

OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LEVADURAS CON INTERÉS BIOTECNOLÓGICO.

Torres García Cynthia Jareth (1) Juan Carlos Torres Guzmán (2).

1 [Lic. en Ingeniería en Alimentos, Universidad de Guanajuato] |[cj.torresgarcia@ugto.mx]

2 [Departamento de Biología, División Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] |[torguz@ugto.mx]

RESUMEN.

El objetivo del trabajo es establecer un medio de cultivo para el crecimiento de la cepa LABGENMOLH01 de *Saccharomyces cerevisiae*, empleada a nivel industrial para la producción de Tequila. Se probaron tres medios de cultivo: medio YPD, medio rico conteniendo azúcar invertido como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno, microelementos y vitaminas. Por último, un medio definido con azúcar invertido, como fuente de carbono, y fuentes inorgánicas de nitrógeno, vitaminas y microelementos. Se realizaron cinéticas de crecimiento, determinando el crecimiento celular. A la biomasa producida, en los tres diferentes medios se les determinó su capacidad de fermentar Jugo de Agave. Los resultados obtenidos muestran que el medio definido, formulado de acuerdo con los requerimientos nutricionales de la levadura publicados en la literatura, es el que menor soporta el crecimiento de la cepa, esta menor capacidad de crecimiento influye negativamente en la fermentación del Jugo de Agave.

Abstract.

The objective of the work is to establish a culture medium for the growth of the *Saccharomyces cerevisiae* LABGENMOLH01 strain, used at industrial level to produce Tequila. Three culture media were tested: YPD medium, rich medium containing invert sugar as carbon source and yeast extract as a source of nitrogen, microelements and vitamins. Finally, a medium defined with invert sugar, as a source of carbon, and inorganic sources of nitrogen, vitamins and microelements. Growth kinetics were realized, determining cell growth. To the biomass produced, in the three-different media, were determined their ability to ferment Agave Juice. The results obtained showed that the defined medium, formulated according to the nutritional requirements of the yeast published in the literature, is the one that supports less the growth of the strain, this lower capacity of growth influences negatively the fermentation of Agave Juice.

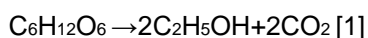
Palabras Clave

Medio de crecimiento; capacidad fermentativa; *Saccharomyces*; biomasa; jugo de Agave.

INTRODUCCIÓN

Fermentación alcohólica.

La fermentación alcohólica comprende toda una serie de reacciones bioquímicas a través de las cuales algunos microorganismos, por medio de un conjunto de enzimas, realizan la transformación de azúcares (como pueden ser por ejemplo la glucosa, la fructosa, la sacarosa, el almidón, etc.) para convertirlos en etanol, dióxido de carbono y energía. La ecuación general de esta reacción es:



Este es un proceso realizado primordialmente por levaduras. El género *Saccharomyces* es el principal responsable de la fermentación alcohólica [2]. *S. cerevisiae* es la especie de levaduras utilizada por excelencia para la obtención de etanol a nivel industrial puesto que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo, tolera altas concentraciones de etanol, produce bajos niveles de subproductos durante el proceso.

Saccharomyces cerevisiae, metaboliza los azúcares, incluso en condiciones aeróbicas, produciendo etanol y dióxido de carbono, fenómeno denominado como efecto Crabtree [3].

Uso a niveles industriales.

S. cerevisiae es utilizada para fermentaciones clásicas en alimentos y bebidas, tales como; panadería, cerveza, vino, bebidas destiladas entre otros [4]. Las principales características que debe tener una cepa de levadura para la producción de alcohol industrial son: capacidad de fermentar rápidamente el medio y producir etanol con un rendimiento próximo al rendimiento teórico. Pocos exigentes en factores de crecimiento, para evitar la adición de vitaminas a los medios industriales. Tener una buena tolerancia al etanol. *S. cerevisiae* es la especie de levaduras utilizada por excelencia para la obtención de etanol a nivel industrial puesto que es un microorganismo de fácil manipulación y

recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo, tolera altas concentraciones de etanol, produce bajos niveles de subproductos durante el proceso de fermentación alcohólica y es osmotolerante.

Los materiales ricos en azúcar y amiláceos se convierten fácilmente en etanol y por lo tanto son reconocidos como las materias primas más factibles para la producción de etanol. Sin embargo, es necesario que las levaduras tengan todos los requisitos específicos para el crecimiento que incluyen: agua, una fuente de carbono, oxígeno/lípidos, una fuente de nitrógeno, iones inorgánicos y factores de crecimiento (vitaminas) [5].

Uno de los productos de la fermentación alcohólica más importante en México es el Tequila, el cual se produce por la fermentación alcohólica de jugo de *Agave tequilana* Weber var Azul, empleando cepas de levadura, principalmente *S. cerevisiae*.

El objetivo de este trabajo es comparar el crecimiento de tres medios de cultivo para la producción de biomasa, de una cepa de *S. cerevisiae* empleada para la producción de Tequila y su capacidad de fermentación en jugo de *Agave tequilana* Weber var. Azul

MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa de *S. cerevisiae* empleada durante el trabajo es la cepa LABGENMOLH01, usada a nivel industrial para la producción de Tequila. Se analizaron tres medios de cultivo. Medio rico **YPD**, conteniendo: extracto de levadura (5 g), peptona de caseína (10 g), y dextrosa (10 g), por cada 500 mL. **Medio 1**, que contiene azúcar invertido (15 g) y extracto de levadura (10 g) por cada 500 mL. **Medio 2**, medio definido, conteniendo azúcar invertido (15g), MgPO₄ (0.375g), KH₂PO₄ (1.75g), (NH₄)₂SO₄ (3.75g), además de vitaminas tales como; Piridoxina B₆ (10 mg), cobalamina (0.12mg), nicotinamida (25mg), ácido fólico (0.4mg), biotina (0.3 mg) e inositol (50mg) y minerales como; FeSO₄ • 7H₂O (0.278g), ZnSO₄ • 7H₂O (0.288g), CuSO₄ • 5H₂O (0.08g), Na₂MoO₄ • 2H₂O (0.242g), CoCl₂ •

6H₂O (0.238g), MnCl₂ · 4H₂O (0.198g), por cada 500 mL.

Se realizaron cinéticas de crecimiento por duplicado, en los tres medios de cultivo, durante 48 h a una temperatura 28 °C, determinando el crecimiento mediante conteo celular con cámara de Neubauer y densidad óptica (D.O) mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm, se tomó muestra por duplicado a las 0 h, 3 h, 6 h, 18 h y 24 h.

Con la biomasa obtenida de los tres medios de cultivo se realizaron fermentaciones en jugo de *Agave tequilana*. Al jugo de Agave a una concentración de 220 g/L, se inocularon con la biomasa obtenida en los distintos medios de cultivo después de 18 horas de crecimiento, incubando a una temperatura de 33°C, tomando muestra a las 0 h, 24 h, 36 h y 48 h; determinando el azúcar consumido mediante la técnica de azúcares reductores directos mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), el método se basa en la elaboración de una solución del jugo de agave fermentado, diluido en agua destilada para después definir la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm [7]. Y determinando el crecimiento mediante conteo celular en cámara de Neubauer.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el propósito de investigar la influencia del medio de cultivo para la obtención de biomasa y su capacidad de fermentación en Jugo de Agave, la cepa LABGENMOLH01, la cual se emplea en la producción de Tequila, se creció en tres medios de cultivo: Un medio rico YPD, un medio con azúcar invertido como fuente de carbono y como fuente de nitrógeno, microelementos y vitaminas: extracto de levadura. Un medio definido, con azúcar invertido como fuente de carbono, y fuentes inorgánicas de nitrógeno, vitaminas y microelementos. Los resultados de la producción de biomasa se muestran en la Figura 1, donde se puede observar que el medio definido es el que produce la menor cantidad de biomasa; mientras que los dos medios ricos: YPD y medio con azúcar invertido y extracto de levadura producen prácticamente el mismo crecimiento.

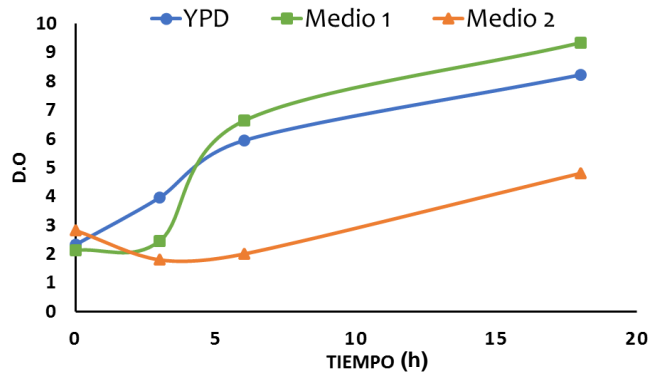


Figura 1: Cinética de crecimiento de la cepa LABGENMOLH01 de *S. cerevisiae* en tres medios de cultivo: YPD, Medio 1 (Azúcar invertido y extracto de levadura); Medio 2 (Medio definido).

Los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento fueron utilizados para la realización de fermentaciones en jugo de Agave, partiendo de la misma cantidad de biomasa obtenida (~0.420 g), y así conocer cuál es el medio donde las levaduras actuarían con mayor actividad fermentativa, consumiendo los azúcares presentes en el jugo de Agave y produciendo etanol.

La realización de las fermentaciones se llevó a cabo en 50 mL con jugo de Agave y la adición de biomasa respectivamente, manteniéndolos a una temperatura de 33°C, tomando muestra para determinar azúcares reductores directos mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y conteo celular con cámara de Neubauer.

La capacidad fermentativa de la biomasa se puede observar en la Figura 2.

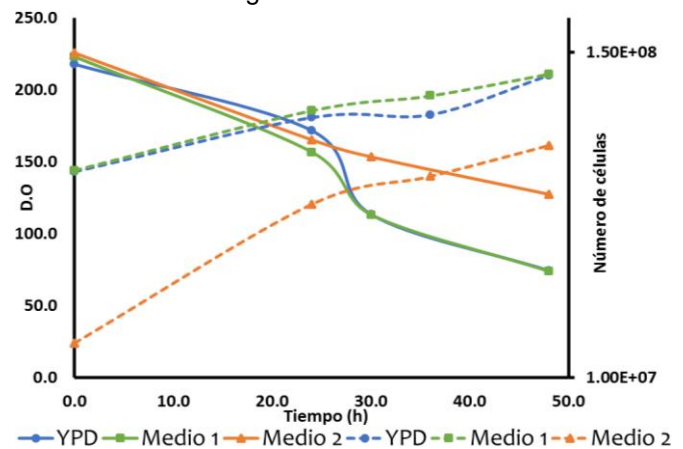


Figura 2: Capacidad fermentativa de la cepa LABGENMOLH01 de *S. cerevisiae* obtenidas de un crecimiento en tres medios de cultivo distintos. Comparando los azúcares reductores consumidos y el número de células presentes en jugo de Agave de las 0h a las 48h.

Los resultados nos muestran que las levaduras obtenidas en medio YPD y en medio 1 (con azúcar invertido y extracto de levadura) fermentan y consumen el azúcar del jugo de Agave prácticamente a la misma velocidad. Sin embargo, la biomasa obtenida en el medio definido, su capacidad de consumo de azúcar es menor, no obstante, el iniciar con la misma cantidad de biomasa.

Este resultado claramente nos indica que el medio de cultivo en donde se producen las levaduras es muy importante en su capacidad fermentativa. Como es de esperar, los medios ricos tanto el YPD, como el medio con azúcar invertido como fuente de carbono y extracto de levaduras como fuente de nitrógeno y oligoelementos, son los que producen mayor cantidad de biomasa. El medio definido, a pesar de que cuenta con las cantidades descritas en la literatura como las que permiten una buena producción de biomasa, no fueron capaces de crecer en la misma proporción. Este retraso en el crecimiento influye negativamente en su capacidad de fermentar jugo de Agave, ya que como se puede observar hay una disminución en el consumo de azúcares provenientes del jugo de Agave a las 48 horas de fermentación.

El sustrato presente en el agave, que es utilizado por la levadura para producir el tequila es la inulina. La inulina (es un compuesto parecido al almidón formado por unidades de fructosa y glucosa y constituye una de las materias primas de reserva de las piñas del agave) no es directamente fermentable, pero se transforma en fructosa y glucosa por hidrólisis ácida durante la cocción, en el proceso de producción de Tequila. En esta etapa, además de hidrolizar la inulina, algunos azúcares son caramelizados y se producen compuestos que contribuyen al aroma y sabor del Tequila. Sin embargo, en esta etapa también se producen algunos otros compuestos, mediante reacciones de Maillard, como furfurales; que limitan la capacidad de crecimiento de algunas levaduras. De igual manera, el Jugo de Agave tiene una baja cantidad de nitrógeno y la concentración de azúcar genera estrés osmótico. Todas estas condiciones provocan un ambiente hostil para el desarrollo de las levaduras. Por tanto, es probable que la cepa tequilera LABGENMOH01 tenga una menor capacidad de fermentar Jugo de Agave al ser previamente crecida en el medio definido, en comparación a un medio rico, al no disponer de

todos los requerimientos nutricionales necesarios y suficientes. Motivo por el cual es necesario el rediseño del medio de cultivo 2 que logre una mejor producción de biomasa, y no afectar su capacidad fermentativa.

CONCLUSIONES

Con los datos obtenidos de este experimento, se observa que la cepa LABGENMOH01 al ser sometida a un crecimiento en un medio definido, cumpliendo con los requerimientos nutricionales necesarios publicados en la literatura, no se desarrolla de la manera deseada, pues comparándolo con los medios ricos, las levaduras en este medio crecieron en menor proporción, afectando esto posteriormente en su capacidad fermentativa. Por lo cual se concluye que hay la necesidad de reformular el medio definido, al no cumplir con los requerimientos necesarios para fermentar en jugo de Agave.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a la Universidad de Guanajuato, por brindar la oportunidad de trabajar en este tipo de programas, a la DCNyE en el departamento de Biología de la misma universidad por otorgarnos el material necesario para la investigación, a mi asesor Dr. Juan Carlos Torres Guzmán aceptando que colaborara en este trabajo y aclarar todas aquellas dudas que tuve durante el proceso, a los que trabajan en el laboratorio y todos aquellos que me ayudaron en determinado momento, así como mi madre y familia en general, que nunca dudaron de mí.

Se agradece a la Universidad de Guanajuato por el apoyo institucional para fortalecer la excelencia académica convenio 89/2016. De igual manera el apoyo financiero por parte de la Secretaría de Innovación Ciencia y Educación Superior (SICES) proyecto CFINN-000079.

REFERENCIAS

- [1] Piña Torres, I. H. (2013). *Generación de cepas de Saccharomyces cerevisiae con mayor eficiencia fermentativa mediante evolución dirigida* (tesis de licenciatura). Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.
- [2] Barnett, J. A. (2003). Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research. *Microbiology*, 149, pp.557–567. doi:10.1099/mic.0.26089-0.
- [3] Vieira, E. D., Stuppiello, A. M & Andrietta, S. (2013). Yeast biomass production: a new approach in glucose-limited feeding strategy. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, (2), pp.551-558. ISSN 1678-4405.
- [4] Camacho, R. L., Pérez, G. N & Pérez, R., R. (2003). Factors affecting the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture and in solid sate fermentation. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2 (5), 531-542. ISSN 1579-4377.
- [5] Pereira, F., Guimarães, P., Teixeira, J. & Domingues, L. (2010). Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs. *Bioresource Technology*, 101, 7856–7863. doi:10.1016/j.biortech.2010.04.082.
- [6] Ferreyra, M., Schwab, M., Gerard, L. & Cristina Verónica Davies, C. (2014). Nutritional requirements of a *Saccharomyces cerevisiae* starter culture used in the elaboration of wine from orange. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, (34), 38-42.
- [7] Arriata J., M. (2009). *Diversidad genética de levaduras involucradas en la fermentación del mezcal tamaulipeco*. (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, Tamaulipas, México.