

37
27



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE
LEVADURAS CON FACTOR ZIMOCIDA DEL
PULQUE Y AGUAMIEL



EXAMENADO Y APROBADO POR
EL C. DE QUIMICA

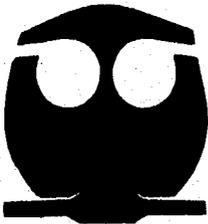
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

ALMA ROSA ESTRADA GODINA



MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
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.

JURADO ASIGNADO

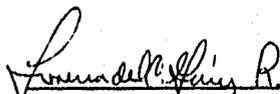
Presidente: Prof. ROSA MARIA RAMIREZ GAMA.
Vocal: Prof. MARIA DE LOURDES ESCAMILLA HURTADO.
Secretario: Prof. LORENA DEL CARMEN GOMEZ RUIZ.
1er. Suplente: Prof. JOSE MARIANO GARCIA GARIBAY
2do. Suplente: Prof. MARIA VICTORIA COUTIÑO COVARRUBIAS

Sitio donde se desarrolló el tema: UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA UNID. IZTAPALAPA E INSTITUTO DE BIOLOGIA UNAM.

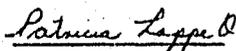
Asesor del tema

Supervisor Técnico

Sustentante



M en C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz



Dra. Patricia Lappe Oliveras



Alma Rosa Estrada Godina

JURADO ASIGNADO

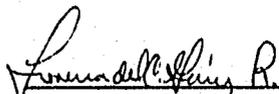
Presidente: Prof. ROSA MARIA RAMIREZ GAMA.
Vocal: Prof. MARIA DE LOURDES ESCAMILLA HURTADO.
Secretario: Prof. LORENA DEL CARMEN GOMEZ RUIZ.
1er. Suplente: Prof. JOSE MARIANO GARCIA GARIBAY
2do. Suplente: Prof. MARIA VICTORIA COUTIÑO COVARRUBIAS

Sitio donde se desarrolló el tema: UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA UNID. IZTAPALAPA E INSTITUTO DE BIOLOGIA UNAM.

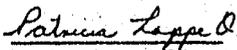
Asesor del tema

Supervisor Técnico

Sustentante



Me en C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz



Dra. Patricia Lappe Oliveras



Alma Rosa Estrada Godina

A MIS PAPAS:

José Angel Estrada Castillo
y Ma. del Refugio Godina de Estrada

con todo mi amor y agradecimiento.

A MIS HERMANOS:

José Angel, Araceli, Arnoldo
y Alejandro.

A CARLOS

Por su cariño y apoyo
constante.

A LORENA GOMEZ RUIZ Y MARIANO GARCIA GARIBAY

Por su confianza y gran apoyo desde el inicio de este proyecto y por brindarme su amistad.

1000 GRACIAS.

A LA UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA

Y a toda su gente.

AL INSTITUTO DE BIOLOGIA DE LA UNAM

Especialmente a la Dra. Patricia Lappe por su valiosa colaboración y oportunas críticas para la realización de este trabajo.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	
LEVADURAS	3
IDENTIFICACIÓN	4
- I Subdivisión Ascomycotina	4
- II Subdivisión Basidiomycotina	5
- III Subdivisión Deuteromycotina	6
FACTOR ZIMOCIDA	7
DISTRIBUCIÓN DE LEVADURAS ZIMOCIDAS	8
I Clasificación de levaduras respecto al factor zimocida	8
Cuadro de clasificación de levaduras zimocidas	10
II Tipos de toxinas y actividad zimocida	18
III Biología del fenómeno zimocida	19
a) ds RNA plásmidos	19
b) ds DNA plásmidos	21
c) DNA cromosomal	21
d) Determinantes no identificados	22
IV Condiciones óptimas para la actividad zimocida	22
APLICACIONES DE LAS LEVADURAS ZIMOCIDAS	23
PULQUE	24
OBJETIVOS	27

MATERIALES Y METODOLOGÍA	28
1.-AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN.	28
Diagrama 1	29
2.-DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL FACTOR ZIMOCIDA.	32
Diagrama 2	34
Diagrama 3	37
3.-RESISTENCIA ALCOHÓLICA.	38
Diagrama 4	38
RESULTADOS	
1.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN.	
Tabla 1. Levaduras y mohos aislados de pulque y aguamiel	39
Tabla 2. Características culturales y micromorfológicas de las especies de levaduras aisladas de pulque y aguamiel	40
Tabla 3. Características fisiológicas y bioquímicas de las levaduras aisladas del pulque y aguamiel	46
Tabla 4. Características fisiológicas y bioquímicas de las levaduras aisladas de pulque y aguamiel (continuación)	48
2.- FACTOR ZIMOCIDA.	
Tabla 5. Levaduras aisladas de pulque y aguamiel para ver actividad zimocida vs. levaduras sensibles de colección	50

Tabla 6. Levaduras zimocidas de colección vs. levaduras aisladas de pulque y aguamiel para ver su resistencia	52
Tabla 7 Pruebas cruzadas entre levaduras zimocidas de colección	53
Tabla 8 <i>Candida valida</i> PIB contra <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 1006	54
Tabla 9 <i>Candida valida</i> PIB contra <i>Candida glabrata</i> Y55	55
Tabla 10 <i>Candida valida</i> PIB contra <i>Saccharomyces cerevisiae</i> raza <i>chevalieri</i> P6A	56
3.- RESISTENCIA ALCOHÓLICA.	
Tabla 11. Tolerancia a diversas concentraciones de etanol de levaduras aisladas de pulque y aguamiel	57
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	58
CONCLUSIONES	63
BIBLIOGRAFÍA CITADA	65

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS CON FACTOR ZIMOCIDA DEL PULQUE Y AGUAMIEL

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas a los que se han enfrentado las industrias de fermentaciones industriales, particularmente las que utilizan *Saccharomyces cerevisiae* como inóculo para producir bebidas alcohólicas; es la contaminación con levaduras silvestres. Estas, perjudican al producto al producir sabores y aromas desagradables; además de que disminuyen la producción de alcohol inhibiendo el crecimiento del inóculo. Se han realizado numerosas investigaciones al respecto y se ha encontrado que algunas de estas levaduras silvestres poseen el factor "ZIMOCIDA", mejor conocido como "KILLER", que es el responsable de la inhibición del inóculo inicial (Young, 1987). El término ZIMOCIDA se da a las levaduras que son capaces de secretar una toxina, de naturaleza proteica o glucoproteica, letal para otras levaduras sensibles, pero que son inmunes a su propia toxina (Farris *et al.*, 1991 y Young, 1987).

Actualmente, para la industria de las fermentaciones alcohólicas, es de gran interés encontrar cepas de levaduras fermentadoras activas con factor "zimocida", por lo que en este trabajo se busca aislar e identificar levaduras del pulque y aguamiel, con el objeto de: 1) conocer mejor la microbiota presente en ambos sustratos, y así mismo 2) determinar si poseen el factor "zimocida", realizando pruebas cruzadas con cepas sensibles de colección; 3) determinar la resistencia de las levaduras aisladas del pulque y aguamiel al realizar pruebas cruzadas con levaduras zimocidas de colección.

Para realizar el presente estudio se escogieron el pulque y el aguamiel debido a las características que ambos sustratos presentan. El aguamiel tiene altas concentraciones de azúcares, por lo que las levaduras

presentes en el, resisten una alta presión osmótica. A partir de esta savia azucarada se obtiene el pulque por un proceso de fermentación láctica-alcohólica, por lo que las levaduras que persisten en el pulque pueden ser fermentadoras y deben de tolerar una cierta concentración de alcohol; aproximadamente de un 6 a un 9% que es el grado alcohólico del pulque.

Tomando en cuenta estas razones, en la presente investigación se tratará de encontrar una levadura que posea el factor "zimocida"; que sea fermentadora, y resista cierta concentración de alcohol. Además en caso de encontrar levaduras zimocidas, se determinará en que concentración de levadura zimocida, ésta inhibe el crecimiento de una levadura sensible de colección. Entre las limitaciones que se encuentran para poder observar este comportamiento está el de poder identificar a dos cepas de levaduras cuando se ponen a crecer en un mismo medio. Por esta razón se tendrán que escoger dos levaduras que puedan ser fácilmente distinguidas, la una de la otra, por su diferente morfología colonial.

El encontrar una levadura con todas las características antes mencionadas sería de gran utilidad para diversos procesos fermentativos a nivel industrial, ya que aseguraría el predominio de la levadura zimocida fermentadora utilizada como inóculo, evitaría o disminuiría el riesgo de contaminación por levaduras silvestres, aseguraría un buen rendimiento de alcohol, y la persistencia del inóculo al aumentar la concentración de dicho producto.

ANTECEDENTES

LEVADURAS

En general cuando se habla de levaduras, inmediatamente se piensa en una fermentación; ya que ambos términos siempre se han asociado, y aunque las levaduras han sido utilizadas de siempre, no se tenía un buen conocimiento de la naturaleza de estos organismos. El origen de la palabra levadura en diferentes idiomas proviene ya sea del latín "levere" que significa levantar o crecer; y del griego "zestos" que significa hirviendo, ambos haciendo referencia a la producción de CO₂ durante una fermentación, la cual provoca en una fermentación líquida la formación de espuma y en una sólida, como el pan, el crecimiento de la masa (Phaff *et al.*, 1978).

La fermentación de jugos de frutas para la obtención de diferentes bebidas alcohólicas, así como la elaboración del pan, constituyen de los dos primeros procesos en los que se emplean levaduras. Ambas son prácticas muy antiguas, que se remontan muchos años a.C., por evidencias arqueológicas en tumbas egipcias y en Mesopotamia, se sabe que fueron establecidas hace 4000 años, (Phaff *et al.*, 1978). Aparentemente todas las civilizaciones antiguas utilizaban los productos de fermentación tanto como hoy en día.

El origen del concepto "levadura" debe considerarse a partir de las observaciones microscópicas de van Leeuwenhoek en 1680 de una gota de cerveza, donde el encontró cuerpos globulares. Hacia 1876 Pasteur postuló, que el proceso de fermentación por organismos vivos (bacterias y levaduras) bajo condiciones anaeróbicas, constituía un sustituto del proceso de respiración, y que la aireación reprimía la fermentación. Propuso que si se introducían levaduras en una solución con azúcar, éstas utilizarían el azúcar como alimento y secretarían metabolitos no utilizables como alcohol y CO₂. La fermentación alcohólica fue considerada como el proceso vital de producción de energía de las levaduras que viven en ausencia de oxígeno en anaerobiosis (Phaff *et al.*, 1978).

IDENTIFICACIÓN.

Las levaduras son hongos unicelulares que se reproducen por gemación ó fisión. Es un grupo taxonomicamente diverso que incluye levaduras perfectas, que presentan una fase sexual, y que son clasificadas en las subdivisiones: Ascomycotina y Basidiomycotina; y levaduras imperfectas cuya fase sexual se desconoce y que se clasifican en la subdivisión: Deuteromycotina. Todas las subdivisiones mencionadas se incluyen en la división Eumycota del reino Fungi.

A continuación se presenta la clasificación de las levaduras señalando las características distintivas de las subdivisiones, de las familias y subfamilias, enlistando los géneros incluidos en cada subfamilia:

I.- Subdivisión Ascomycotina. La habilidad para formar esporas sexuales es el primer criterio a tomar en cuenta en ésta subdivisión. Las esporas sexuales producidas por las levaduras ascoporogenas muestran una diferencia significativa en tamaño, forma y otras características morfológicas que son importantes para la identificación de este grupo de levaduras de esporas (Reed y Nagodawithana, 1991).

Clase: Hemiascomycetes

Orden: Endomycetales

A) Familia: Spermophthoraceae. Haploide, hifas no septadas; se pueden formar esporangiosporas las cuales pueden formar un micelio diploide. Este micelio es generalmente uninuclear y puede formar ascas con 8 a 12 ascosporas en forma de aguja (Kreger, 1984).

-Géneros: *Coceldiascus, Metschnikowia, Nematosora*

B) Familia: Saccharomycetaceae. Puede presentar micelio o pseudomicelio, artrosporas. Reproducción vegetativa por fisión o por gemación. Se pueden formar ascas después de una conjugación heterogámica o isogámica; a menudo el estado de reproducción vegetativa se da entre la diploidización y la formación de ascas. Ascosporas de varias formas pero no en forma de aguja (Kreger, 1984).

1. **Subfamilia:** Schizosaccharomycetoideae. Formación de micelio y/o artrosporas, reproducción vegetativa por fisión; formación de ascas después de la conjugación; ascosporas esféricas, ovoides ó reniformes (Kreger, 1984).

-**Género:** *Schizosaccharomyces*

2. **Subfamilia:** Nadsonioideae. Células en gemación y ocasionalmente pseudomicelio; reproducción vegetativa por gemación bipolar (Kreger, 1984).

-**Géneros:** *Hanseniaspora*, *Nadsonia*, *Saccharomycodes*, *Wickerhamia*

3. **Subfamilia:** Lipomycetoideae. Reproducción vegetativa por gemación multilateral. Ascas desarrolladas de una célula madre como protuberancia o después de la conjugación de dos células; ascosporas esféricas-ovoides. (Kreger, 1984).

-**Género:** *Lipomyces*

4. **Subfamilia:** Saccharomycetoideae. Pueden presentar micelio ó pseudomicelio, y/o células en gemación solas. Reproducción vgetativa por fisión ó gemación, ascosporas de diferentes formas (Kreger, 1984).

-**Géneros:** *Ambrosiozyma*, *Arthroascus*, *Citeromyces*, *Clavispora*, *Cyniclomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Guillermondella*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Lodderomyces*, *Pachysolen*, *Pachytichospora*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Schwanniomyces*, *Sporopachydermia*, *Stephanoascus*, *Torulaspora*, *Wickerhamiella*, *Wingea*, *Yarrowia Zygosaccharomyces*.

II.- Subdivisión Basidiomycotina. Estas levaduras son formadas como resultado de la germinación de las basidiosporas.

Orden: Ustilaginales

A) Familia: Filobasidiaceae. Formación de basidios delgados no septados sosteniendo una pared delgada de basidiosporas terminales, no produce teliosporas. Presencia de blastosporas.

Géneros: *Chionosphaera*, *Filobasidella*, *Filobasidium*

B) Levaduras formadoras de teliosporas. Se caracteriza por la presencia de esporas de pared gruesa (teliosporas), teliosporas contenedoras de lípidos de varias formas en su hifa.

Géneros: *Leucosporidium*, *Rhodospordium*, *Sporidiobolus*

Orden: Tremelales

C) Familia: Sirobasidiaceae

Géneros: *Fibulobasidium*, *Sirobasidium*

D) Familia: Tremallaceae

Géneros: *Holtermannia*, *Tremella*

III.- Subdivisión Deuteromycotina (Fungi imperfecti). Las levaduras imperfectas o anamorfias carecen de estados sexuales de reproducción como los que forman ascas. Esta subdivisión esta relacionada con levaduras ascomycetos y basidiomycetos con respecto a la estructura de la pared celular, su composición y reacciones de color (Reed y Nagodawithana, 1991).

Clase: Blastomycetes

A) Familia: Cryptococcaceae. Levaduras en gemación siempre presentes; en ocasiones forman pseudomicelio, micelio y artrosporas. Células rojas, anaranjadas o amarillas debido a los pigmentos carotenoides, rara vez son cafés o negras (Kreger, 1984).

-Presentan fase sexual dentro de los ascomycetos o basidiomycetos

Géneros: *Candida*, *Trichosporon*

-Fase sexual en ascomycetos.

Géneros: *Aciculoconidium*, *Brettanomyces*, *Eeniella*, *Kloeckera*, *Oosporidium*, *Schizoblastosporion*, *Sympodiomyces*, *Trigonopsis*.

-Fase sexual en basidiomycetos.

Géneros: *Cryptococcus*, *Fellomyces*, *Malassezia*, *Phuffia*, *Rhodotorula*, *Sterigmatomyces*.

B) Familia: Sporobolomicetaceae. Se caracteriza por la formación de balistosporas. (Reed y Nagodawithana, 1991).

Levaduras Basidiomycetos. Género: *Bullera*, *Sporobolomyces*.

Levaduras Ascomycetos: Ninguna.

FACTOR ZIMOCIDA

El término ZIMOCIDA se les da a las levaduras que son capaces de secretar una toxina, de naturaleza proteica o glucoproteica, a la cual ellas son inmunes, pero que, para las levaduras sensibles de su especie y de especies de otros géneros es letal (Michalcáková *et al.*, 1991). El efecto letal del factor zimocida se debe a que altera la integridad de la membrana celular; o a que inhibe el transporte activo de los aminoácidos en las levaduras (Reed y Nagodawithana, 1991).

Las levaduras zimocidas fueron descubiertas por primera vez por Bevan y Makower en 1963, en *Saccharomyces cerevisiae*, quienes observaron que algunas cepas de esta especie mataban a otras levaduras (Petering *et al.*, 1991). Desde entonces ha habido un gran interés por estudiar a las levaduras con el factor zimocida, y han sido aisladas como contaminantes en diversos procesos de fermentaciones industriales. Se han encontrado especies zimocidas silvestres en fermentaciones continuas comerciales para la producción de cerveza; mismas que ocasionaban la muerte de la levadura fermentadora empleada como inóculo y además producía sabores indeseables en el producto. También han sido aisladas en procesos fermentativos para la producción de sake y de levadura para panificación (Rosini, 1989). A la fecha dicho factor ha sido encontrado en varios géneros como *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia* y *Saccharomyces* (Young, 1987).

El fenómeno zimocida juega un papel ecológico muy importante en las comunidades naturales de levaduras (Michalcáková *et al.*, 1991). En una comunidad natural de levaduras, las levaduras zimocidas pueden inhibir el crecimiento de otras levaduras sensibles por lo que las primeras tienen ventajas de predominio y subsistencia; alterando por lo tanto la ecología debido a la pérdida de algunas cepas sensibles. En levaduras aisladas de comunidades naturales como frutas, plantas y suelos se ha encontrado una alta incidencia de cepas zimocidas (17%), en comparación a su baja incidencia (7%) en cepas de la colección nacional de

levaduras de Inglaterra (NCYC= National Collection of Yeast Cultures). Las levaduras silvestres aisladas como contaminantes en procesos de producción de cerveza mostraron poseer características zimocidas, en un 18% frente a levaduras fermentadoras sensibles (Young, 1987). Debido a estas características los sistemas zimocidas pueden ser explotados en las fermentaciones comerciales como protección para las levaduras empleadas como inóculo, controlando las contaminaciones por levaduras silvestres (Michalcáková *et al.*, 1991).

DISTRIBUCIÓN DE LEVADURAS ZIMOCIDAS

La actividad zimocida se ha encontrado en levaduras aisladas de viñedos y de procesos de elaboración de vino en varias regiones del mundo, incluyendo Europa, la antigua URSS, Sudáfrica y Australia (Petering *et al.*, 1991). Estas levaduras pertenecen principalmente a los géneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Cryptococcus* y *Ustilago* (Pasqual *et al.*, 1990). Algunos investigadores como Kitano y colaboradores (1984) han detectado levaduras zimocidas en un 27% de las levaduras de mostos japoneses y en el mismo porcentaje Starmer (1987) encontró levaduras zimocidas en racimos en putrefacción; en Francia la incidencia de levaduras zimocidas en la flora nativa enológica varía dependiendo la región habiendo lugares con un 0% de levaduras zimocidas y lugares con 80-100%. También en la flora nativa Uruguay se han encontrado levaduras zimocidas en producción de vinos donde se utilizan uvas Chardonnay y Pinot (Pasqual *et al.*, 1990).

I- Clasificación de levaduras respecto al factor zimocida.

De acuerdo con la respuesta que presentan las levaduras frente a una cepa con factor zimocida se les ha clasificado en tres categorías:

a) Zimocida (K+R+).- Levaduras que producen una toxina extracelular que mata a otras levaduras llamadas sensibles, pero son inmunes a la acción de su propia toxina.

b) Neutral (K-R+).- Levaduras que no producen una toxina zimocida pero son inmunes a la acción de éstas.

c) Sensible (K-R-).- Levaduras que no producen una toxina zimocida y tampoco resisten la actividad zimocida de otra levadura (Carrau *et al.*, 1993; Salek *et al.*, 1990).

CLASIFICACIÓN DE LEVADURAS ZIMOCIDAS

Levadura "Zimocida"	Tipo de Toxina	Actúa contra: (colección, número)
<i>Saccharomyces uvarum</i> NCYC 190 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> A8209B NCYC 232, NCYC 235 Híbridos de <i>Saccharomyces</i> NCYC 631, NCYC 663 (Young, 1987).	K1	NCYC 738-K2, NCYC 1001-K2, NCYC 713-K2, NCYC 761-K3, NCYC 388-K4, ATCC 15126-K11 (°)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 38976 (Kitamoto <i>et al.</i> , 1993).	K1	IFO 2018 (°)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 232 (Palpacelli <i>et al.</i> , 1991).	K1	DBVPG 3299,3450, 3964, 3999. (°)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> M437, NCYC 738, NCYC 1001 <i>Saccharomyces diastaticus</i> NCYC 713 (Young, 1987).	K2	NCYC 190-K1, NCYC 235-K1, NCYC 663-K1, NCYC 232-K1, NCYC 631-K1, A8209B-K1, NCYC 388-K4, ATCC15126-K11. (°)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 738 (Palpacelli <i>et al.</i> , 1991).	K2	DBVPG 3299,3450, 3964, 3999. (°)
<i>Saccharomyces capensis</i> NCYC 761 (Young, 1987).	K3	NCYC 235-K1, NCYC 663-K1, NCYC 232-K1, NCYC 631-K1, A8209B-K1, NCYC 388-K4. (°)
<i>Torulopsis glabrata</i> NCYC 388 (Young, 1987).	K4	NCYC 232-K1, NCYC 631-K1, A8209B-K1 (°)
<i>Debaryomyces vanriji</i> NCYC 577 <i>Hansenula anomala</i> NCYC 434 <i>Hansenula subpelliculosa</i> NCYC 16 (Young, 1987).	K5	NCYC 232-K1, NCYC 631-K1, A8209B-K1, NCYC 761-K3, NCYC 388-K4. (°)

<i>Kluyveromyces fragilis</i> NCYC 587 (Young, 1987).	K 6	NCYC 235-K1, NCYC 663-K1, NCYC 232-K1, NCYC 631-K1, A8209B-K1, NCYC 738-K2, NCYC 1001-K2, NCYC 713-K2, NCYC 761-K3, NCYC 388-K4. (°)
<i>Candida valida</i> NCYC 327 <i>Pichia membranaefaciens</i> NCYC 333 (Young, 1987).	K 7	NCYC 232-K1, NCYC 631-K1, A8209B-K1, NCYC 738-K2, NCYC 1001-K2, NCYC 713-K2, NCYC 761-K3, NCYC 388-K4, NCYC 587-K6. (°)
<i>Hansenula anomala</i> NCYC 435 (Young, 1987).	K 8	NCYC 232-K1, NCYC 631-K1, A8209B-K1, NCYC 738-K2, NCYC 1001-K2, NCYC 713-K2, NCYC 761-K3, NCYC 388-K4, NCYC 587-K6. (°)
<i>Hansenula mrakii</i> NCYC 500 (Young, 1987).	K 9	NCYC 190-K1, NCYC 235-K1, NCYC 663-K1, NCYC 232-K1, NCYC 631-K1, A8209B-K1, NCYC 738-K2, NCYC 1001-K2, NCYC 713-K2, NCYC 761-K3, NCYC 388-K4, NCYC 16-K5, NCYC 434-K5, NCYC 435-K8. (°)
<i>Hansenula mrakii</i> IFO 0897 (NCYC 500) (Kitamoto <i>et al.</i> , 1993).	K 9	IFO 0011, NFRI 4033, NFRI 4085, IFO 0121, NFRI 3706, IFO 0146, IFO 0963, NFRI 3708, IFO 0304, IFO 2018, B511-4C. (°)

<i>Kluyveromyces drosophilorum</i> NCYC 575 (Young, 1987).	K 10	NCYC 190-K1, NCYC 235-K1, NCYC 663-K1, NCYC 232-K1, NCYC 631-K1, A8209B-K1, NCYC 738-K2, NCYC 1001-K2, NCYC 713-K2, NCYC 761-K3, NCYC 388-K4, NCYC 587-K6, NCYC 16-K5, NCYC 434-K5, NCYC 435-K8, NCYC 327-K7, NCYC 333-K7, NCYC 577-K5 (°)
<i>Kluyveromyces drosophilorum</i> NCYC 575 (Kitamoto <i>et al.</i> , 1993).	K10	NFRI 4033, IFO 0121, NFRI 3706, IFO 0963, NFRI 3708, IFO 2018. (°)
<i>Torulopsis glabrata</i> ATCC 15126 (Young, 1987).	K 11	NCYC 232-K1, NCYC 631-K1, A8209B-K1, NCYC 738-K2, NCYC 1001-K2, NCYC 713-K2. (°)
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i> IFO 1778 (Kono y Himeno, 1992).	*	YAT 679-K1, 761-K3, 388-K4, 500-K9 y con NaCl 738-K2, 327-K7, 15126-K11 (°)
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i> IFO 1778 <i>Kluyveromyces vanudenii</i> IFO 1673 <i>Kluyveromyces lactis</i> IFO 1267 <i>Kluyveromyces phaffii</i> IFO 1672 (Kono y Himeno, 1992).	*	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> H (en presencia de NaCl)
<i>Kluyveromyces waltii</i> IFO 1666 <i>Kluyveromyces thermotolerans</i> 1779 (Kono y Himeno, 1992).	*	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> H (sin NaCl).

<i>Hansenula anomala</i> NCYC 434 <i>Kluyveromyces fragilis</i> NCYC 587 <i>Hansenula anomala</i> NCYC 435 <i>Kluyveromyces drosophilurum</i> NCYC 575 (Kono y Himeno, 1992).	K5 K6 K8 K10	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i> IFO 1778.
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (Farris et al., 1991).	*	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 1006
<i>Kluyveromyces phaffii</i> UCD 70-5	*	IMAT1600,1616,1619,1657,1662. DBVPG 3078,3399,3402,4114,4193. DBVPG 4211 DBVPG 3299,3450,3964, 3999. (°)
<i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2359	*	DBVPG 3078,3399,3402,4114,4193. DBVPG 4211. DBVPG 3299. (°)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DBVPG 2168 (Palpacelli et al., 1991).	*	DBVPG 3299,3450,3964, 3999 (°)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DBVPG 2190 (Palpacelli et al., 1991).	*	DBVPG 3299, 3450, 3964,3999,3966 (°)
<i>Kluyveromyces vanudenii</i> UCD 70-4 (Palpacelli et al., 1991).	*	DBVPG 3078,3399,3402,4114,4193. DBVPG 3299 (°)
<i>Hansenula anomala</i> IMAT 2882 (Palpacelli et al., 1991).	*	DBVPG 3078,3399,3402,4114,4193. DBVPG 3299 (°)
<i>Hansenula mrakii</i> NCYC 500 (Palpacelli et al., 1991)	*	DBVPG 3299 (°)
<i>Candida rugosa</i> (Marquina et al., 1992).	*	<i>Debaryomyces hansentii</i> IGC 2756, <i>Pichia anomala</i> IGC 2505, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IGC 4565
<i>Candida tenuis</i> (Marquina et al., 1992).	*	<i>Candida boidinii</i> IGC 3431

<i>Candida valida</i> (Marquina <i>et al.</i> , 1992)	*	<i>Kluyveromyces marxianus</i> IGC 4318. <i>Pichia anomala</i> IGC 4121, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IGC 4620.
<i>Debaryomyces hansenii</i> (Marquina <i>et al.</i> , 1992).	*	<i>Candida boidinii</i> IGC 3430, <i>Debaryomyces hansenii</i> IGC 2781
<i>Kluyveromyces lactis</i> (Marquina <i>et al.</i> , 1992).	*	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IGC 4456, 4565
<i>Pichia anomala</i> (Marquina <i>et al.</i> , 1992)	*	<i>Candida boidinii</i> IGC 3430, 3431, <i>Candida valida</i> IGC 3315, <i>Debaryomyces hansenii</i> IGC 2781, <i>Kluyveromyces marxianus</i> IGC 4318 <i>Pichia membranaefaciens</i> IGC 4619, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IGC 4456, 4565, 4612, 4620
<i>Pichia membranaefaciens</i> (Marquina <i>et al.</i> , 1992)	*	<i>Candida boidinii</i> IGC 3431, <i>Kluyveromyces marxianus</i> IGC 4318, <i>Pichia anomala</i> IGC 2505, <i>Pichia membranaefaciens</i> IGC 4619, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IGC 4456, 4565, 4620
<i>Pichia pseudocactophila</i> (Marquina <i>et al.</i> , 1992)	*	<i>Pichia anomala</i> IGC 4121, <i>Pichia membranaefaciens</i> IGC 4619

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Michalcáková <i>et al.</i> , 1991). (a)	*	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S6/1(MAT a, K-R-)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> No. 28 (Radler y Schmitt, 1987). (b)	KT28	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> No.381 (c)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 11A (AWRI 92F) y 3AM(AWRI 796) (Petering <i>et al.</i> , 1991).	K2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5A (AWRI 138)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> T158C (α , his 4C-864) (Cansado <i>et al.</i> , 1992) (d)	Superkiller	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S6/1(α) (e)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Itati K+ (Bortol <i>et al.</i> , 1986). (f)		No especificado.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W3 (Goto <i>et al.</i> , 1992). (g)	KHR	<i>Candida glabrata</i> IFO 0622
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Torulaspota delbruekii</i> <i>Kloeckera apiculata</i> <i>Pichia membranaefaciens</i> <i>Zygosaccharomyces bailii</i> <i>Candida Krusei</i> <i>Candida stellata</i> (Goto <i>et al.</i> , 1992).(g)	KHS	<i>Candida glabrata</i> IFO 0622
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KU1 (Carrau <i>et al.</i> , 1993) (h)	K2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Montrachet 522 (i)
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (Radler <i>et al.</i> , 1993)	KT412	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC1006 <i>Candida glabrata</i> K4, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> K1, <i>Kluyveromyces marxianus</i> K6, <i>Hanseniospora uvarum</i> 470, <i>Candida krusei</i> 15.

(^o) Levaduras de colección:

Saccharomyces cerevisiae.- NCYC 738, NCYC 1001, NCYC 235, NCYC 232, A8209B, IFO 0304, IFO 2018, B511-4C, YAT 679.

Saccharomyces diastaticus.-NCYC 713.

Saccharomyces capensis.-NCYC 761.

Híbridos de *Saccharomyces*.-NCYC 663, NCYC 631.

Torulopsis glabrata.-NCYC 388, ATCC 15126.

Saccharomyces uvarum.- NCYC 190.

Kluyveromyces fragilis.-NCYC 587.

Hansenula subpelliculosa.-NCYC 16.

Hansenula anomala.- NCYC 434, NCYC 435, IFO 0121, NFRI 3706, IFO 0146, IFO 0963, NFRI 3708.

Candida valida.-NCYC 327.

Pichia membranaefaciens.-NCYC 333.

Debaryomyces vanriji.-NCYC 577.

Candida Krusei.- IFO 0011 NFRI 4033, NFRI 4085.

Kloeckera apiculata.- IMAT 1600, 1616, 1619, 1657, 1662.

Saccharomycodes ludwigii.-DBVPG 3078, 3399, 3402, 4114, 4193.

Schyzosaccharomyces japonicus.-DBVPG 4211.

Zygosaccharomyces rouxii.-DBVPG 3299, 3450, 3964, 3999, 3966.

(a) seis levaduras del género *Saccharomyces*, que se obtuvieron de la colección de levaduras de vino del instituto de investigación de Viticultura y Enología de Bratislava, Checoslovaquia.

(b) aislada por el Dr. I. Benda, Würzburg

(c) De Wissenschaftliche Station für Brauerei, München (original No. 67)

(d) Aislada por G. Fink, Cornell University, Ithaca, USA.

(e) Derivada de la cepa S6 de E:A: Bevan, Queen Mary College, London, UK.

(f) Cepa aislada de un viñedo no especificado donde.

(g) Cepas de la colección del Instituto de Enología y Viticultura de la Universidad de Yamanashi, Osaka, Japon.

(h) Cepa del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay.

(i) Cepa de la Universidad de California.

NCYC National Collection of Yeast Cultures (Norwich, Inglaterra)

IFO Institute for Fermentation, (Osaka, Japón)

ATCC American Type Culture Collection

NFRI National Food Research Institute (Tsukuba, Ibaraki, Japón)

IMAT Istituto Microbiologia Agraria e Tecnica (Perugia, Italia)

DBVPG Dipartimento di Biologia Vegetale (Perugia, Italia)

UCD University of California, Davis, U.S.A.

CBS Centraalbureau voor Schimmelcultures, Yeast Division.

AWRI Australian Wine Research Institute.

II- Tipos de toxinas y actividad zimocida.

Dentro de la categoría de levaduras zimocidas se han identificado diferentes tipos de actividad y diferentes tipos de resistencia, es decir; existen levaduras zimocidas que son sensibles a algunas toxinas, pero son resistentes a otras. Se han distinguido 11 diferentes tipos de actividad zimocida, que probablemente representan 11 toxinas bioquímicamente diferentes a las cuales se les conoce como K1 a K11 y diferentes espectros de resistencia (Young, 1987). Especies del mismo grupo zimocida, por ejemplo las que presentan el factor K1, resisten su propia toxina pero muestran diferente resistencia a las distintas toxinas (K2-K11, Young, 1987). Cada levadura zimocida tiene un sistema inmune específico para su propia toxina (Cansado *et al.*, 1992).

-Modo de acción de la toxina K1.

El efecto letal de esta toxina contra levaduras sensibles se debe a un cambio en la integridad de la membrana celular (Reed y Nagodawithana, 1991). El modo de acción de la toxina K1 de *Saccharomyces cerevisiae* ha sido explicado por la secuencia de dos reacciones.

Inicialmente la toxina K1 es adsorbida en los receptores de la pared celular, que contiene 1,6- β -glucano como su componente esencial. Posteriormente en una segunda fase, que requiere de energía, la toxina interacciona con la membrana celular, destruyéndola formando canales o poros lo que provoca la liberación de iones K⁺, y más tarde también moléculas de más alto peso molecular como ATP y otros metabolitos, produciendo un desequilibrio en el potencial electroquímico, un gran gasto de energía, la destrucción del gradiente de pH, por lo que causa la muerte de la célula (Radler y Schmitt, 1987; Kurzweilová y Sigler, 1993).

Desde que se descubrió la propiedad zimocida se han realizado más investigaciones con el fin de determinar: 1) cual es su difusión en la

naturaleza, 2) cual es la naturaleza y las formas de acción del principio tóxico, 3) como es la herencia del carácter zimocida, y 4) cuales son las condiciones óptimas para la producción y actividad de la toxina (Rosini, 1989). El estudio de las levaduras zimocidas se ha vuelto interesante ya que esta característica puede ser aprovechada en la industria de las fermentaciones. Sin embargo el uso comercial de las levaduras con el factor zimocida esta limitado por las condiciones requeridas para su actividad, ya que las toxinas se inactivan a ciertos valores de pH, por temperatura, por la actividad de enzimas proteolíticas (como papaina) y por la presencia de algunos agentes químicos (Rosini, 1989).

III. Biología del fenómeno zimocida.

Algunos estudios han apoyado y confirmado la complejidad y variabilidad de las características de las levaduras zimocidas. En 1986 Gunge propuso dividir a las levaduras zimocidas en cuatro grupos, de acuerdo con las bases genéticas que codifican el carácter zimocida, llamándolos: a) dsRNA plásmidos; b) dsDNA plásmidos; c) DNA cromosomal y d) determinantes no identificados. Debido a la alta especificidad de la propiedad zimocida se ha propuesto el uso del carácter zimocida para propósitos taxonómicos (Palpacelli *et al.*, 1991).

a) dsRNA plásmidos.

El análisis genético de la toxina KI de *Saccharomyces cerevisiae* indica que el factor es heredado de forma no-Mendeliana y por transferencia citoplasmática (Young, 1987). La producción de la toxina KI en *S. cerevisiae* así como su resistencia a la misma está codificada en un plásmido encapsulado, de doble hélice de ácido ribonucleico denominado MdsRNA (ds.-double stranded, Michalcáková *et al.*, 1991). La cápsula del plásmido corresponde a la de una partícula viral residente en el citoplasma. En análisis de extractos de células de levaduras zimocidas se han encontrado dos tipos de plásmidos de ds-RNA denominado Lds RNA (L.-larger=largo) a los de mayor peso molecular y MdsRNA (smaller=pequeño) a los de menor peso (Young, 1987).

Las especies de *Saccharomyces cerevisiae* con las toxinas K1, K2 y K3 contienen tanto el MdsRNA como el LdsRNA (Young, 1987). Existen varios tamaños de MdsRNA: M1=1.9 kb, M2=1.7 kb, M3=1.5 kb los cuales corresponden respectivamente a K1, K2 y K3 ; mientras que para los LdsRNA el tamaño es muy similar mas no idéntico también para K1, K2 y K3, aproximadamente 4.7 kb (Michalcáková *et al.*, 1991; Huan *et al.*, 1991).

Se ha encontrado que la función del MdsRNA es codificar tanto a la toxina así como al factor inmune para protegerse de ella (Carrau *et al.*, 1993; Cansado *et al.*, 1992). El LdsRNA codifica para la producción de la cápsula de proteína que envuelve la molécula de MdsRNA formando así la partícula viral (Salek *et al.*, 1990; Cansado *et al.*, 1992). Una de las primeras evidencias de que el factor zimocida está determinado por el MdsRNA es que en observaciones de cepas no zimocidas no existe MdsRNA; además levaduras zimocidas que han sido incubadas a altas temperaturas para perder su actividad zimocida o que han sido tratadas con cicloheximida, han perdido la molécula de MdsRNA y han retenido al LdsRNA; otra evidencia es que levaduras no-zimocidas de género *Saccharomyces* solo presentan la molécula de LdsRNA (Young, 1987). Para la expresión del carácter zimocida es necesaria la presencia tanto de la molécula de MdsRNA como de la LdsRNA; no se han encontrado cepas zimocidas que contengan únicamente la MdsRNA, y se ha determinado que es necesaria la presencia de LdsRNA para sintetizar la cápsula y retener la molécula de MdsRNA (Salek *et al.*, 1990).

Cada fenotipo zimocida (K1, K2, K3, etc.) tiene un sistema específico toxina-inmunidad. Se han observado en cepas "neutrales" aisladas de sustratos naturales mutantes de M1dsRNA, por lo que es probable que esas cepas tengan un defecto en el gene que codifica la toxina, pero no en las regiones de dsRNA responsables de la inmunidad. En 1983 Bussey reporta que se ha encontrado un grupo de mutantes neutrales derivados de la cepa zimocida K1 los cuales secretan una toxina no-activa aparentemente del mismo tamaño que el de la toxina zimocida K1 (Cansado *et al.*, 1992).

b) dsDNA plásmidos.

En *Kluyveromyces lactis* la actividad zimocida está dada por la presencia de dos plásmidos lineales de doble hélice de DNA (dsDNA) a los que se les denomina pGKL1 y pGKL2 de 8.9 kb y 13.4 kb respectivamente (Radler *et al.*, 1993; Stark *et al.*, 1990). La toxina producida por *Kluyveromyces lactis* es una glucoproteína de aproximadamente 157 kilodaltons que consiste en tres subunidades con masas moleculares de 99, 31 y 27 kilodaltons y es codificada por el más pequeño de los plásmidos lineales de DNA que es el pGKL1 (Wilson y Whittaker, 1989). Esta toxina tiene la propiedad de matar a cepas de *Saccharomyces cerevisiae* incluyendo también a otras cepas zimocidas (Young, 1987). Análisis genéticos muestran que el carácter zimocida es heredado en forma no mendeliana (Young, 1987). La toxina de *Kluyveromyces lactis* que es codificada por el plásmido lineal PGKL1 representa un sistema zimocida poco diferente a los sistemas que son codificados por plásmidos de dsRNA (Stark *et al.*, 1990). La toxina de *Kluyveromyces lactis* no sólo actúa contra cepas sensibles del género de *Kluyveromyces* (como *K. thermotolerans*, *K. vanudenii*) sino que también inhibe el crecimiento de *S. cerevisiae*, *S. italicus*, *S. rouxii*, *Candida glabrata*, *C. utilis* y *C. intermedia*. La producción de la toxina está asociada con el crecimiento y alcanza los niveles más altos en la fase exponencial. La inmunidad de la cepa productora a la toxina está dada por el plásmido PGKL1 ya que se ha visto que cepas que no poseen PGKL1 y contienen PGKL2 no son inmunes a la toxina de *K. lactis* (Stark *et al.*, 1990). Un ejemplo de cepa con estas características es la *Kluyveromyces lactis* IFO 1267.

c) DNA cromosomal.

Algunos investigadores como Woods en 1974, Naumov y Naumova en 1978 han reportado que algunas cepas de *S. cerevisiae*, heredan el carácter zimocida en forma Mendeliana; en estos casos la información para la producción de la toxina zimocida es codificada en el genoma nuclear de la levadura (Young 1987).

d) Determinantes no identificados.

A la fecha no existen evidencias que demuestren que el carácter zimocida de algunas cepas de *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula* o *Pichia* dependa de la presencia de plásmidos de dsRNA o dsDNA. Esto nos indica que las cepas de algunos géneros de levaduras no contienen cantidades detectables de plásmidos de dsRNA o DNA lo cual indica que el carácter zimocida en estas cepas es codificado probablemente por genes nucleares (Young, 1987).

IV. Condiciones óptimas para la actividad zimocida.

Se ha determinado que existen varios factores fisicoquímicos, que afectan la actividad de las toxinas zimocidas; lo que representa un problema para su uso comercial; ya que la actividad zimocida se puede inhibir por valores de pH altos o muy bajos; por temperatura, por la presencia de algunas enzimas proteolíticas y por la presencia de alcohol. Se ha visto que los valores óptimos de pH para la toxina K1 de *S. cerevisiae* están entre 4.2-4.8 y que temperaturas mayores a 25°C generalmente la inactivan en cultivos líquidos, mientras que los sustratos gelificados le confieren mayor estabilidad, logrando resistir hasta 42°C (Rosini, 1989). Así mismo altas concentraciones de alcohol pueden afectar la actividad zimocida. Para la toxina de *Kluyveromyces lactis* 161 (NRRL 1140R) se encontró que su pH óptimo es entre 4.8-5.4 y es estable tanto a una temperatura de 40°C como de 4°C por más de tres horas; a una temperatura de 50°C la toxina es inactivada en 20 minutos (Wilson y Whittaker, 1989). Se ha observado que la cepa *Zygosaccharomyces bailii* 412 es más estable a un pH de 3.0 con una temperatura de 4°C durante 24 horas; a un pH de 3.7 con una temperatura de 37°C por 3 horas se pierde más de la mitad de la actividad. También es inhibida en un 76-97% la actividad zimocida de la toxina de *Z. bailii* 412 por incubación con proteinasa K y proteasa tipo XIII (Sigma); otras enzimas proteolíticas como la pronasa E y la tripsina tienen un efecto menor ya que inhiben la toxina KT412 menos de 15% después de 48 horas (Radler *et al.*, 1993). La toxina K11 de *Candida glabrata* ATCC

15126 es estable a un rango de pH más amplio que va de 3.0-7.0. Las toxinas K3 y K4 son más termoestables que la K1 y K2 ya que ninguna es inactivada en una hora a 35°C (Young, 1987). El pH óptimo para la toxina K2 tiene un rango de 3.5-3.7 y para K3 3.5-4.0 (Michalcáková *et al.*, 1991). Del género *Metschnikowia* también se han encontrado levaduras zimocidas siendo su pH óptimo de 3.6-5.2 (Farris *et al.*, 1991). Las levaduras zimocidas fermentadoras que resisten ciertas concentraciones de alcohol, si pueden ser empleadas para proteger procesos comerciales de la contaminación de levaduras silvestres, que representan un peligro en los primeros días de la fermentación cuando aún la concentración de alcohol es baja.

APLICACIONES DE LAS LEVADURAS ZIMOCIDAS

En 1979, Young y Talbot demostraron que las toxinas zimocidas pueden proteger a la cerveza de los efectos de contaminación por levaduras silvestres. Observaron que preparaciones de toxinas K1, K2, K4, y K10 de levaduras zimocidas eran efectivas contra levaduras silvestres, siendo la toxina K10 la más efectiva (Young, 1987). Otra forma de utilizar a las levaduras zimocidas es aislando su toxina e incorporandola a cepas de levaduras comerciales utilizadas en fermentaciones, esto nos daría dos grandes ventajas; la primera es que las cepas industriales serían inmunes a la toxina adquirida, y además la producción de las toxina puede prevenir la proliferación de otras levaduras silvestres (Reed y Nagodawithana, 1991). Sin embargo la mezcla de los genomas de una levadura comercial y una levadura zimocida donadora puede ser indeseable, ya que se mezclan las características de ambas levaduras y no sólo el carácter zimocida; pero estos efectos se pueden minimizar repitiendo el intercambio (back-crossing). En 1979, Ouchi utilizó una levadura zimocida deficiente en su fusión nuclear como donadora del factor y la mezcló con una cepa haploide, derivada de una levadura utilizada para producir sake y eligió como cepas para sake las que contienen los elementos citoplásmicos de ambas levaduras (Young, 1987 y Bortol *et al.*, 1986). También se podría seleccionar una levadura zimocida y a la vez fermentadora, utilizarla como inóculo para suprimir el

crecimiento de levaduras silvestres indeseables durante una fermentación (Petering *et al.*, 1991); sin embargo, es importante tomar en cuenta, que una levadura zimocida requiere de ciertas condiciones para secretar su toxina.

En estudios realizados para probar la eficiencia de levaduras zimocidas en contra de cepas sensibles; para ver la expresión del carácter zimocida bajo condiciones de fermentación se han obtenido resultados contradictorios (Petering *et al.*, 1991). Se ha observado que la toxina zimocida K2 es común en levaduras de viñedos (hasta en un 22.4% en el moroeste de España) lo cual se ha confirmado en varias regiones (Carrau *et al.*, 1993; Cansado *et al.*, 1991), sin embargo si se utilizaran levaduras en una fermentación comercial, existe la limitante de que el factor zimocida no se exprese eficientemente en las condiciones de pH de una fermentación de vinos (Carrau *et al.*, 1993; Heard y Fleet, 1987). Algunas toxinas como la K2 tienen un pH óptimo de 3.5-3.7, mientras que el pH de los vinos oscila entre 3.1 y 3.9 lo cual indica que la toxina si puede ejercer su efecto letal bajo condiciones de fermentación, pero también hay toxinas como la K1 cuyo pH óptimo va de 4.2-4.9 la cual tal vez pueda ejercer su efecto letal bajo condiciones de fermentación aunque tengan condiciones en que el efecto sea más intenso (Pasqual *et al.*, 1990).

PULQUE.

El pulque del náhuatl poliuhqui, que significa podrido, descompuesto es una bebida alcohólica blanca y viscosa que se obtiene por la fermentación natural del aguamiel, que es la savia azucarada de varias especies de magueyes pulqueros (*Agave atrovirens*); su origen se remonta varios años antes de la era cristiana, y algunos historiadores consideran que fueron los antiguos otomíes los primeros en elaborarla (Lappe y Ulloa, 1993). Para los aztecas fue una bebida y un alimento divino, medicina y un intoxicante ritual relacionado con su cosmología. Con la caída del imperio azteca el pulque perdió su importancia dentro de los rituales religiosos y en la actualidad permanece como una bebida popular cuyos consumidores

son generalmente personas de escasos recursos económicos para los que el pulque tiene una gran importancia nutricional, ya que sirve como un complemento alimenticio por su contenido de vitaminas del complejo B, de ácido ascórbico y de aminoácidos (Lappe y Ulloa, 1993). También se le han asignado al pulque cualidades medicinales para tratar padecimientos del aparato digestivo (Lappe y Ulloa, 1993).

Los primeros estudios realizados en México sobre el pulque fueron de carácter histórico, social, étnico y médico; y fue hasta finales del siglo XIX que se iniciaron las investigaciones microbiológicas y químicas (Lappe y Ulloa, 1993). En 1864 Río de la Loza realizó la primera observación del pulque al microscopio, más tarde José Barragán describió las primeras levaduras aisladas del pulque a las que identificó como especies del género *Cryptococcus*. En 1892 Fernando Altamirano señaló que el aspecto opalino del pulque se debía a la presencia de una multitud de bacterias suspendidas (Lappe y Ulloa, 1993). A lo largo de los años se han ido identificando diferentes cepas del pulque, así Ruiz-Oronoz en 1953 describió como especies nuevas a: *Saccharomyces carbajalii*, *Pichia bararragani*, *Torulopsis hydromelitis*, *Torulopsis aquamellis* y *Rhodotorula incarnata* y las tres primeras fueron posteriormente reclasificadas por Sánchez Marroquín como: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranaefaciens*, y *Candida parapsilosis*, (Lappe et al., 1993) A partir de 1942 el grupo de Sánchez Marroquín realizó estudios sobre la microbiología del pulque reconociendo a las especies *Leuconostoc dextranicum* y *mesenteroides* como parte de la microbiota normal del pulque (Lappe y Ulloa, 1993). Los microorganismos que se consideran como esenciales en el proceso de fermentación son: *L. dextranicum* y *L. mesenteroides*, *Lactobacillus spp.* homolácticos y heterolácticos, *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae*. En 1989, Lappe y colaboradores determinaron como especies constantes del pulque a *S. cerevisiae*, *Pichia membranaefaciens*, y como nuevos registros a *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus*, *Pichia carsonii* y *Candida guilliermondi*. A la fecha se conoce una variada microbiota del pulque y se han determinado algunos microorganismos como esenciales para la elaboración de la bebida; sin embargo aún se desconoce si hay una sucesión

en la microbiota a lo largo del proceso de elaboración y fermentación (Lappe y Ulloa, 1993). También se desconoce si algunas de las cepas aisladas de esta bebida posea el factor zimocida y que por lo tanto pueda estar inhibiendo a otras especies durante el proceso fermentativo. Esto se desconocía debido a que nunca se habían realizados estudios en los que se identificara la presencia de levaduras zimocidas en estos sustratos.

OBJETIVOS

AISLAR LEVADURAS DE PULQUE Y AGUAMIEL, IDENTIFICARLAS Y DETERMINAR SU CAPACIDAD FERMENTADORA Y ZIMOCIDA.

- Aislar e identificar levaduras presentes en pulque y aguamiel, así como su capacidad fermentadora.
- Evaluar la capacidad zimocida, de resistencia y sensibilidad de las levaduras aisladas de ambos sustratos frente a levaduras sensibles y zimocidas de colección.
- Observar el comportamiento de levaduras de colección sensibles y resistentes frente a una levadura con factor zimocida aislada de pulque o aguamiel en proporciones en desventaja para la cepa zimocida.
- Medir la resistencia a diferentes concentraciones de alcohol de las diversas especies de levaduras aisladas de pulque y aguamiel.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

1.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN.

1.1- Obtención de muestras de pulque y aguamiel de diferentes expendios.

Las siete muestras de pulque y las dos de aguamiel se obtuvieron de diferentes establecimientos de la Ciudad de México siendo el origen de los mismos, Hidalgo y el Estado de México principalmente. Las muestras se guardaban en frascos de vidrio lavados.

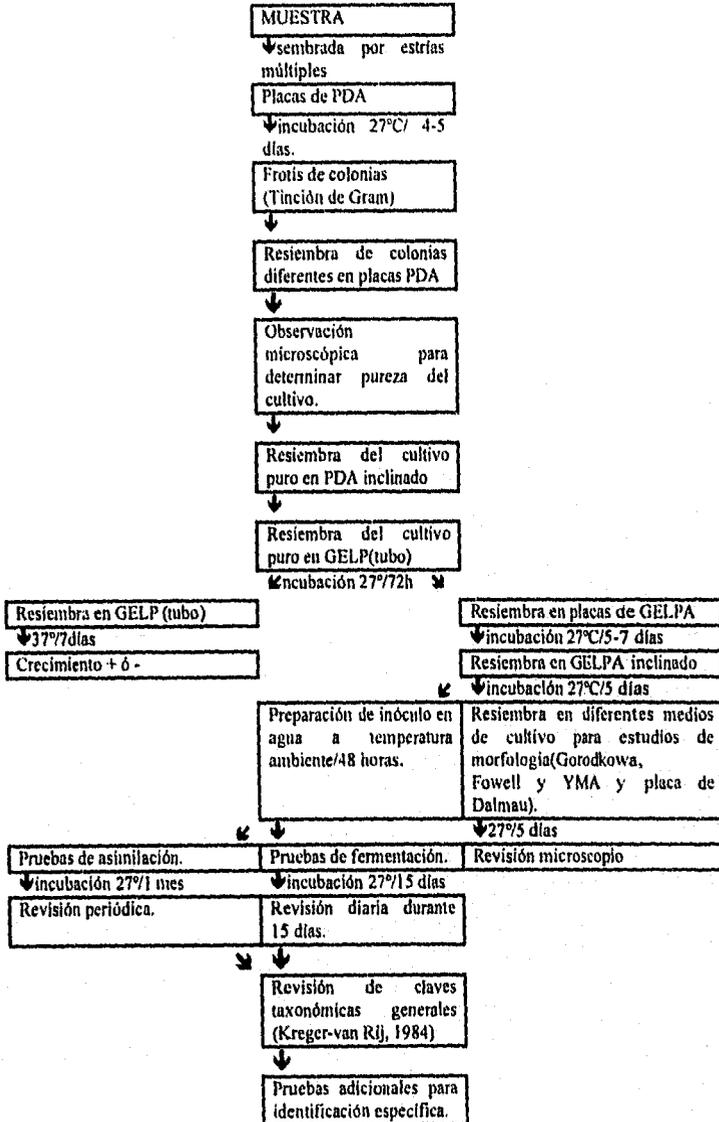
1.2.- Aislamiento y purificación de cepas de levaduras de pulque y aguamiel en medio de Agar Papa Dextrosa (PDA).

Para el aislamiento de las cepas se tomó directamente una asada de la muestra y se sembró por estrías múltiples en cinco cajas de Petri con medio agar papa dextrosa (PDA); posteriormente las cajas se incubaron a 27°C durante 4-5 días. De cada una de las colonias con morfología diferente se hicieron resiembras en placas del mismo medio de cultivo hasta la obtención de cultivos puros, los que se mantuvieron en medio de GELPA inclinado para su posterior identificación.

1.3.- Identificación de las cepas aisladas de pulque y aguamiel.

La identificación de levaduras se realizó en el laboratorio de micología del Instituto de Biología de la UNAM, siguiendo la metodología, las claves generales y específicas compiladas por Kreger-van Rij; 1984.

Diagrama 1
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS



1.3.1.-CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FISIOLÓGICAS CONSIDERADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS DEL PULQUE Y AGUAMIEL.

I Características morfológicas.

A. Macromorfología ó características culturales.

1. Crecimiento en medio líquido.

Medio de cultivo: GELP a 27°C/ durante 7 días.

2. Crecimiento en medio sólido (colonia gigante).

Medio de cultivo: GELPA a 27°C/ durante 30 días.

B. Micromorfología.

1. Características de las células vegetativas.

a) Morfología en medio sólido y líquido.

Medio de cultivo: GELP, GELPA, YMA.

b) Formación de pseudomicelio y/o micelio verdadero.

Medio: Harina de maíz agar para Placa de Dalmau.

2. Características de la reproducción asexual o vegetativa.

Medios: GELPA y YMA.

3. Características de la reproducción sexual.

a) Proceso de formación de ascas y ascosporas.

b) Características de ascas y ascosporas.

- Situación del asca.

- Forma y medidas del asca.

- Número de ascosporas por asca.

- Forma y medidas de las ascosporas.

Medios de esporulación: Gorodkova agar y Fowell agar.

GELPA (glucosa 2%, extracto de levadura 0.5%, peptona 1%, agar 2%)

YMA (Agar para morfología de levaduras marca DIFCO)

Gorodkova agar (glucosa 0.1%, peptona 1%, NaCl 0.5%, agar 2%)

Fowell agar (acetato de sodio 0.5%, agar 2%)

II Características Fisiológicas y Bioquímicas.

1. Utilización de compuestos de carbono.

a) Fermentación de 6-9 carbohidratos.

Carbohidratos: glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa y rafinosa. Además: melibiosa, almidón e inulina.

b) Asimilación de 18-29 fuentes de carbono: galactosa, sacarosa, maltosa, celobiosa, trehalosa, lactosa, rafinosa, almidón soluble, D-xilosa, L-arabinosa, D-ribose, L-ramnosa, eritritol, ribitol, D-manitol, ácido succínico, ácido cítrico e inositol. Además: hidrocloreto de glucosamina, L-sorbose, melibiosa, melezitosa, inulina, D-arabinosa, glucitol, α -metil-D-glucosido, salicina, D-gluconato de potasio y DL-ácido láctico.

c) Desdoblamiento de Arbutina. Prueba para confirmar la actividad de la β -glucosidasa en las levaduras.

2. Utilización de compuestos de nitrógeno.

a) Asimilación de nitrato de potasio y de nitrito de sodio..

b) Asimilación de hidrocloreto de etilamina,

c) Asimilación de dihidrocloreto de cadaverina.

3. Requerimientos de vitaminas para el crecimiento.

a) Crecimiento en medio libre de vitaminas.

4. Resistencia al antibiótico cicloheximida.

a) 100 ppm

b) 1000 ppm.

5. Crecimiento en medios de alta presión osmótica.

a) Crecimiento en medio de 50% de glucosa, extracto de levadura.

6. Crecimiento a 37°C

7. Prueba de color con el reactivo azul B de diazonio, en medio sólido de Sabouraud (4% de glucosa, 0.5% de extracto de levadura, 2% agar).

2.- DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL FACTOR ZIMOCIDA.

2.1.- Determinación de biomasa.

Los cálculos que se realizaron para definir las proporciones en gramos de levaduras que se inocularían y que se utilizarían como tapete se basaron en la fórmula: $X \text{ g/l} = (\text{Abs}-2.96 \times 10^{-2})/1.92$

Para llegar a ésta fórmula se llevó a cabo un trabajo en el que se inoculó una levadura en un medio líquido y se dejó crecer; una vez que había crecido la levadura, a este medio se le hicieron diluciones continuas (1:10, 1:100, 1:1000, etc.) y a éstas diluciones se les midió la absorbancia a una longitud de onda de 650 nm. A partir de esas mismas diluciones se tomó un volumen conocido, el que se filtró a través de papel filtro previamente tarado y se determinó peso seco. Teniendo éstos datos se graficó absorbancia vs. peso seco obteniéndose una recta.

2.2.- Determinación del factor zimocida de todas las cepas aisladas contra levaduras sensibles de colección por el método reportado por Farris *et al.* (1991) con algunas modificaciones.

2.2.1.- Cepas:

Para determinar el factor zimocida de las cepas aisladas de pulque y aguamiel, se utilizaron las cepas sensibles de colección: *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 y *Candida glabrata* Y 55.

2.2.2.- Medios:

Medio GELP (Glucosa-extracto de levadura-peptona), GELPA + 0.003% de azul de metileno (microfiltrado) y se ajusta a un pH de 4.8 mediante soluciones de fosfatos (fosfato dibásico y fosfato monobásico). Debido a las observaciones de Kono y Himeno (1992); quienes reportan que las pruebas para factor zimocida son más evidentes con cierta concentración de NaCl, para algunas cepas del género *Kluyveromyces*, en algunos casos se

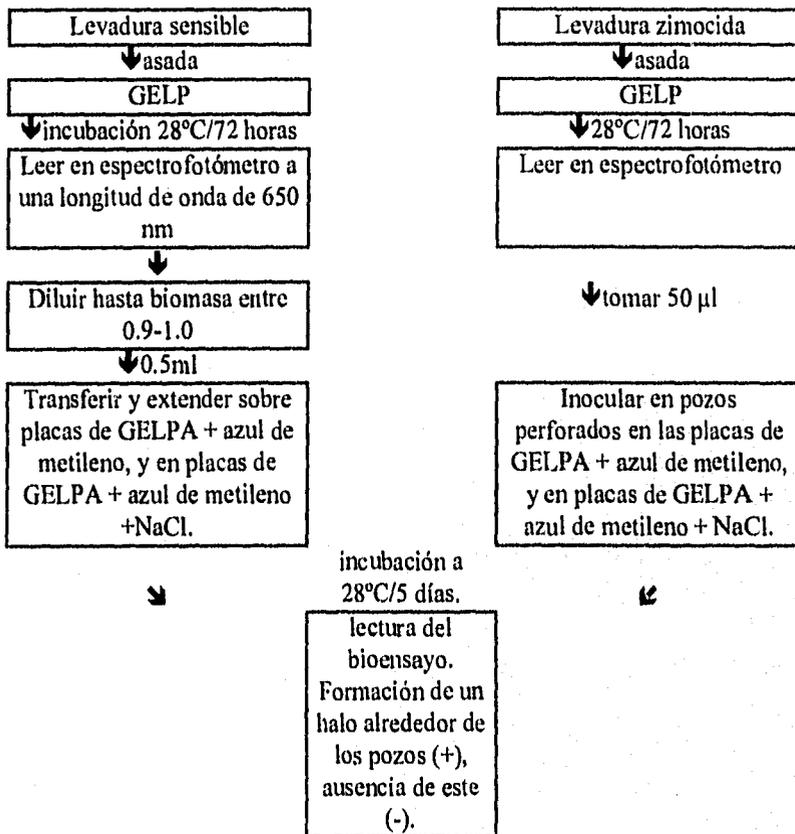
hicieron pruebas agregando un 5% de NaCl a un pH de 4.8 (solamente se probó con un aislamiento de cada una de las especies obtenidas de pulque y aguamiel).

2.2.3.- Determinación del factor zimocida:

El método utilizado para determinar la presencia del factor zimocida, es una modificación del método reportado por Farris *et al.* (1991). Primeramente se inoculó, en forma individual, tanto la cepa sensible como la cepa a la que se le determinó la presencia del factor zimocida en medio de GELP, y se incubó a una temperatura de 28°C durante 72 horas con agitación de 200 rpm. La suspensión de levaduras se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 650 nm, y se ajustó hasta obtener una biomasa entre 0.9-1.0, para facilitar los cálculos.

Se transfirieron 0.5 ml (concentración de 10^{-4} g/ml) de la suspensión de levaduras de cada una de las cepas sensibles de colección, que se emplean como tapete, sobre placas de medio de GELPA + azul de metileno ajustado a un pH de 4.8 y en medio de GELPA adicionado con azul de metileno (0.003%) y además con un 5% de NaCl ajustado también a un pH de 4.8. La suspensión de levaduras se extendió por toda la placa con un rodillo de vidrio, lo más homogéneamente posible; posteriormente se hicieron cuatro pozos en cada una de las placas, los cuales se inocularon 50 microlitros de la suspensión (a una concentración de 10^{-4} gramos/ml) de cada una de las cepas a las que se les determinaría la presencia del factor zimocida. Las placas ya inoculadas se incubaron a 28°C durante 5 días observándose diariamente. Un halo claro alrededor del pozo con un borde de color azul más intenso, debido a la acumulación del azul de metileno, indica que no hubo crecimiento de la levadura sensible, por lo que la prueba es positiva y la levadura del pozo es zimocida.

Diagrama 2.
DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL FACTOR ZIMOCIDA.



2.3.- Evaluación de la sensibilidad de las cepas aisladas de pulque y aguamiel frente a levaduras zimocidas de colección utilizando el mismo método que para determinar el factor zimocida..

Para evaluar la sensibilidad de las cepas aisladas de pulque y aguamiel, se utilizaron cepas zimocidas de colección: *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 738 la cual posee la toxina K2 y *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 que posee la toxina K6. Además se utilizó una cepa aislada de pulque que resultó zimocida: *Candida valida* P1B para ver la resistencia de las cepas aisladas frente a ésta. Las pruebas se realizaron en medio GELPA con azul de metileno a un pH de 4,8 ajustado con soluciones de fosfatos, con y sin el 5% de NaCl. Las pruebas se realizaron sólo con una cepa de cada una de las especies aisladas de pulque y aguamiel.

2.4.- Realización de pruebas cruzadas.

Con el objeto de conocer mejor la capacidad zimocida de la cepa aislada de pulque: *Candida valida* P1B y de las cepas zimocidas de colección: *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 738 y *Kluyveromyces marxianus* NCYC 738, se hicieron pruebas cruzadas para medir el efecto zimocida de cada cepa contra cepas que también poseen la toxina. Las pruebas se hicieron en los dos medios indicados con anterioridad.

Debido a la capacidad fermentadora y a su resistencia frente a levaduras zimocidas de colección y frente a la cepa *Candida valida* P1B, la cepa *Saccharomyces cerevisiae* raza *chevallieri* P6A se utilizó como inóculo contra las cepas zimocidas de colección sólo para observar su comportamiento.

2.5.- Selección de las cepas, que por sus características resultaron más apropiadas para observar el comportamiento de una levadura zimocida frente a una levadura sensible de colección, empleando suspensiones de diferentes concentraciones y en desventaja para la cepa zimocida.

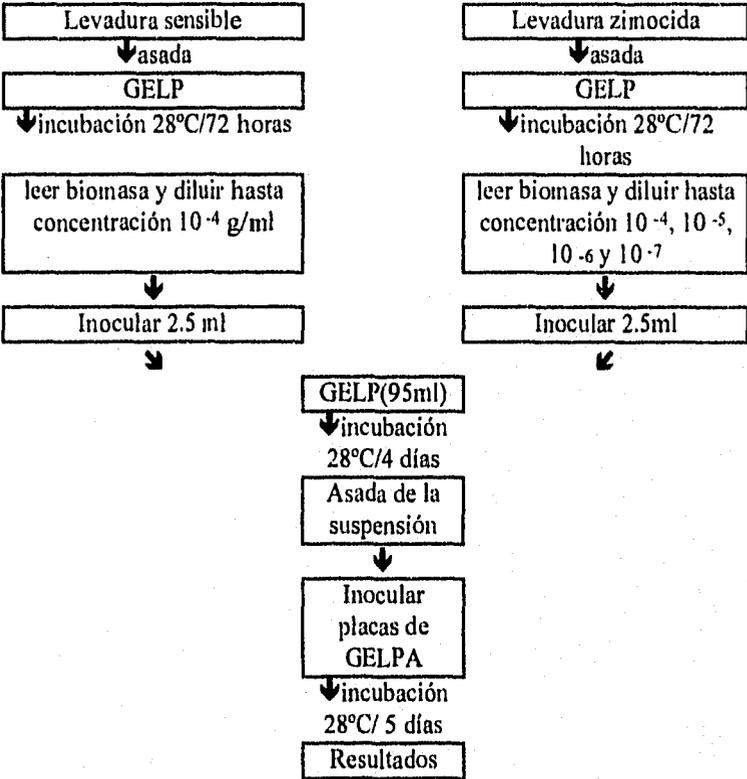
La última prueba a realizar con respecto al factor zimocida fue para observar el comportamiento de una levadura zimocida, en este caso la cepa zimocida de pulque *Candida valida* con clave **PIB**, contra una levadura sensible y contra una resistente en concentraciones iguales y en desventaja para la zimocida. Se tienen ciertas limitaciones para llevar a cabo estas pruebas, ya que es difícil identificar dos diferentes cepas cuando se inoculan en un mismo medio, dado que sus características macromorfológicas pueden ser similares; por esta razón se escogieron dos cepas que pudieran ser distinguidas fácilmente por diferencias en su morfología colonial

Las cepas utilizadas en este bioensayo fueron la levadura zimocida *Candida valida* **PIB** aislada de pulque por ser la única cepa zimocida con una morfología colonial diferente (colonia blanca, opaca. plana, algo rugosa, con borde fimbriado (tabla 2) y las cepas sensibles *Saccharomyces cerevisiae* **NCYC 1006**, cuyas características morfológicas coloniales son: colonia blanca-cremosa poco elevada, lisa, brillante y con borde continuo; *Candida glabrata* **Y55**, colonia blanca, brillante con borde continuo; y *Saccharomyces cerevisiae* raza *chevallieri* **P6A** aislada de pulque, colonia poco elevada, lisa, color crema, brillante con borde ondulado.

Para realizar esta prueba el primer paso fue inocular individualmente las cepas zimocida y sensible e incubarlas en medio GELP, a 28°C durante 72 horas con agitación a 200 rpm. Posteriormente se ajustó la concentración por dilución hasta obtener concentraciones del mismo orden (10^{-4}) tanto de la cepa zimocida como de la sensible; se inocularon 2.5 ml de cada una de las suspensiones de la levadura zimocida *Candida valida* **PIB** y de las diferentes levaduras sensibles (a las que se determinó su resistencia) en 95 ml de medio GELP. Después de un período de incubación de 4 días, bajo las condiciones ya mencionadas; una asada del cultivo mixto se sembró por estrías múltiples en placa de GELPA, por triplicado. Las placas se incubaron a 28°C durante 5 días. Este mismo procedimiento se repitió disminuyendo la concentración de la levadura zimocida. Las concentraciones utilizadas fueron de un orden de 10^{-4} g/ml

para la levadura sensible contra concentraciones del orden de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , y 10^{-7} g/ml de la levadura zimocida. Finalmente se observaron las placas con el fin de determinar si el crecimiento de las cepas sensible y zimocida es proporcional o no.

Diagrama 3
DETERMINACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE UNA LEVADURA ZIMOCIDA FRENTE A UNA SENSIBLE EN CONCENTRACIONES EN DESVENTAJA PARA LA ZIMOCIDA.



3.- RESISTENCIA ALCOHÓLICA.

3.1.- Determinación de la resistencia de las diferentes cepas de levaduras aisladas de pulque y aguamiel, a distintas concentraciones de etanol.

3.1.1.- Cepas:

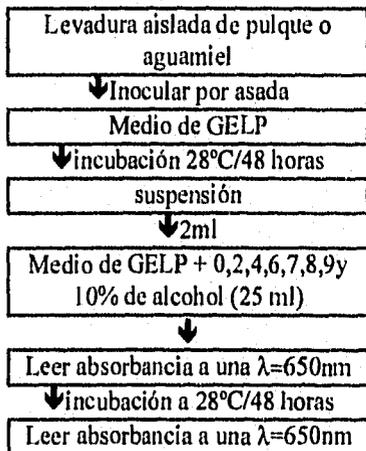
Se midió resistencia a diferentes concentraciones de etanol a todas las cepas aisladas de pulque y aguamiel.

3.1.2.- Metodología:

Para medir la resistencia alcohólica de las levaduras aisladas de pulque y aguamiel, se prepararon de cada una de las cepas a probar, cultivos de 48 horas a 28°C en medio GELP con una agitación de 200 rpm. De cada cultivo se tomaron 2ml los que se inocularon en medio GELP conteniendo alcohol en concentraciones que iban de 0 a 10%, del volumen total del medio. El cultivo se hizo en matraces de 250 ml a 28°C durante 48 horas con una agitación de 200 rpm. La absorbancia del medio se determinó a las 0 y 48 horas para ver si hubo crecimiento de la cepa o no.

Diagrama 4.

TOLERANCIA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL.



RESULTADOS

I.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN.

De las siete muestras de pulque y dos de aguamiel se obtuvieron 19 cepas de levaduras y mohos de las cuales se identificaron siete diferentes especies.

Tabla 1. Levaduras y mohos aislados de pulque y aguamiel

Sustrato	Muestra	Cepa	Clave	Especie
Pulque	1	"A"	P1A	<i>Geotrichum candidum</i> Link (moho).
Pulque	1	"B"	P1B	<i>Candida valida</i> (Leberle) van Uden et Buckley.
Pulque	2	"A"	P2A	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> raza <i>chevalieri</i> Meyen ex Hansen.
Pulque	3	"A"	P3A	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> raza <i>chevalieri</i> Meyen ex Hansen.
Pulque	3	"B"	P3B	<i>Candida valida</i>
Pulque	4	"A"	P4A	<i>Candida valida</i>
Pulque	4	"B"	P4B	<i>Geotrichum candidum</i> (moho)
Pulque	4	"C"	P4C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> raza <i>chevalieri</i>
Pulque	5	"A"	P5A	<i>Candida valida</i>
Pulque	5	"B"	P5B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> raza <i>capensis</i> Meyen ex Hansen.
Pulque	6	"A"	P6A	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> raza <i>chevalieri</i>
Pulque	6	"B"	P6B	<i>Candida valida</i>
Pulque	7	"A"	P7A	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (Hansen) van der Walt var. <i>lactis</i> (Dombrowski) Johannsen et van der Walt
Pulque	7	"B"	P7B	<i>Candida valida</i>
Aguamiel	1	"A"	A1A	<i>Candida lusitanae</i> van Uden et do Carmo-Sousa
Aguamiel	1	"B"	A1B	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (Hansen) van der Walt var. <i>bulgaricus</i> (Santa Maria) Johanssen et van der Walt
Aguamiel	2	"A"	A2A	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>
Aguamiel	2	"B"	A2B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> raza <i>capensis</i>
Aguamiel	2	"C"	A2C	<i>Geotrichum candidum</i> (moho)

Tabla 2. Características culturales y micromorfológicas de las especies de levaduras aisladas de pulque y aguamiel.

	<i>Candida utilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> raza <i>chevallieri</i> .
A. Macromorfología o características culturales.		
1. Crecimiento en medio líquido. GELP.	Formación de película, anillo ascendente y poco sedimento.	Sedimento abundante.
2. Crecimiento en medio sólido. GELPA.	Colonia de aprox. 3.0 cm de diámetro a los 30 días, blanca-crema, opaca, poco elevada, superficie poco rugosa, borde (irregular) con surcos radiales poco marcados. (Foto 1).	Colonias de aprox. 3.2 cm de diámetro a los 30 días con características variables, color crema, brillantes u opacas, poco elevadas, lisas, y algunas poco plegadas y borde ondulado (Foto 2).
B. Micromorfología.		
1. Características de las células vegetativas.		
a) Morfología en medio sólido.	Células ovaladas de 3.84-4.6 X 6.88-7.52 μm	Células globosas a subglobosas de 4.8-6.4 X 4.8-6.4 μm
b) Formación de pseudomicelio y/o micelio verdadero.	Pseudomicelio bien desarrollado sobretodo en anaerobiosis.	Pseudomicelio rudimentario tanto en anaerobiosis como en aerobiosis.
2. Características de la reproducción asexual o vegetativa.	Gemación multipolar.	Gemación multipolar.
3. Características de la reproducción sexual.		
a) Proceso de formación del asca.	Ausente.	Directamente de las células vegetativas.
b) Características de asca y ascosporas.		
- Situación del asca.		- Libre y con pared persistente.
- Forma y medidas del asca.		- Globosas a poco alargadas de 6.4-10.0 X 6.5-12.0 μm
- Número de ascosporas por asca.		- De 1-4 ascosporas por asca.
- Forma y medidas de ascosporas.		- Esferoidales de 3.2 X 3.2 μm
- Medios de esporulación.		- GELPA, YMA y Gorodkova.

Tabla 2 continuación...

	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> raza <i>capensis</i> .	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lactis</i>
A. Macromorfología ó características culturales.		
1. Crecimiento en medio líquido.	Formación de sedimento.	Formación de sedimento.
2. Crecimiento en medio sólido.	Colonia de aprox. 3.0 cm de diámetro a los 30 días, blanca-crema, opaca, plana, superficie con ligeras estrías, borde fimbriado.	Colonia de aprox. 3.5 cm de diámetro a los 30 días. blanca, brillante, poco elevada, superficie lisa, borde ondulado.
B. Micromorfología.		
1. Características de las células vegetativas.		
a) Morfología en medio sólido.	Células globosas a subglobosas de 4.8-6.4 X 4.8-6.4 µm Pseudomicelio desarrollado sobretodo en anaerobiosis.	Células subglobosas a elipsoidales de 3.2-6.4 X 4.8-6.4 µm Pseudomicelio desarrollado sobretodo en anaerobiosis.
b) Formación de pseudomicelio y/o micelio verdadero.	Gemación multipolar.	Gemación multipolar.
2. Características de la reproducción asexual o vegetativa.		
3. Características de la reproducción sexual.	Directamente de las células vegetativas.	Directamente de las células vegetativas.
a) Proceso de formación del asca.		
b) Características de ascas y ascosporas.	- Libre con pared resistente. - Globosas a elipsoidales de 6.4X8.0 µm - De 1-4 ascosporas por asca.	- Libre y dehiscente - Globosas a elipsoidales de 5.6X8.0 µm - De 1-4 ascosporas por asca.
- Número de ascosporas por asca.	- Esferoidales de 3.2X3.2 µm	- Esferoidales de 2.8X2.8 µm
- Forma y medidas de las ascosporas.	- GELPA, YMA y Gorodkova.	- Sólo en GELPA.
- Medios de esporulación.		

Tabla 2 continuación...

	<i>Candida lusitanae</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>
<p>A. Macromorfología ó características culturales.</p> <p>1. Crecimiento en medio líquido.</p> <p>2. Crecimiento en medio sólido.</p>	<p>Sedimento abundante.</p> <p>Colonia de aprox. 3.9cm de diámetro a los 30 días, blanca, opaca, superficie lisa con ligeras estrias, con borde ondulado.</p>	<p>Formación de sedimento.</p> <p>Colonia de aprox. 4.0 cm de diámetro a los 30 días, blanca, poco brillante, superficie lisa con ligeras estrias, borde ondulado poco fimbriado.</p>
<p>B. Micromorfología.</p> <p>1. Características de las células vegetativas.</p> <p>a) Morfología en medio sólido.</p> <p>b) Formación de pseudomicelio y/o micelio verdadero.</p> <p>2. Características de la reproducción asexual o vegetativa,</p> <p>3 Características de la reproducción sexual.</p> <p>a) Proceso de formación del asca.</p> <p>b) Características de ascas y ascosporas.</p> <p>- Situación del asca.</p> <p>- Forma y medidas del asca.</p> <p>- Número de ascosporas por asca.</p> <p>- Forma y medidas de las ascosporas.</p> <p>- Medios de esporulación.</p>	<p>Células globosas a subglobosas de 3.2-4.8 X 3.2-6.4 μm</p> <p>Pseudomicelio desarrollado sobretodo en anaerobiosis.</p> <p>Gemación multipolar.</p> <p>Ausente.</p>	<p>Células elipsoidales a subglobosas de 3.2-4.8 X 4.0-8.0 μm</p> <p>Pseudomicelio desarrollado tanto en aerobiosis como anaerobiosis.</p> <p>Gemación multipolar.</p> <p>Directamente de las células vegetativas.</p> <p>- Libre y dehisciente (sin pared).</p> <p>- Globosas a elipsoidales de 5.6-8.0 μm</p> <p>- De 1-4 ascas por ascospora.</p> <p>- Esferoidales de 2.4 X 3.2 μm</p> <p>- GELPA, YMA y Gorodkowna.</p>

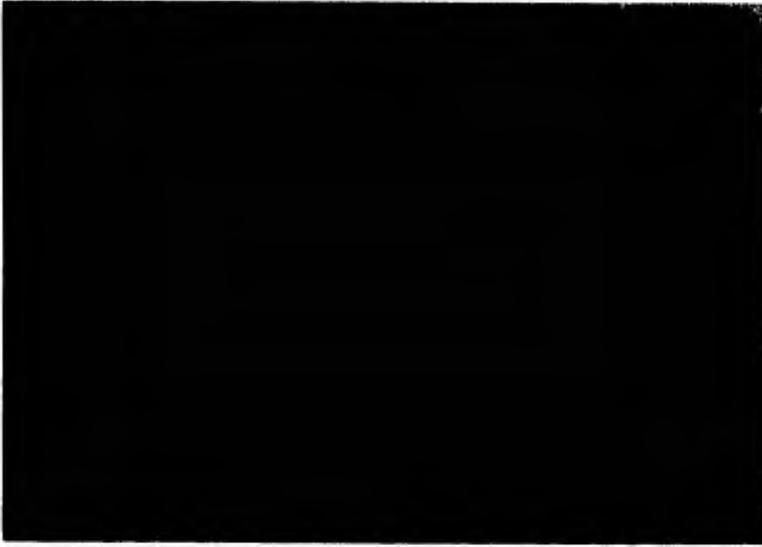


Foto 1. Colonia gigante de *Candida valida* P1B (Diámetro: 3.0 cm, color crema, opaca, poco elevada, borde irregular).

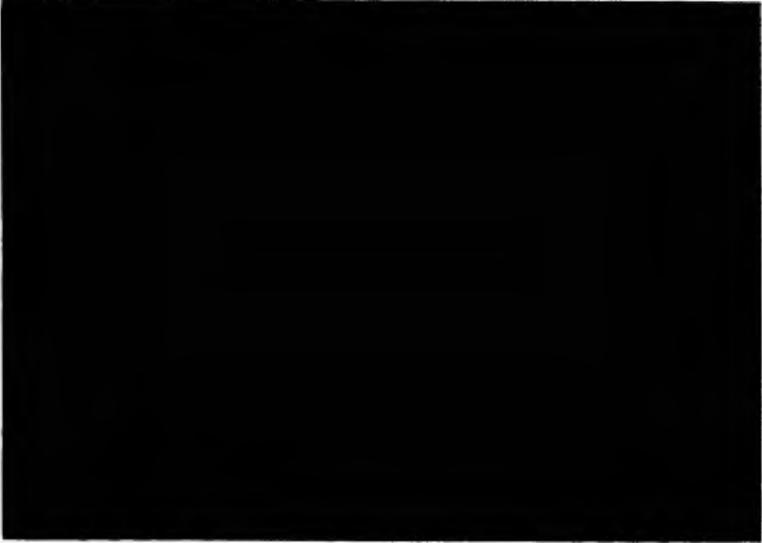


Foto 2. Colonia gigante de *Saccharomyces cerevisiae* raza *chevalieri* P6A (Diámetro 3.2 cm, color crema, poco brillante, poco elevada, lisa con borde ondulado).

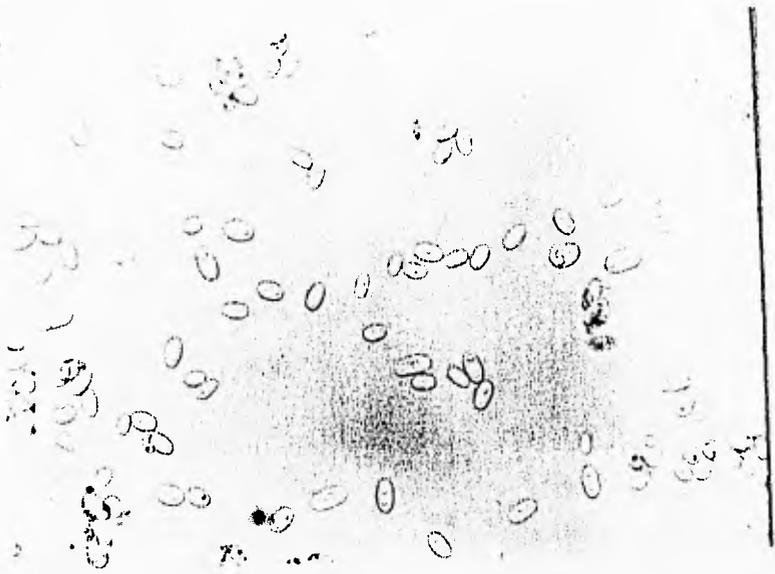


Foto 3. *Candida valida* PIB (Células ovaladas de 3.84-4.6 X 6.88-7.52 μm)



Foto 4. Pseudomicelio bien desarrollado de *Candida valida* PIB

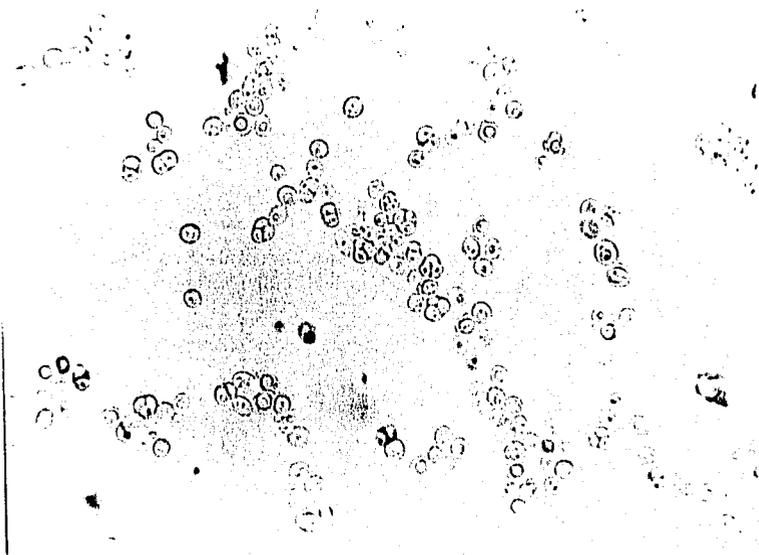


Foto 5 Células vegetativas y formación de ascas de *Saccharomyces cerevisiae* raza *chevalieri* (ascas: 6.4-10 X 6.5-12.0 μm)

Tabla 3. Características fisiológicas y bioquímicas de las levaduras aisladas del pulque y aguamiel.

	<i>Candida valida</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i> raza <i>chevallieri</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i> raza <i>capensis</i>
I. Utilización de compuestos de carbono.			
a) Fermentación:			
-Glucosa	-	+	+
-Galactosa	-	+	-
-Sacarosa	-	+	+
-Maltosa	-	-	-
-Lactosa	-	-	-
-Rafinosa	-	+	+
-Melibiosa	-	-	-
-Almidón	•	-	-
-Inulina	-	•	•
b) Asimilación	-		
-Galactosa	-	+ y -	-
-Sacarosa	-	+	+
-Maltosa	-	-	-
-Celobiosa	-	-	-
-Trehalosa	-	+	+
-Lactosa	-	-	-
-Rafinosa	-	+	+
-Almidón soluble	-	-	-
-D-xilosa	-	-	-
-L-arabinosa	-	-	-
-D-ribosa	-	-	-
-L-ramnosa	-	-	-
-Eritritol	-	-	-
-Ribitol	-	-	-
-D-manitol	-	-	-
-Ácido succínico	-	-	-
-Ácido cítrico	-	-	-
-Inositol	-	-	-
-Base carbonada (testigo)	-	-	-
-Base nitrogenada (testigo)	-	-	-
-L-sorbosa	-	•	•
-Melibiosa	-	•	•
-Melezitosa	-	•	•
-Inulina	-	•	•
-D-glucosantina-HCl	-	•	•
-Glucitol	-	•	•
- α -metil-D-glucosido	-	•	•
-Salicina	-	•	•
-D-gluconato de potasio	-	•	•
-DL-ácido láctico	-	•	•
-D-arabinosa	-	•	•
c) Desdoblamiento de arbutina	-	+	•

*No se hizo la prueba

Tabla 3 continuación...

	<i>Candida valida</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i> raza <i>chevalieri</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i> raza <i>capensis</i>
2. Utilización de compuestos de nitrógeno			
a) Asimilación de KNO_3	-	-	-
b) Asimilación de Etilamina-HCl	*	-	-
c) Asimilación de Cadaverina-2HCl	*	-	-
3. Requerimientos de vitaminas para el crecimiento.			
a) Crecimiento en medio libre de vitaminas (MLV)	+	+	+
4. Resistencia al antibiótico cicloheximida.			
a) 100 ppm	*	-	-
b) 1000 ppm	*	-	-
5. Crecimiento en medios de alta presión osmótica.			
a) Tolerancia a 50% de glucosa.	+	+	+
6. Crecimiento a 37° C	+	-	-
7. Prueba de color DBB (diazonium blue)	-	*	*

*No se hizo la prueba.

Tabla 4. Características fisiológicas y bioquímicas de las levaduras aisladas del pulque y aguamiel.

	<i>K. marxianus</i> var. <i>lactis</i>	<i>Candida lusitaneae</i>	<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>
1. Utilización de fuentes de carbono.			
a) Fermentación			
-Glucosa	+	+	+
-Galactosa	+	+	+
-Sacarosa	+	+	+
-Maltosa	-	-	-
-Lactosa	+	-	+
-Rafinosa	+	-	+
-Melibiosa	•	•	-
-Almidón	•	•	-
-Inulina	-	•	•
b) Asimilación			
-Galactosa	+	+	+
-Sacarosa	+	+	+
-Maltosa	-	+	-
-Celobiosa	+	+	+
-Trehalosa	+	+	-
-Lactosa	+	-	+
-Rafinosa	+	-	•
-Almidón soluble	-	-	-
-D-xilosa	+	+	+
-L-arabinosa	-	-	- y +
-D-ribosa	-	-	-
-L-ramnosa	-	+	-
-Eritritol	-	-	-
-Ribitol	-	+	+
-D-manitol	+	+	- y +
-Ácido succínico	+	+	- y +
-Ácido cítrico	-	+	-
-Inositol	-	-	-
-Base carbonada (testigo)	-	-	-
-Base nitrogenada (testigo)	-	-	-
-L-sorbosa	•	+	•
-Melibiosa	•	+	•
-Melezitosa	•	-	•
-Inulina	•	-	+
-D-arabinosa	•	-	•
-D-glucosamina HCl	•	+	•
-Glucitol	•	+	•
-α-metil-D-glucosido	•	+	•
-Salicina	•	+	•
-D-gluconato de potasio	•	+	•
-DL-ácido láctico	•	+	•
c) Desdoblamiento de arbutina	+	+	+

*No se hizo la prueba.

Tabla 4 continuación...

	<i>K.marxianus</i> var. <i>lactis</i>	<i>Candida lusitanae</i>	<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>
2. Utilización de compuestos de nitrógeno			
a) Asimilación de KNO ₃	-	-	-
b) Asimilación de Etilamina-HCl	*	*	-
c) Asimilación de Cadaverina-2HCl	*	*	-
3. Requerimientos de vitaminas para el crecimiento.			
a) Crecimiento en medio libre de vitaminas (MLV)	-	-	-
4. Resistencia al antibiótico cicloheximida.			
a) 100 ppm	+	*	+
b) 1000ppm	*	*	+
5. Crecimiento en medios de alta presión osmótica.			
a) Crecimiento a 50 % de glucosa.	+	+	+
6. Crecimiento a 37° C	+	+	+
7. Prueba de color DBB (diazonium blue)	*	-	*

*No se hizo la prueba.

2.-FACTOR ZIMOCIDA

2.1 Tabla 5.-Levaduras aisladas de pulque y aguamiel para ver actividad zimocida vs. levaduras sensibles de colección *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 y *Candida glabrata* Y55.

Pozo:	Clave:	Tapete: (Levadura sensible)	Resultado de la prueba
<i>Candida valida</i> Medio GELPA (1) y (2)	P1B	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006 <i>Candida glabrata</i> Y55	+ +
<i>S.cerevisiae</i> raza <i>chevallieri</i> Medio GELPA (1) y (2)	P2A	<i>S.cerevisiae</i> NCYC 1006 <i>Candida glabrata</i> Y 55	- -
<i>S.cerevisiae</i> raza <i>chevallieri</i> Medio GELPA (1) y (2)	P3A	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006 <i>Candida glabrata</i> Y 55	- -
<i>Candida valida</i> Medio GELPA (1) y (2)	P3B	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006 <i>Candida glabrata</i> Y 55	+ +
<i>Candida valida</i> Medio GELPA (1) y (2)	P4A	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006 <i>Candida glabrata</i> Y55	+ +
<i>S.cerevisiae</i> raza <i>chevallieri</i> Medio GELPA (1) y (2)	P4C	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006 <i>Candida glabrata</i> Y 55	- -
<i>Candida valida</i> Medio GELPA (1) y (2)	P5A	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006 <i>Candida glabrata</i> Y 55	+ +
<i>S.cerevisiae</i> raza <i>capensis</i> Medio GELPA (1) y (2)	P5B	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006 <i>Candida glabrata</i> Y 55	- -
<i>S.cerevisiae</i> raza <i>chevallieri</i> Medio GELPA (1) y (2)	P6A	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006 <i>Candida glabrata</i> Y55	- -
<i>Candida valida</i> Medio GELPA (1) y (2)	P6B	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006 <i>Candida glabrata</i> Y 55	+ +
<i>K.marxianus</i> var. <i>lactis</i> Medio GELPA (1) y (2)	P7A	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006 <i>Candida glabrata</i> Y 55	+ +
<i>Candida valida</i> Medio GELPA (1) y (2)	P7B	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006 <i>Candida glabrata</i> Y 55	+ +
<i>Candida lusitanene</i> Medio GELPA (1) y (2)	A1A	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006 <i>Candida glabrata</i> Y 55	- -
<i>K.marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> Medio GELPA (1) y (2)	A1B	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006 <i>Candida glabrata</i> Y 55	+ +
<i>K.marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> Medio GELPA (1) y (2)	A2A	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006 <i>Candida glabrata</i> Y 55	+ +
<i>S.cerevisiae</i> var. <i>capensis</i> Medio GELPA (1) y (2)	A2B	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006 <i>Candida glabrata</i> Y 55	- -

Medio (1): GELPA + 0.003% azul de metileno.

Medio (2): GELPA + 0.003% azul de metileno + 5% de NaCl

+ Zimocida, -No zimocida

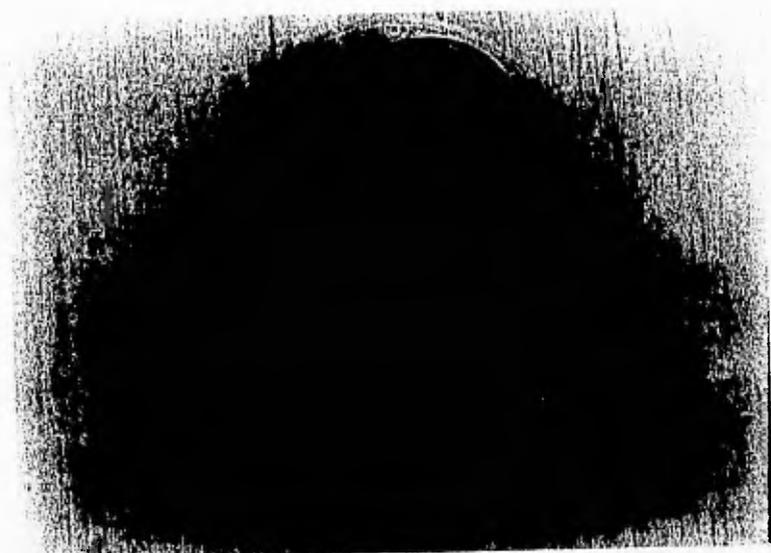


Foto 6. Pozo: *Candida valida* P1B (levadura zimocida). Tapete: *Saccharomyces cerevisiae* (levadura sensible de colección). NCYC 1006



Foto 7. Pozo: *Saccharomyces cerevisiae* raza *chevalieri* P6A (levadura "neutra"). Tapete: *Candida glabrata* Y55

2.2. Tabla 6. Levaduras zimocidas de colección: *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 738 (K2), *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 (K6) y *Candida valida* PIB contra levaduras aisladas de pulque y aguamiel para ver su resistencia.

Pozo: (levadura zimocida)	Tapete:	Clave:	Resultado de la prueba
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738, <i>K. marxianus</i> NCYC 587 PIB	<i>Candida valida</i>	P1B	+ . .
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738 <i>K. marxianus</i> NCYC 587 PIB	<i>S. cerevisiae</i> raza <i>chevallieri</i>	P2A	+ . .
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738 <i>K. marxianus</i> NCYC 587 PIB	<i>S. cerevisiae</i> raza <i>chevallieri</i>	P3A	+ . .
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738 <i>K. marxianus</i> NCYC 587 PIB	<i>Candida valida</i>	P3B	+ . .
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738 <i>K. marxianus</i> NCYC 587 PIB	<i>Candida valida</i>	P4A	+ . .
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738 <i>K. marxianus</i> NCYC 587 PIB	<i>S. cerevisiae</i> raza <i>chevallieri</i>	P4C	+ . .
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738 <i>K. marxianus</i> NCYC 587 PIB	<i>Candida valida</i>	P5A	+ . .
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738 <i>K. marxianus</i> NCYC 587 PIB	<i>S. cerevisiae</i> raza <i>capensis</i>	P5B	+ - .
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738 <i>K. marxianus</i> NCYC 587 PIB	<i>S. cerevisiae</i> raza <i>chevallieri</i>	P6A	+ + .
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738 <i>K. marxianus</i> NCYC 587 PIB	<i>Candida valida</i>	P6B	+ . .
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738 <i>K. marxianus</i> NCYC 587 PIB	<i>K. marxianus</i> var. <i>lactis</i>	P7A	+ + -
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738 <i>K. marxianus</i> NCYC 587 PIB	<i>Candida valida</i>	P7C	+ . .
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738 <i>K. marxianus</i> NCYC 587 PIB	<i>Candida lusitanae</i>	A1A	+ + .
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738 <i>K. marxianus</i> NCYC 587 PIB	<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	A1B	+ . .
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738 <i>K. marxianus</i> NCYC 587 PIB	<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	A2A	+ + -
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738 <i>K. marxianus</i> NCYC 587 PIB	<i>S. cerevisiae</i> raza. <i>capensis</i>	A2B	+ . .

+ Resistente; -No resistente ó sensible; *No se hizo la prueba. Medio GELPA 1 y 2 (ver tabla anterior)

Tabla 7. Pruebas cruzadas entre las levaduras zimocidas de colección: *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 738, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587, *Candida valida* P1B aislada de pulque y *Saccharomyces cerevisiae* raza *chevaleri* P6A aislada de pulque y que no es zimocida; contra levaduras zimocidas de colección: *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 738, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 y P1B (Pruebas cruzadas).

Pozo: (levadura zimocida)	Tapete:	Resultado de la prueba:
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 738	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738	*
	<i>K. marxianus</i> NCYC 587	-
	<i>C. valida</i> P1B	-
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 587	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738	+
	<i>K. marxianus</i> NCYC 587	*
	<i>C. valida</i> P1B	+
<i>Candida valida</i> (P1B)	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738	(+)
	<i>K. marxianus</i> NCYC 587	(+)
	<i>C. valida</i> P1B	*
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> raza <i>chevaleri</i> (P6A)	<i>S. NCYC 738</i>	-
	<i>K. marxianus</i> NCYC 587	-
	<i>C. Valida</i> P1B	-

Medio GELPA 1 y 2 (ver tabla 5)

+Zimocida, - No zimocida.

*No se hizo la prueba

(+) Prueba positiva solo en medio con 5% de NaCl.

2.3.-Comportamiento de la cepa zimocida *Candida valida* PIB frente a una levadura sensible de colección, empleando suspensiones de concentraciones diferentes y en desventaja para la zimocida

Tabla 8. *Candida valida* PIB contra *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006.

Levadura zimocida:	Concentración: (g/ml)	Levadura sensible:	Concentración: (g/ml)	Resultados en placa de GELPA
<i>Candida valida</i> PIB	1.15×10^{-5}	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 1006	1.08×10^{-5}	Sólo creció <i>C. valida</i> PIB.
<i>Candida valida</i> PIB	0.92×10^{-5}	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 1006	1.30×10^{-5}	Sólo creció <i>C. valida</i> PIB
<i>Candida valida</i> PIB	0.27×10^{-5}	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 1006	2.26×10^{-5}	Sólo creció <i>C. valida</i> PIB
<i>Candida valida</i> PIB	0.54×10^{-6}	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 1006	2.47×10^{-5}	Sólo creció <i>C. valida</i> PIB
<i>Candida valida</i> PIB	0.48×10^{-6}	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 1006	2.35×10^{-5}	Sólo creció <i>C. valida</i> PIB
<i>Candida valida</i> PIB	0.48×10^{-7}	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 1006	2.35×10^{-5}	Predomina <i>C.</i> <i>valida</i> PIB
<i>Candida valida</i> PIB	0.48×10^{-8}	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 1006	2.35×10^{-5}	Predomina <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>

Tabla 9. *Candida valida* P1B contra *Candida glabrata* Y55

Levadura zimocida:	Concentración : (g/ml)	Levadura sensible:	Concentración : (g/ml)	Resultados en placa:
<i>Candida valida</i> P1B	1.15×10^{-5}	<i>Candida glabrata</i> Y55	1.33×10^{-5}	Sólo creció <i>C. valida</i> P1B
<i>Candida valida</i> P1B	0.92×10^{-5}	<i>Candida glabrata</i> Y55	1.59×10^{-5}	Sólo creció <i>C. valida</i> P1B
<i>Candida valida</i> P1B	0.27×10^{-5}	<i>Candida glabrata</i> Y55	2.70×10^{-5}	Sólo creció <i>C. valida</i> P1B
<i>Candida valida</i> P1B	0.54×10^{-6}	<i>Candida glabrata</i> Y55	2.94×10^{-5}	Sólo creció <i>C. valida</i> P1B
<i>Candida valida</i> P1B	0.48×10^{-6}	<i>Candida glabrata</i> Y55	2.82×10^{-5}	Sólo crece <i>C. valida</i> P1B
<i>Candida valida</i> P1B	0.48×10^{-7}	<i>Candida glabrata</i> Y55	2.82×10^{-5}	Predomina <i>C. valida</i> P1B
<i>Candida valida</i> P1B	0.48×10^{-8}	<i>Candida glabrata</i> Y55	2.82×10^{-5}	Predomina <i>C. glabrata</i>

TABLA 10. *Candida valida* PIB contra *Saccharomyces cerevisiae* raza *chevalieri* P6A.

Levadura zimocida:	Concentración: (g/ml)	Levadura sensible:	Concentración: (g/ml)	Resultados en placa
<i>Candida valida</i> PIB	1.15 X 10 ⁻⁵	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> raza <i>chevalieri</i> P6A	1.41 X 10 ⁻⁵	Predomina <i>C. valida</i> PIB, contra una colonia de <i>S.c. raza chevalieri</i>
<i>Candida valida</i> PIB	0.92 X 10 ⁻⁵	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> raza <i>chevalieri</i> P6A	1.69 X 10 ⁻⁵	Predomina <i>C. valida</i> PIB, contra una colonia de <i>S.c. raza chevalieri</i>
<i>Candida valida</i> PIB	0.27 X 10 ⁻⁵	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> raza <i>chevalieri</i> P6A	2.45 X 10 ⁻⁵	Predomina <i>C. valida</i> PIB, contra una colonia de <i>S.c. raza chevalieri</i>
<i>Candida valida</i> PIB	0.54 X 10 ⁻⁶	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> raza <i>chevalieri</i> P6A	2.67 X 10 ⁻⁵	Predomina <i>C. valida</i> PIB, contra una colonia de <i>S.c. raza chevalieri</i>
<i>Candida valida</i> PIB	0.48 X 10 ⁻⁶	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> raza <i>chevalieri</i> P6A	2.81 X 10 ⁻⁵	Predomina <i>C. valida</i> PIB, contra tres colonias de <i>S.c. raza chevalieri</i>
<i>Candida valida</i> PIB	0.48 X 10 ⁻⁷	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> raza <i>chevalieri</i> P6A	2.81 X 10 ⁻⁵	Crecen ambas, predomina <i>C. valida</i> PIB contra ocho colonias de <i>S.c. raza chevalieri</i> .
<i>Candida valida</i> PIB	0.48 X 10 ⁻⁸	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> raza <i>chevalieri</i> P6A	2.81 X 10 ⁻⁵	Predomina <i>S.c. raza chevalieri</i>

RESISTENCIA ALCOHÓLICA.

Tabla 11. Tolerancia a diversas concentraciones de etanol de levaduras aisladas de pulque y aguamiel

Levadura:	Clave:	Resistencia alcohólica:
<i>Candida valida</i>	P1B	>10%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> raza <i>chevalieri</i>	P2A	>10%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> raza <i>chevalieri</i>	P3A	9%
<i>Candida valida</i>	P3B	>10%
<i>Candida valida</i>	P4A	>10%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> raza <i>chevalieri</i>	P4B	9%*
<i>Candida valida</i>	P5A	>10%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> raza <i>capensis</i>	P5B	10%*
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> raza <i>chevalieri</i>	P6A	>10%
<i>Candida valida</i>	P6B	9%*
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lactis</i>	P7A	8%*
<i>Candida valida</i>	P7B	9%
<i>Candida lusitaneae</i>	A1A	8%*
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	A1B	8%
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	A2A	8%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> raza <i>capensis</i>	A2B	10%

*crece poco

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1.- Aislamiento e identificación de las levaduras aisladas de pulque y aguamiel.

En los resultados obtenidos (Tabla 1) puede observarse que en todas las muestras de pulque, existe una microbiota similar, ya que en todas las muestras, excepto en la muestra 2, se encuentra una cepa de *Candida valida* (fase imperfecta de *Pichia membranaefaciens*), la que no es fermentadora, por lo que no puede ser ella la encargada de fermentar el aguamiel y producir pulque. También se encontró una cepa fermentadora del género *Saccharomyces* en casi todas las muestras, con lo cual se puede pensar que puede ser una cepa de éste género la que junto con bacterias, produzca el pulque; no se puede afirmar esto en forma precisa, ya que durante la fermentación del aguamiel hay una sucesión de microorganismos. Tanto *C. valida* como *S. cerevisiae* raza *chevalieri* y raza *capensis* son levaduras que habían sido reportadas previamente como parte de la microbiota del pulque. En las levaduras aisladas de pulque se encontró también en la muestra 7 una cepa de *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* la cual también ya había sido reportada como parte de la microbiota del pulque (Lappe y Ulloa, 1993).

En cuanto a las cepas identificadas en el aguamiel (Tabla 1) se encuentra en ambas muestras *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, y en la muestra 2 también se encontró un aislamiento de *S. cerevisiae* raza *capensis*. De la muestra 1 de aguamiel se aisló una cepa de *Candida lusitaneae* (cuya fase perfecta es *Clavitspora lusitaneae*); que nunca había sido reportada en aguamiel, aunque sí en Tesgüino y *Agave* sp.

La identificación de las cepas aisladas de pulque y aguamiel se realizaron siguiendo las claves generales y específicas compiladas por Kreger-van Rij; 1984. Haciendo referencia a los resultados obtenidos (Tablas 3 y 4) se puede observar que para *Candida valida* las pruebas fisiológicas y bioquímicas coinciden en su mayoría con las cepas de referencia (*Candida valida* CBS 638 y *Pichia membranaefaciens* CBS

107); con excepción de la prueba de crecimiento a 37°, la cual para *Candida valida* debe ser negativa y para *Pichia membranaefaciens* puede ser variable. Tanto para *Saccharomyces cerevisiae* raza *chevalieri* como para raza *capensis* las pruebas bioquímicas coinciden en un 100%, siendo la cepa de referencia: *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171. También las pruebas bioquímicas de las especies *Kluyveromyces marxianus* var *lactis* y var. *bulgaricus* coinciden en su mayoría con las especies de referencia (*Kluyveromyces marxianus* var *lactis* CBS 683 y *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* CBS 2762) con excepción de la prueba de crecimiento en medio de alta presión osmótica donde para ambas levaduras es negativo y debe ser positivo. Por último *Candida lusitaneae* coincide también en su mayoría con la cepa de referencia: *Clavispora lusitaneae* CBS 6936 (fase perfecta), con excepción de la prueba de crecimiento a alta presión osmótica la cual debe ser positiva. Sin embargo se debe hacer notar que aunque las pruebas bioquímicas son las claves principales para identificar una levadura; es muy importante revisar las características morfológicas, ya que existen levaduras de diferentes especies con características fisiológicas y bioquímicas similares, pero revisando sus características morfológicas ya se puede definir cada especie.

2.-Factor zimocida.

2.1.-Determinación de levaduras con factor zimocida.

Refiriéndonos ahora a los resultados de la determinación del factor zimocida (Tabla 5), es notable como en cada muestra de pulque, excepto en la 2, se encuentra una cepa con el factor zimocida, identificada como *Candida valida*, la cual ha sido registrada en la literatura como zimocida con la toxina K7 (Young, 1987). No se puede asegurar que el factor de la cepa encontrada sea K7, para probarlo se tendrían que hacer todas las pruebas cruzadas con cepas zimocidas de colección cuyo factor sea conocido; ya que según refiere la literatura existen cepas de la misma especie con diferente tipo de toxina. Ejemplos: *Saccharomyces cerevisiae*, que puede poseer K1, K2 ó K3. *Candida glabrata* que puede tener K4 ó K11. *Hansenula anomala*, puede tener K5 ó K8 (Young, 1987)

También de pulque se aisló e identificó otra cepa zimocida *K. marxianus* var. *lactis* que actuó en contra de las dos cepas sensibles de colección que se utilizaron como tapete (Tabla 5). En la bibliografía esta especie ya había sido registrada como zimocida (Kitamoto *et al.*, 1992). En cada una de las muestras de aguamiel analizadas se aisló e identificó una cepa zimocida: *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. Las otras cepas encontradas en el aguamiel no dieron positiva las pruebas del factor zimocida.

2.2.- Determinación de sensibilidad de cepas aisladas de pulque y aguamiel.

A pesar de que no todas las cepas aisladas del pulque y del aguamiel poseen el factor zimocida, al realizar las pruebas de sensibilidad ó resistencia utilizando todas las cepas aisladas de pulque y aguamiel como tapete y levaduras zimocidas de colección como inóculo en los pozos (Tabla 6), se determinó que la mayoría de la cepas probadas eran resistentes a la levadura zimocida de colección *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 738 con la toxina K2 ; y en cuanto a a las pruebas de resistencia utilizando como levadura zimocida a una *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 que posee la toxina K6, se decidió realizarlas unicamente contra las levaduras aisladas de diferentes especies (Tabla 6); notando como solamente *Candida valida* y *Saccharomyces cerevisiae* raza *capensis* son sensibles frente a la cepa de colección *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587. En cuanto a la sensibilidad de las levaduras aisladas frente a la cepa zimocida aislada del pulque *Candida valida* PIB se observa que con excepción de la *Saccharomyces cerevisiae* raza. *chevalieri* todas las demás especies probadas resultaron sensibles (Tabla 6).

2.3.- Pruebas cruzadas.

Dada la gran resistencia de *Saccharomyces cerevisiae* raza *chevalieri* P6A frente a las cepas zimocidas de colección y a la zimocida encontrada en pulque, *Candida valida* PIB, se decidió utilizar esta cepa en las pruebas cruzadas (Tabla 7). Se había observado que no era zimocida

contra cepas sensibles de colección (Tabla 5), pero resultó resistente frente a levaduras zimocidas de colección: *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 738 y frente a *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587; por lo que puede considerarse una cepa "Neutra" ya que no posee el factor zimocida contra cepas sensibles pero resiste la toxina de levaduras zimocidas de colección. En cuanto a las demás pruebas cruzadas notamos como solamente la cepa zimocida de colección *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 738 no tuvo un amplio espectro contra las cepas zimocidas utilizadas ya que no se obtuvo una prueba positiva contra *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587, ni contra *Candida valida*; sin embargo *Kluyveromyces marxianus*, así como *Candida valida* si resultaron zimocidas contra *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 738. También es importante resaltar que *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 si fue zimocida contra *Candida valida* y ésta contra la primera.

2.4.-Comportamiento de la levadura zimocida *C. valida* aislada de pulque frente a levaduras sensibles de colección en suspensiones de levaduras en concentraciones diferentes y en desventaja para la levadura zimocida

Los resultados obtenidos al observar las placas donde se sembraron la mezcla de células de una levadura sensible, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 ó *Candida glabrata* Y55 y la zimocida, *Candida valida* PIB muestran el predominio del crecimiento de la cepa zimocida tanto en las placas sembradas con la mezcla de inóculos de concentraciones del mismo orden y en concentraciones diferentes y en desventaja para la levadura zimocida. Estas observaciones son válidas para los tres bioensayos realizados (Tablas 8, 9 y 10), con una diferencia mínima en la prueba con *Saccharomyces cerevisiae* raza *chevalieri*, en la que siempre se presentó por lo menos una colonia, desde las placas sembradas con los inóculos de concentraciones similares y predominando ya en concentraciones en desventaja para la zimocida. Estas pruebas se realizaron con el objeto de conocer hasta que concentración la levadura zimocida inhibe el crecimiento de una sensible. Se observó que aún en concentraciones muy bajas de la levadura zimocida *C. valida* PIB, ésta sigue predominando sobre la cepa

sensible. Aunque ésta no fue una prueba cuantitativa, por los resultados obtenidos en placa fué evidente el crecimiento sólo de la cepa zimocida, lo que logró distinguirse debido a las diferencias morfológicas coloniales de las levaduras en competencia; ya que la colonia de la zimocida era rugosa y opaca y la de la sensible era lisa y algo brillante

3.- Tolerancia a diversas concentraciones de etanol.

En las pruebas realizadas para determinar la resistencia de las levaduras aisladas, de pulque y aguamiel frente a diferentes concentraciones de etanol (Tabla 11), se observó que las cepas de *Candida valida* aisladas del pulque con el factor zimocida fueron las más resistentes a una concentración del 10 % de etanol ya que a esta concentración presentó un crecimiento normal. En lo que a las otras cepas se refiere, su tolerancia a concentraciones elevadas de etanol fue mucho menor. *Saccharomyces cerevisiae* raza *chevalieri* presentó una cierta resistencia a 10% de etanol, pues su crecimiento a esta concentración fue escaso. En cuanto a las cepas aisladas de aguamiel se observó que resistieron hasta 8% de etanol, lo cual puede resultar lógico ya que la concentración de etanol en el aguamiel es menor que la del pulque. Además en estudios anteriores se ha establecido que la microbiota presente en el aguamiel es sustituida por otra al llevarse a cabo la fermentación de dicho sustrato para producir el pulque, llevándose a cabo una sucesión de microorganismos, predominando en el pulque los fermentativos y oxidativos capaces de tolerar una concentración de etanol hasta de un 9% que es la que presenta esta bebida.

CONCLUSIONES:

Apartir del trabajo realizado se puede concluir que:

1. A) De la microbiota encontrada en pulque se aislaron e identificaron tres géneros de levaduras en los cuales se encuentran: *Candida valida*, *Saccharomyces cerevisiae* raza *chevalieri* y raza *capensis* y *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*. De ellas una levadura del género *Candida valida* se aisló de todas las muestras analizadas, excepto de la muestra 2. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* raza *chevalieri* también se obtuvieron de las muestras de pulque.

B) De las levaduras aisladas de aguamiel se identificaron tres diferentes géneros: *Candida lusitanae*, *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* y *Saccharomyces cerevisiae* raza *capensis*; de las cuales sólo *Candida lusitanae* no había sido reportada con anterioridad como parte de la microbiota de aguamiel.

2. Todas las levaduras aisladas de aguamiel y de pulque, excepto *Candida valida* fueron fermentadoras.

3. Se determinó actividad zimocida en cepas *Candida valida* y *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* aisladas de pulque las que actuaron como cepas aniquilantes frente a las levaduras sensibles de colección: *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 y *Candida glabrata* Y55. También en aguamiel fue positiva la presencia de levaduras zimocidas siendo del género *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* las dos cepas zimocidas aisladas de cada una de las muestras.

4. Los géneros: *Saccharomyces cerevisiae* raza *chevalieri* y *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* aisladas de pulque fueron resistentes a cepas zimocidas de colección, con excepción de *Candida valida* PIB y *Saccharomyces cerevisiae* raza *capensis* las cuales fueron sensibles a la toxina de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587, por lo que las otras cepas pueden considerarse "neutras"; es decir no poseen la toxina zimocida pero sí la resisten.

En cuanto a las cepas aisladas de aguamiel solamente *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* fue sensible a la toxina de la cepa zimocida *Candida valida* PIB aislada de pulque, pero resistente a las cepas zimocidas de colección: *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 738 y *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587; por lo que también en aguamiel encontramos cepas "neutras".

5. *Saccharomyces cerevisiae* raza *chevalieri* P6A resultó ser una cepa interesante porque aunque no fue zimocida contra las cepas sensibles de colección: *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 ni contra *Candida glabrata* Y55, fue resistente frente a levaduras zimocidas de colección: *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 738 y *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 por lo que se le consideró una cepa "NEUTRA"; además de ser fermentadora.

6. Comprobamos que la levadura zimocida aislada del pulque: *Candida valida* PIB, puede ejercer su acción letal sobre levaduras sensibles de colección, aún en concentraciones muy bajas y en desventaja para ella. Por otro lado *Saccharomyces cerevisiae* raza *chevalieri* resistió la acción zimocida de *Candida valida* de PIB, aún cuando se inoculaban en concentraciones similares.

7. Es preciso resaltar la importancia de una cepa "NEUTRA" como *Saccharomyces cerevisiae* raza *chevalieri* y una "ZIMOCIDA" como *Candida valida* aisladas de pulque, ya que éstas podrían ser aprovechadas en fermentaciones comerciales; la primera por ser fermentadora se utilizaría como inóculo, sin temer que éste se vea inhibido por la presencia de levaduras silvestres que sean zimocidas, lo que ocasiona una disminución en la producción de alcohol. La *Candida valida* puede ser utilizada formando parte de un inóculo con una levadura fermentadora y resistente, para disminuir los riesgos de contaminación por levaduras silvestres que puedan producir sabores y aromas indeseables; además es una cepa que resiste altas concentraciones de alcohol por lo que puede estar presente sin que se inhiba su crecimiento.

BIBLIOGRAFÍA CITADA.

- Bortol, A., Nudel, C., Fraile, E., Torres, R., Giuletti, A., Spencer, J.F.T. y 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.
- Cansado, J., Longo, E., Calo, P., Sieiro, C., Velázquez, J.B. y Villa, T.G. 1991. "Role of killer character in spontaneous fermentations from NW Spain: ecology, distribution and significance". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 643-647.
- Cansado, J., Velázquez, J.B., Calo, P., Sieiro, C., Longo, E. y Villa, T.G. 1992. "Characterization of killer-resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from spontaneous fermentations". *FEMS Microbiol. Lett.* 97: 13-18.
- Carrau, F.M., Neirotti, E. y Gioia, O. 1993. "Stuck wine fermentations: effect of killer/sensitive yeast interactions". *J. Ferment. Bioeng.* 76 (1): 67-69.
- Farris, G.A., Mannazu, I. y Budroni, M. 1991. "Identification of killer factor in the yeast genus *Metschnikowia*". *Biotechnol. Lett.* 13 (4): 297-298.
- 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 (1): 70-72.
- Heard, G.M. y Fleet, G.H. 1987. "Occurrence and growth of killer yeasts during wine fermentation". *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (9): 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.

-Kitamoto, H.K., Ohmono, S. y Nakahara, T. 1993. "Selection of killer yeasts (*Kluyveromyces lactis*) to prevent aerobic deterioration in silage making". *J. Dairy Sci.* 76: 803-811.

-Kono, I. y Himeno, K. 1992. "*Kluyveromyces* yeast having killer activity against *Zygosaccharomyces rouxii*". *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* 39 (12): 1135-1139.

-Kreger-van Rij, N.J.W. (ed.) 1984. *The Yeasts: a Taxonomic Study*, 3ª ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.

-Kurzweilová, H. y Sigler, K. 1993. "Factors affecting the susceptibility of sensitive yeast cells to killer toxin K1". *Folia Microbiol.* 38 (6): 524-526.

-Lappe, P.E. 1988. "Estudios etnicos, microbianos y químicos del tesguino tarahumara" (Tesis doctoral). UNAM. México, D.F. pp 46, 105-112.

Lappe, P. y Ulloa, M. 1993. "Microbiología del pulque". En: *Alimentos fermentados indígenas de México*, M. C. Wachter y P. Lappe (eds.). pp. 75-79, UNAM. México, D.F.

-Marquina, D., Peres, C., Caldas, F.V., Marques, J.F., Peinado, J.M. y 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 (3): 163-168.

-Michalcáková, S., Sulo, P., Hapalová, J. y Minárik, E. 1991. "Occurrence and properties of killer strains among Czechoslovakian wine yeasts". *Vitic. Enol. Sci.* 46: 123-126.

-Palpacelli, V., Ciani, M. y 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.S., Carrau, J.L., Serafini, L.A. y Dillon, A.J.P. 1990. "A simple method to detect killer yeasts in industrial systems". *J. Ferment. Bioeng.* 70 (3): 180-181.
- Petering, J.E., Symons, M.R., Langridge, P., 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 (11): 3232-3236.
- Phaff, H.J., Miller, M.W. y Mrak E.M. 1978. *The Life of Yeasts*, 2ª edición. Harvard University Press. Cambridge Massachusetts EUA. pp. 1-28
- Radler, F., Herzberger, S., Schönig, I. y Schwarz, P. 1993. "Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bailii*". *J. Gen. Microbiol.* 139: 495-500.
- Radler, F., y Schmitt, M. 1987. "Killer toxins of yeasts: inhibitors of fermentation and their adsorption". *J. Food Prot.* 50 (3): 234-238.
- Reed, G. Nagodawithana, T.W. 1991. *Yeast Technology*, 2ª edición. Van Nostrand Reinhold. New York, USA.
- Rosini, G. 1989. "Killer yeasts: Notes on properties and technical use of the character". En: *Biotechnology Application in Beverage Production*, C. Cantarelli y G. Lanzarini (eds.). pp. 41-47, Elsevier Applied Science, Londres Inglaterra.
- Salek, A., Schnettler, R. y Zimmermann, U. 1990. "Transmission of killer activity into laboratory and industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* by electroinjection". *FEMS Microbiol. Lett.* 70: 67-72.
- Salek, A., Schnettler, R. y Zimmermann, U. 1992. "Stably inherited killer activity in industrial yeast strains obtained by electrotransformation". *FEMS Microbiol. Lett.* 96: 103-110.

-Wilson, C. y Whittaker P.A. 1989. "Factors affecting activity and stability of the *Kluyveromyces lactis* killer toxin". *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (3): 695-699.

-Young, T.W. 1987. "Killer Yeasts". En: *The Yeasts*, A. H. Rose y J. S. Harrison (eds.). Vol. 2, pp. 131-164, Academic Press, Londres Inglaterra.