladas de ingenios de caña de de azúcar en Australia encontrando las especies: *Kluyveromyces marxianus*, *Hansenula sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Candida sp.*, *Debaryomyces sp.* y el moho *Georichium sp.* Nagassar-Mohit y Desmond (1989) consideran que las diferencias entre sus resultados y los de Australia se deben a que en este sitio se buscaron únicamente organismos termófilos fermentadores de sacarosa.

### 3.5.b. Contaminación en levaduras de panificación

Según Fowell (1965) las levaduras para panificación son manufacturadas principalmente a partir de melazas y la aireación es esencial para incrementar la producción de biomasa. Desafortunadamente la aireación favorece el desarrollo de levaduras silvestres aerobias como *Candida mycoderma* (sin. de *C. vini* y *C. valida*, según Kreger-van Rij, 1984) y *Rhodotorula sp.*, y en consecuencia la contaminación de levaduras silvestres causa mayores problemas en la manufactura de levaduras de panificación que en los procesos fermentativos de producción de cerveza. Las levaduras silvestres que más comúnmente contaminan a las levaduras de panificación en Inglaterra son *Candida tropicalis*, *C. krusei*, *C. mycoderma*, *Trichosporon cutaneum*, *Torulopsis candida* (sin. de *Candida famata*) y *Rhodotorula mucilaginoso* (sin. de *Rhodotorula rubra*).

Las levaduras para panificación siempre contienen algunos organismos contaminantes desde que éstas crecen en fermentadores que no permanecieron completamente estériles. La palabra contaminante no significa que sean organismos dañinos o potencialmente dañinos sino que son organismos diferentes al cultivo iniciador. Las especificaciones sanitarias para levaduras de panificación señalan ausencia de *Salmonella* y otros patógenos, y restringe el número de organismos coliformes a menos de 1000 u.f.c./g, y la cuenta de *Escherichia coli* debe ser menor de 100 u.f.c./g.

Las plantas productoras de levaduras para panificación en EUA siguen prácticas estrictas de buena producción y las reglas de la Food and Drug Administration, y hacen grandes esfuerzos para mantener al mínimo el número de contaminantes. Las melazas son generalmente esterilizadas mediante cambios continuos de temperatura y el aire usado para

airear los fermentadores se pasa a través de filtros, o es calentado. Los tanques de fermentación son totalmente aseados con soluciones alcalinas calientes o detergentes, y en caso necesario se tallan. Esto es importante para prevenir a los organismos trepadores que en una intensa supervisión pueden ser un riesgo de contaminación. Todas las pipas, bombas, válvulas y otros equipos auxiliares deben ser completamente aseados. Es importante también considerar la posible contaminación de otros equipos accesorios, como pipas de aire, potenciómetros y otros instrumentos. Particular atención se debe prestar a los ductos para salida de aire que se usan, para prevenir la condensación dentro de los fermentadores. Así mismo deben vigilarse los procesos para el crecimiento de levaduras, los cuales incluyen el uso de centrifugas, prensas, filtros y todas las operaciones para el empaclado, incluyendo los secadores para los liofilizados.

Las levaduras son un excelente medio para el desarrollo de bacterias contaminantes, ya que éstas se depositan sobre las levaduras húmedas o secas y sobre el equipo siendo esto una fuente de infección. Ocasionalmente, la contaminación con *Oidium lactis* (sin. de *Geotrichum candidum*) u otros hongos ha sido reportada.

Fowell (1965) ha reportado métodos como la utilización de placas de lisina agar, para la detección y estimación de bacterias, levaduras, y mohos como contaminantes en levaduras de panificación.

Las cepas de levaduras que son usadas en procesos de fermentación normalmente no son zimocidas. La conversión de estas cepas industriales en cepas zimocidas podría proteger los procesos de fermentación contra la contaminación por levaduras silvestres y por lo tanto podría ser de gran importancia en la producción de vino, cerveza y destilados.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Melazas**

#### **4.1.a. Muestreo**

Se obtuvieron 10 muestras de melazas en envases de vidrio estériles, procedentes de diversos ingenios de azúcar del estado de Veracruz, México.

### **4.2 Aislamiento de levaduras procedentes de melazas**

#### **4.2.a. Enriquecimiento y dilución de las muestras**

Se diluyó cada una de las muestras en condiciones asépticas de la siguiente forma: 10 g de melaza en 90 ml de agua destilada adicionada con 0.2 % de extracto de levadura, 0.5% de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , 0.5% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  obteniéndose un volumen final de 100 ml en los matraces de 500 ml, que se incubaron con agitación 48h a 25°C; posteriormente se realizaron las resiembras en placas de Papa Dextrosa Agar (PDA, Bioxon) incubandose 72h a 25°C. Mediante observaciones microscópicas se comprobó la pureza de las cepas aisladas.

#### **4.2.b. Mantenimiento de las cepas puras**

Para el mantenimiento de las cepas se hicieron resiembras cada 60 días en tubos inclinados de PDA con tapones de algodón, los que se incubaron a 25°C por 72 h y posteriormente se refrigeraron a 5°C.

### **4.3. Identificación de levaduras**

Los criterios fundamentales para la identificación de las cepas aisladas de las melazas se basaron en las metodologías y las claves taxonómicas del tratado de Kreger-van Rij (1984).



**Cuadro I. Características morfológicas y fisiológicas consideradas para el estudio de las levaduras aisladas de melazas de caña.**

<b>I. Características morfológicas</b>	<b>II. Características fisiológicas y bioquímicas</b>
<b>A. Macromorfología o características culturales de los cultivos</b>	<b>1. Utilización de compuestos de carbono</b>
<b>B. Micromorfología</b>	a) Fermentación de 6 carbohidratos
<b>1. Características de las células vegetativas</b>	b) Asimilación de 19 compuestos de carbono
a) Morfología en medio sólido	<b>2. Utilización de compuestos de nitrógeno</b>
b) Formación de pseudomicelio y micelio verdadero	a) Asimilación de $KNO_3$
<b>2. Características de la reproducción asexual o vegetativa</b>	b) Asimilación de L-lisina
<b>3. Características de la reproducción sexual</b>	c) Asimilación de cadaverina
a) Proceso de formación de ascas y ascosporas	<b>3. Requerimientos de vitaminas para el crecimiento</b>
b) Características de ascas y ascosporas	a) Crecimiento en medio libre de vitaminas
	b) Vitaminas que promuevan el crecimiento
	<b>4. Resistencia al antibiótico cicloheximida</b>
	(concentraciones de 0.01 y 0.1%)
	<b>5. Crecimiento en medios de alta presión osmótica</b>
	a) Tolerancia a 50 % de glucosa
	b) Tolerancia a 10% de NaCl y 5% glucosa
	<b>6. Producción extracelular de compuestos amiloides</b>
	<b>7. Crecimiento a 37°C</b>

#### 4.4. Actividad zimocida en levaduras aisladas de melazas

##### 4.4.a. Determinación de condiciones óptimas para el experimento

Se hicieron ensayos previos al experimento para determinar las condiciones físicas que se utilizarían, probándose inicialmente dos condiciones de pH: 4.2 y 4.8, que son los límites reportados para la expresión del factor zimocida en *Saccharomyces cerevisiae*, y dos temperaturas: 20°C y 30°C. Finalmente se seleccionaron las siguientes condiciones: pH 4.8 y temperatura de incubación 30°C, concentración celular de cepas sensibles  $2.7 \times 10^8$  ufc/ml.

##### 4.4.b. Medios de cultivo

Modificando el método descrito por Woods y Bevan (1968), se determinó el efecto zimocida de las levaduras aisladas de las melazas mediante el espectro de actividad contra 2 cepas sensibles: *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006, y *Candida glabrata* Y55.

Las cepas aisladas de las melazas, así como las sensibles, fueron precultivadas con agitación por 24h a 30°C en 100ml de medio líquido ELEMPG (composición en g/litro: extracto de levadura 3.0, extracto de malta 3.0, peptona 5.0, glucosa 10). *C. glabrata* Y 55 se precultivó en 100ml de medio líquido de extracto de malta (EM, Difco) en matraces de 500ml.

Para observar la actividad zimocida se prepararon las placas de la siguiente manera: se agregaron 3.9 g/100 ml de PDA, se agregaron a 100 ml de una solución amortiguadora de fosfatos para obtener un pH final de 4.8; después de esterilizar el medio durante 15 min a 115 lbs/pulg<sup>2</sup> en autoclave, se enfrió hasta una temperatura de 45°C y se le agregó una solución de azul de metileno hasta obtener una concentración final en el medio de 0.003% filtrada a través de un filtro millipore de 0.45 µm de porosidad (el azul de metileno permite revelar la presencia de células muertas).

Para cada una de las cepas aisladas de melazas se utilizaron dos placas de PDA, una de las cuales fue inoculada con la cepa *S. cerevisiae* NCYC 1006, mientras que la otra se inoculó con *C. glabrata* Y 55. Ambas cepas sensibles se diluyeron hasta una densidad óptica de 1.0, medida a 650 nm en un espectrofotómetro, y a partir de esta suspensión (conteniendo  $2.7 \times 10^8$  u.f.c./ml) se tomaron alícuotas de 0.5 ml con las que se inocularon las placas de PDA. El inóculo se extendió con rodillo de vidrio sobre toda la superficie de la placa formando una película delgada para asegurar la formación de un tapete uniforme de células. A cada placa se le perforaron cuatro pozos de 0.5 cm de diámetro y en cada uno se inocularon 50 µl de la cepa zimocida; las placas se incubaron por 96 h a temperatura ambiente.

#### 4.4.c. Evaluación de la actividad zimocida de las cepas de levaduras

La evaluación de la intensidad en la actividad zimocida se determinó por el promedio del diámetro de inhibición del crecimiento de la cepa sensible al rededor de los cuatro pozos. Los valores de referencia fueron: i) la máxima actividad zimocida de *S. cerevisiae* NCYC 190 contra las cepas sensibles *C. glabrata* Y 55 y *S. cerevisiae* NCYC 1006 ii) la nula actividad zimocida inoculando agua estéril en los pozos usada como control negativo, contra las cepas sensibles: *C. glabrata* Y 55 y *S. cerevisiae* NCYC 1006.

#### 4.5 Efecto zimocida y sensibilidad en levaduras

Se realizaron también las siguientes determinaciones de efecto zimocida para lo cual se prepararon los medios de la misma manera; a las cepas se les dio el mismo tratamiento descrito anteriormente. se inocularon las cepas para probar el efecto zimocida dentro de los pozos y a las cepas sensibles se inocularon como tapetes en las placas de PDA.

4.5.a. Determinación del efecto zimocida de las levaduras aisladas de melazas contra las de colección.

4.5.b. Efecto de las levaduras zimocidas aisladas de las melazas contra las levaduras de panificación.

Se usaron 4 cepas de panificación como tapetes sensibles para probar el efecto de las 13 cepas zimocidas aisladas de las melazas.

4.5.c. Efecto de la levadura zimocida de colección *S. cerevisiae* NCYC 190 contra las levaduras de melazas.

Se usaron 13 cepas aisladas de melazas como tapetes sensibles para probar el efecto de la cepa zimocida de colección *S. cerevisiae* NCYC 190.

#### 4.6. Levaduras de panificación

##### 4.6.a. Muestreo

Se seleccionaron por disponibilidad cuatro cepas de levaduras comerciales de panificación *S. cerevisiae*, 2 activas secas de México y 1 de EUA, así como una en pasta, de México. Las marcas correspondientes se muestran en la Tabla 4.

##### 4.6.b. Identificación

Los criterios usados para su identificación fueron los mismos que para las levaduras de las melazas y se basaron en las claves taxonómicas de Kreger-van Rij (1984).

#### 4.7. Efecto zimocida en levaduras de panificación

4.7.a. Efecto de la cepa zimocida *S. cerevisiae* NCYC 190 contra las levaduras de panificación.

Se usaron como tapetes sensibles las 4 levaduras de panificación para probar el efecto de la cepa zimocida *S. cerevisiae* NCYC 190.

4.7.b. Efecto de las levaduras de panificación contra las cepas sensibles de colección *S. cerevisiae* NCYC 1006 y *C. glabrata* Y 55.

Se usó como tapete sensible a *S. cerevisiae* NCYC 1006 y a *C. glabrata* Y 55 y se observó el efecto de las levaduras de panificación.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Melazas

#### 5.1.a. Aislamiento e identificación de levaduras

A partir de las 10 muestras de melazas analizadas se aislaron 13 cepas, que correspondieron a 4 especies: *Torulaspota delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. En la Tabla 1 se muestra el número de especies identificadas, así como su origen.

Tabla 1. Número de especies de levaduras aisladas de melazas indicando su procedencia.

Procedencia Ingenios	Número de cepas aisladas	
Sn. Nicolás	1	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
Motzorongo	1	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
Central Progreso	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Granja Sta. Ana Atzacán	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Cuatlapan	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Sn. Miguelito	3	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Sn. Nicolás (Proveniente de otros ingenios)	1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Sayula	3	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
El Poirero	1	<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>albidus</i>
El Naranjal	0	

## 5.2. Actividad zimocida de levaduras aisladas de melazas

5.2.a. Se determinó el efecto zimocida de las levaduras de melazas contra dos levaduras sensibles de colección: *S. cerevisiae* NCYC 1006 y *C. glabrata* Y 55.

Nueve de las 13 cepas aisladas presentaron actividad zimocida, (Tabla 2).

**Tabla 2. Determinación de actividad zimocida de las levaduras aisladas de las melazas, contra dos cepas sensibles *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 y *Candida glabrata* Y 55.**

Levaduras aisladas de melazas a las que se les determinó actividad zimocida	Levaduras sensibles	
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. glabrata</i>
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	0 *	1.5
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	1.0	2.0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	1.8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.25	1.0
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0	0.75
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0	0
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0	0
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0.5	1.25
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1.75	0
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0	0
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0	0
<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>albidus</i>	0	1.25

\*Valor promedio en cm del diámetro del halo de inhibición de crecimiento alrededor de los pozos.

5.2.b. Efecto de la levadura zimocida de colección *S. cerevisiae* NCYC 190 contra las levaduras aisladas de melazas.

Con el fin de determinar el efecto zimocida de las melazas, se realizaron las pruebas cruzadas. De las 13 cepas estudiadas todas resultaron resistentes excepto la cepa de *S. cerevisiae* (procedente de Cuautlapan) que fue sensible.

5.2.c. Efecto de las levaduras de las melazas contra las levaduras de panificación

Las levaduras de panificación fueron resistentes contra las levaduras zimocidas aisladas de melazas (Tabla 6).

5.2.d. Sensibilidad de las cepas de colección *S. cerevisiae* y *C. glabrata* usadas como tapetes

La levadura *C. glabrata* Y55 tuvo mayor sensibilidad que *S. cerevisiae* NCYC 1006 ya que fue sensible a un mayor número de cepas zimocidas aisladas de melazas y el valor promedio del diámetro del halo de inhibición alrededor de los pozos, en la mayoría de los casos, fue mayor.

### 5.3. Levaduras de panificación

#### 5.3.a. Identificación

Se obtuvieron muestras de levaduras comerciales para panificación, determinándose su pureza, y su identidad siguiendo los criterios compilados por Kreger-van Rij (1984).

En la Tabla 3 se muestran las especies identificadas, así como su marca comercial, país de procedencia y presentación.



**Tabla 3. Identificación hasta raza de las cepas comerciales de panificación.**

<b>Especies</b>		<b>Marca</b>	<b>Presentación</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	raza <i>cerevisiae</i>	AZTECA (México)	Pasta
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	raza <i>cerevisiae</i>	RED STAR (E.U.A.)	Activa seca
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	raza <i>steineri</i>	SAFMEX 250491 (México)	Activa seca
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	raza <i>cerevisiae</i>	SAFMEX (México)	Activa seca

#### 5.4. Actividad zimocida en levaduras de panificación

5.4.a. Efecto de la cepa zimocida de colección *S. cerevisiae* NCYC 190 contra las levaduras de panificación

Las cepas de panificación resultaron sensibles frente a la cepa zimocida *S. cerevisiae* NCYC 190.

En la Tabla 4 se observan los promedios de los diámetros de inhibición de la levadura zimocida contra las cepas sensibles de panificación.

**Tabla 4. Determinación de la sensibilidad de las cepas de panificación utilizadas como tapete contra la cepa zimocida *S. cerevisiae* NCYC 190.**

<b>Levadura zimocida</b>	<b>Levaduras sensibles</b>			
	AZTECA	RED STAR	SAFMEX 250491	SAFMEX
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 190	1.8*	2.75	2.1	2.0

\*Los datos son el valor promedio en cm del diámetro de los halos de inhibición alrededor de los pozos.

5.4.b. Efecto de las levaduras de panificación contra las cepas sensibles de colección *S. cerevisiae* NCYC 1006 y *Candida glabrata* Y 55.

Las cepas de panificación fueron zimocidas contra *S. cerevisiae* NCYC 1006. y contra *C. glabrata* Y 55 (Tabla 5).

**Tabla 5. Determinación de la actividad zimocida de levaduras de panificación contra las cepas sensibles de colección *S. cerevisiae* NCYC 1006 y *C. glabrata* Y55 utilizadas como tapetes sensibles.**

Levaduras de panificación a las que se determinó actividad zimocida	Levaduras sensibles	
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. glabrata</i>
AZTECA	1.8*	0
RED STAR	2.75	2.25
SAFMEX 250491	2.1	2.0
SAFMEX	1.5	1.0

---

\*Valor promedio en cm del diámetro del halo de inhibición alrededor de los pozos.

#### 5.5. Determinación de los fenotipos de las cepas probadas

Con base en la nomenclatura citada por Wickner y Leibowitz (1979), Young (1987) y Salek (1990), mediante pruebas cruzadas, se designaron los fenotipos zimocidas de las levaduras estudiadas como se observa en la Tabla 6.

**Tabla 6. Resultados del bioensayo de reacción cruzada entre cepas zimocidas y sensibles aisladas de melazas de caña, de levaduras comerciales de panificación y cepas de colección.**

<b>Cepas probadas para sensibilidad</b>					
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006	C. <i>glabrata</i> Y 55	Levaduras de melazas	1,2,3,4,5,6,7,8, 9,10,11,12	13	Lev.de panificación I,II,III,IV
<b>Cepas probadas para actividad zimocida</b>					
<b>Levaduras de melazas</b>					
1 <i>T. delbrueckii</i> (Sn. Nicolás)	K+*	K-*	np*	np	K-
2 <i>S. cerevisiae</i> (Central Progreso)	K-	K-	np	np	np
3 <i>T. delbrueckii</i> (Motzorongo)	K-	K-	np	np	np
4 <i>S. pombe</i> (Sn. Nicolás)	K+	K-	np	np	np
5 <i>S. pombe</i> (Sayula)	K+	K-	np	np	np
6 <i>S. pombe</i> (Sayula)	K-	K-	np	np	np
7 <i>S. pombe</i> (Sayula)	K-	K-	np	np	np
8 <i>S. pombe</i> (Sn. Miguelito)	K-	K-	np	np	np
9 <i>S. pombe</i> (Sn. Miguelito)	K-	K-	np	np	np
10 <i>S. pombe</i> (Sn. Miguelito)	K-	K-	np	np	np
11 <i>C. albidus</i> var <i>albidus</i> (El Potrero)	K+	K-	np	np	np
12 <i>S. cerevisiae</i> (Sta. Ana Aztlacatl)	K+	K-	np	np	np
13 <i>S. cerevisiae</i> (Cuautlapan)	K-	K-	np	np	np
<b>Levaduras de panificación</b>					
I <i>S. cerevisiae</i> raza <i>cerevisiae</i>	K-	K-	np	np	np
II <i>S. cerevisiae</i> raza <i>cerevisiae</i>	K+	K-	np	np	np
III <i>S. cerevisiae</i> raza <i>steineri</i>	K+	K-	np	np	np
IV <i>S. cerevisiae</i> raza <i>cerevisiae</i>	K+	K-	np	np	np
<b>Levaduras de colección</b>					
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 190	K-	K-	K-	K-	K-

\*K+ actividad zimocida  
 \*K- nula actividad zimocida  
 \*np no se hizo la prueba

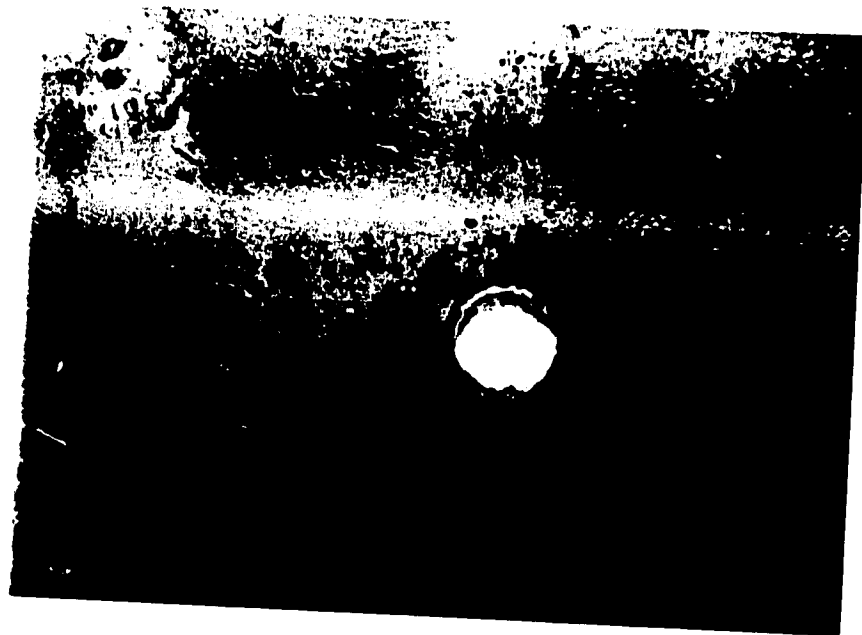


Figura 1. El halo de inhibición alrededor del pozo muestra la actividad zimocida de la cepa de colección *S. cerevisiae* NCYC 190 contra la cepa sensible de colección *C. glabrata* Y 55.

## 6. DISCUSIONES

### 6.1. Melazas

#### 6.1.a. Identificación de las levaduras aisladas de las melazas

Las especies de levaduras identificadas fueron las siguientes: 3 de *Saccharomyces cerevisiae*, 2 de *Torulaspota delbrueckii*, 7 de *Schizosaccharomyces pombe*, y 1 de *Cryptococcus albidus* var. *albidus*.

En la identificación encontramos que en los aislamientos obtenidos de melazas la mayoría de las especies fueron capaces de crecer en medios hipertónicos con excepción de *Cryptococcus* que mostró crecimiento débil en el medio 50% (p/p) glucosa extracto de levadura agar, por lo tanto coincidimos con Tilbury (1967) quien hizo un estudio en Inglaterra de la microbiota contaminante en melazas y encontró que las levaduras osmófilas fueron los microorganismos predominantes.

Entre los sustratos de donde han sido aisladas las especies aquí identificadas están: *Torulaspota delbrueckii* se ha aislado de caña de azúcar, ingenios de caña, uvas, jugo de uvas, vino, bebidas y jugos de frutas y suelo, entre otros. *Saccharomyces cerevisiae* se ha aislado de muy diversos sustratos, entre otros, bebidas fermentadas como cerveza, vino, sidra y sake, jugos y frutas (como pera, manzana y uva), y otros sustratos, como queso, miel, destilerías, kefir, suelo, hojas de eucalipto, piel humana, boca, etc. *Schizosaccharomyces pombe* se ha aislado de arak, melazas, jugo de uva, levadura de cerveza, caña de azúcar, vino de palma, manzana, cerveza bantu. *Cryptococcus albidus* var. *albidus* se ha aislado de aire, sake, vino, hojas, suelo, botellas lavadas en cervecerías y de tanques de purificación de aguas contaminadas, entre otros (Kreger van- Rij 1984).

Nagassar- Mohit y Desmond (1989), realizaron aislamientos de levaduras en ingenios azucareros y en destilerías de ron, sin embargo, sus resultados no conciben con un estudio similar realizado por Anderson *et al.* (1988), y consideran que se debió entre otros factores a las condiciones ambientales propias de cada país.

No se conocen trabajos sobre la microbiota contaminante en melazas de México, las referencias con que contamos son de otros países y existe diferencia en cuanto a la predominancia de las especies de levaduras reportadas por otros autores y nuestros resultados.

#### 6.2. Determinación de la característica zimocida en levaduras aisladas de melazas

El fenómeno zimocida se descubrió por primera vez en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y posteriormente en otros géneros más como *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis* sin. de *Candida* según Kreger van-Rij, 1984 (Young, 1987), *Metchnikowia* (Farris *et al.*, 1991; Lachance, 1993), *Torulaspota* (Radler *et al.*, 1992), *Kloeckera*, *Zygosaccharomyces*, (Goto *et al.*, 1991) y *Hanseniaspora* (Zorg *et al.*, 1988; Starmer, 1992).

De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, a la fecha no se conocen trabajos sobre identificación de levaduras zimocidas en melazas de caña. En el presente estudio 9 de las 13 cepas aisladas fueron zimocidas lo que significa que el 69.23% de las levaduras analizadas presentaron dicho carácter aniquilante

De todas las especies identificadas únicamente en *Schizosaccharomyces pombe* no se había reportado actividad zimocida; pero en la presente investigación 3 de los 7 aislamientos estudiados mostraron dicha actividad.

#### 6.2.a. Sensibilidad de las cepas utilizadas como tapetes

En cuanto a la sensibilidad de las levaduras utilizadas como tapete para probar el efecto zimocida de las levaduras de melaza, *C. glabrata* Y55 tuvo mayor sensibilidad que *S. cerevisiae* NCYC 1006, esto se debe a que *C. glabrata* Y 55 es sensible a la mayoría de las toxinas conocidas, pero resistente a su propia toxina K4 (Starmer *et al.*, 1987).

### 6.3. Levaduras de panificación

#### 6.3.a. Sensibilidad de las levaduras utilizadas en la industria de panificación

De acuerdo a Young (1987) la mayoría de las levaduras comerciales son sensibles frente a las levaduras zimocidas sin embargo, en el presente estudio las cepas de panificación fueron resistentes frente a las cepas zimocidas aisladas de las melazas de caña, pero sensibles frente a la cepa zimocida de colección *S. cerevisiae* NCYC 190.

#### 6.3.b Actividad zimocida en levaduras utilizadas en la industria de panificación

Se observó actividad zimocida en las cepas comerciales de panificación contra las cepas sensibles de colección *S. cerevisiae* NCYC 1006 y *C. glabrata* Y55.

#### 6.3.c. Contaminación en levaduras de panificación

De acuerdo con Fowell (1965) debido a que las levaduras de panificación son sometidas a aireación para incrementar su biomasa, están sujetas a la contaminación por levaduras silvestres, sin embargo, no se encontró contaminación alguna. Probablemente se debió a que las levaduras para panificación presentaron actividad zimocida y esto les dió cierta ventaja competitiva sobre las levaduras contaminantes.

#### 6.4. Fenotipos zimocidas de las levaduras analizadas

De acuerdo a Young (1987) las reacciones cruzadas nos proporcionan dos criterios para clasificar, el "grupo zimocida" y el "grupo de resistencia" a la actividad de otras levaduras.

Además se conocen algunas cepas mutantes que pueden ser sensibles a una toxina pero resistentes a otra, ya que las toxinas deben ser bioquímicamente diferentes.

Sabiendo que *S. cerevisiae* NCYC 190 presenta una toxina del tipo K1 (Anónimo, 1990) y esta toxina es zimocida contra las cepas del tipo K2, K3 y K4 y que *C. glabrata* Y 55 presenta el tipo K4, y es resistente a otras levaduras de este mismo tipo, pero sin embargo, también es sensible a la mayoría de las toxinas zimocidas conocidas (Starmer, 1987), podríamos deducir que probablemente las cepas que no inhibieron a *C. glabrata* Y55 tengan toxinas de tipo K4, mientras que las cepas que se mostraron resistentes frente a *S. cerevisiae* NCYC 190 probablemente tengan toxinas diferentes a K2, K3 y K4.



## 7. CONCLUSIONES

Se demuestra con este estudio la presencia de levaduras zimocidas en las melazas de caña ya que de los 13 aislamientos obtenidos 9 presentaron dicha actividad.

Se registra además por primera vez actividad zimocida en *Schizosacchomyces pombe*.

## 7. LITERATURA CITADA

Anderson P J, Mc Neil, K E y Watson K. (1988). Isolation and identification of thermotolerant yeasts from australian sugar cane mills. *J. Gen Microbiol.*, 134, 1691-1698.

Anónimo (1990). National Collection of Yeast Cultures Catalogue of Cultures. Painting K A y Jackman PJH eds. Norwich UK.

Bortol A, Nudel C, Fraile E, de Torres R, Giuliatti A, Spencer J F T, Spencer D. (1986). Isolation of yeast with killer activity and its breeding with an industrial baking strain by protoplast fusion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 414-416.

Bussey H y Skipper N (1975). Membrane-mediated killing of *Saccharomyces cerevisiae* by glycoproteins from *Torulopsis glabrata*. *J. Bacteriol.*, 124, 476-483.

Cansado J, Velázquez J B, Calo P, Sieiro C, Longo E, Villa T G (1992). Characterization of killer-resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from spontaneous fermentations. *FEMS Microbiol. Lett.*, 97, 13-18.

Evans I H ( 1990) Yeast strains for baking: recent developments. En: *Yeasts Technology*, Spencer J F T y Spencer D M, pp. 14, Springer- Verlag, London.

Farris G A, Mannazzu I., and Budroni M. (1991). Identification of killer factor in the yeast genus *Metschnikowia*. *Biotechnol. Lett.*, 13, 297-298.

Fink G R y Styles C A (1972). *Proc Nat Acad Sci USA*. ( citado en Young, 1987).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Fowell R R (1965). The identification of wild yeast colonies on lysine agar. *J. Appl. Bacteriol.*, 28, 373-383.

Goto S, Kitano K y Shinohara T. (1992). Utilization of KHR killer as genetic marker for purity test of starter yeast during fermentation of grape musts. *J. Ferment. Bioeng.*, 73, 70-72.

Gunge N (1983). Yeast DNA plasmids. *Ann. Rev. Microbiol.*, 37, 253-76.

Heard G M y Fleet G H. (1987). Occurrence and growth of killer yeasts during wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2171-2174.

Huan B, Shen Y y Bruenn J A. (1991). In vivo mapping of a sequence required for interference with the yeast killer virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88, 1271-1275.

Imamura T, Kawamoto M y Takaoka Y (1974). *J. Ferment. Technol.*, 52, 293-9. (citado en Young, 1987).

Jacobs C J y Van Vuuren H J J. (1991). Effects of different killer yeasts on wine fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.*, 42, 295-300.

Kotani H, Shinmyo A, y Enatsu T. (1977) Killer toxin for sake yeast: properties and effects of adenosine 5'- diphosphate and calcium ion on killing action. *J. Bacteriol.*, 129, 640-650

Kreger-van Rij, N J W. (1984). *The Yeasts. A Taxonomic study*, pp. 1082, Elsevier, Amsterdam.

Lachance M A. (1993). *Metschnikowia agaveae* sp. nov., a heterothallic haploid yeast from blue agave. *Can. J. Microbiol.*, 9, 562-566.

Maule A P y Thomas P D. (1973). *J. Inst. Brew.*, 79, 137-141 (citado en Rosini, 1989).

Makower M y Bevan E A. (1963). *Proc. Int. Cong. Gen.* (citado en Rosini, 1989).

Marquina D, Peres C, Caldas FV, Marques J F, Peinado JM, Spencer-Martins I. (1992). Characterization of the yeast population in olive brines. *Lett. Appl. Microbiol.*, 14, 279-283.

Michalcáková S y Repová L. (1992). Effect of ethanol, temperature and pH on the stability of killer yeast strains. *Acta Biotechnol.*, 12, 163-168.

Michalcáková P, Sulo Hapalová J, Miárik E. (1991) Occurrence and properties of killer strains among Czechoslovakian wine yeasts. *Vitic. Enol.*, 46, 123-126.

Nagassar- Mohit G y Desmond A A (1989). Studies on yeasts in the sugar cane industry in Trinidad and Tobago. Presented at the seminar on biotechnology, Havana, Cuba.

Naumov G I, Tyurina L X, Bur'yan N I y Naumova T I (1973). *Biol. Nauki*, 16, 103-7 (citado en Rosini, 1989).

Palpacelli V, Ciani M, Rosini G (1991). Activity of different "killer" yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. *FEMS Microbiol. Lett.*, 84, 75-78.

Pasqual M, Carau J, Serafini L, Dillon AJP. (1990). A simple method to detect killer yeasts in industrial systems. *J. Ferment. Bioeng.*, 70, 180-181.

Perry B F, Miles R J, Beezer A E (1990). Calorimetry for yeast fermentation monitoring and control. En: *Yeast technology*, Spencer J F T y Spencer D M, eds. pp. 308. Springer Verlag, London.

Petering J E, Symons M R, Langridge P, y Henschke P A. (1991). Determination of killer yeast activity in fermenting grape juice by using a marked *Saccharomyces* wine yeast strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3232-3236.

Philliskirk G y Young T W. (1975). *Anton Leeuwenhoek* ( citado en Young, 1987).

Radler F y Schmitt M. (1987). Killer toxins of yeasts: Inhibitors of fermentation and their adsorption. *J. Food Protec.*, 50, 234-238.

Radler F, Herzberger S, Schöning I, Schwarz P. (1992). Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bailii*. *J. Gen. Microbiol.*, 139, 495-500.

Reed G y Nogodawithana T W. (1991). *Yeast Technology*. 2nd. edition., Van Nostrand Reinhold, New York.

Rosini G (1989). Killer yeasts: notes on properties and technical use of the character. En: *Biotechnology applications in beverage production*. Cantarelli C, Lanzarini G, eds., pp. 41-47, Elsevier, London.

Salek A, Schnettler y Zimmermann U (1990). Transmission of killer activity into laboratory and industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* by electroinjection. FMS Microbiol. Lett., 70, 67-72.

Salek A, Schnettler y Zimmermann U (1992). Stably inherited killer activity in industrial yeast strains obtained by electrotransformation. FEMS Microbiol. Lett., 96, 103-110.

Skipper N, y Bussey H (1987) Mode of action of yeast toxins: Energy requirement for *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin. J. Bacteriol., 129, 668-677.

Starmer W T, Ganter P F, Aberdeen V, Lachance M A, y Phaff H. J. (1987). The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. Can. J. Microbiol., 33, 783-796.

Starmer, W T, Gater P F y Aberden V (1992). Geographic distribution and genetics of killer phenotypes for the yeast *Pichia kluyveri* en U.S.A. Appl. Environ. Microbiol., 58, 990-997.

Taylor R y Kirsop B. (1979). J. Inst. Brew. 85, 325 (citado en Young, 1987).

Talbot N P. (1982) M. Sc. Thesis: University of Birmingham, U. K. En: Young T W (1987) The yeasts.

Tilbury, R H.(1967). Studies on the microbiological deterioration of raw cane sugar, with special reference to osmophilic yeasts and the preferential utilisation of laevulose in invert. M Sc. thesis. University of Bristol, U.K.

Van Vuuren H J J y Jacobs C J.(1992). killer yeasts in the wine industry. A review. *Am.J. Enol. Vitic.* 43, 119-128.

Vodkin M. (1977). Induction of yeast killer factor mutations. *J. Bacteriol.*, 132, 346-348.

Wickner R B y Leibowitz M J. (1979) *mak* Mutants of yeast: mapping and characterization. *J. Bacteriol.*, 40.154-160.

Woods D R y Bevan E A. (1968) *J. Gen. Microbiol.* 51, 115-26 (citado en: Young, 1987).

Young, T W. (1987). Killer yYeasts. En: *The Yeasts* 2nd. edition, A.H. Rose and J.S. Harrison, eds. vol.2, pp. 131-164, Academic Press, London.

Zorg J , Kilian S, y Radler F. (1988). Killer toxin producing strains of the yeasts *Hanseniaspora uvarum* y *Pichia kluyveri*, *Arch. Microbiol.*, 149, 261-267.