

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



Aislamiento y Caracterización de Levaduras de Muestras Semiáridas
en Coahuila para la Producción de Etanol utilizando Aguamiel de
Agave salmiana.

Por:

LORENA ELIZABETH CHÁVEZ ROMERO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Aislamiento y Caracterización de Levaduras de Muestras Semiáridas
en Coahuila para la Producción de Etanol utilizando Aguamiel de
Agave salmiana.**

T E S I S

Presentada por

LORENA ELIZABETH CHÁVEZ ROMERO

y que somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial
para obtener el título profesional de

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

A P R O B A D A

Dr. Mario Alberto Cruz Hernández
Presidente

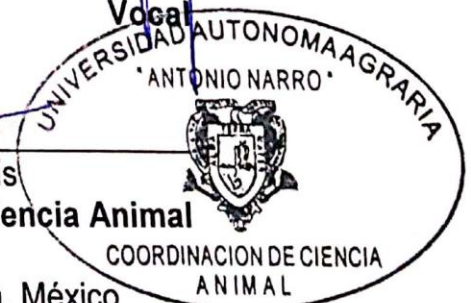
Dra. Ruth Elizabeth Belmares Cerda
Vocal

Q.F.B. María del Carmen Julia García
Vocal

Dra. María Elena Castelo Mejía
Vocal


Dr. José Dueñez Alarís
Coordinador de la División de Ciencia Animal

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México



Diciembre de 2019

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Aislamiento y Caracterización de Levaduras de Muestras Semiáridas en
Coahuila para la Producción de Etanol utilizando Aguamiel de Agave
salmiana.**

TESIS

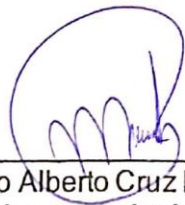
Presentada por

LORENA ELIZABETH CHÁVEZ ROMERO

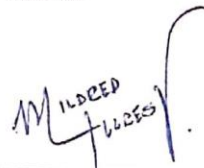
y que somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para
obtener el título profesional de

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Fue dirigida por el siguiente comité:



Dr. Mario Alberto Cruz Hernández
Asesor principal



M.C. Mildred Inna Marcela Flores Verastegui
Co-asesor



Dra. Ruth Elizabeth Belmares Cerda
Co-asesor

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre de 2019

AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

A Dios por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía en durante todo mi periodo de estudio.

A Mis Padres por ser los principales promotores de mis sueños, gracias a ellos por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas, gracias a mi madre por su amor y cariño inigualable; gracias a mi padre por siempre desear y anhelar siempre lo mejor para mí, gracias por cada consejo y por cada una de sus palabras que me guiado hasta estos momentos de mi vida.

A La M.C. Mildred Flores Verastegui por haber confiado en mí, aconsejarme y apoyarme durante mi estancia en la Universidad.

AL Dr. Mario Alberto Cruz Hernández, Por haber enriquecido mis conocimientos, así como haber brindado una valiosa amistad y aconsejarme académicamente.

A La Q.F.B. Carmen Julia por ser haberme brindado su amistad y ser uno de mis asesores en este trabajo de tesis.

A la M. C Cinthya Luevano por su apoyo técnico en la elaboración de este proyecto.

A Mis Amigas M. Fernanda Valdés, Montserrat Bravo, Ana Ríos, Mónica Garza por Nuestras experiencias juntas, conviviendo, aprendiendo de cada aventura y risas, me han permitido estar cerca de ustedes, gracias por todo.

DEDICATORIAS

Dedico esta Tesis:

A Mis Padre Luis Enrique Chávez Varo y Verónica Romero Hernández por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Me formaron con reglas y algunas libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos.

A mi Hermano Luis Rodolfo, por ser el Mejor compañero de vida, por la confianza y por siempre creer en mí, por poder tenerlo como hermano lo cual me hace ver que siempre tendré una persona ahí a mi lado.

Hoy es el único día que puedes darlo todo de ti mismo. Por lo tanto, no pienses en el pasado ni en el futuro. Ama, vive y persigue tus sueños.
M.T.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIAS	v
INDICE DE FIGURAS	viii
INDICE DE TABLAS	ix
Abstrac.....	10
Resumen.....	11
Introducción.....	12
OBJETIVOS.....	14
<i>Objetivo General</i>	14
<i>Objetivos Específicos</i>	14
JUSTIFICACIÓN	15
ANTECEDENTES	16
<i>Aspectos generales</i>	16
<i>Agave spp.</i>	17
Domesticación y reproducción de <i>Agave spp.</i>	18
Distribución y producción de <i>Agave spp.</i>	18
<i>Usos y aplicaciones tradicionales de <i>Agave spp.</i></i>	20
<i>Aguamiel</i>	21
Fructano	22
Saponinas	23
Otros compuesto del aguamiel	23
<i>Levaduras productoras de etanol</i>	26
<i>Fermentación</i>	28
Fermentación Alcohólica	29
<i>Morfología de las levaduras</i>	30
METODOLOGÍA.....	32
<i>Preparación de los medios de cultivo</i>	32
<i>Activación de cepas de levadura</i>	32

<i>Purificación</i>	32
<i>Identificación Microscópica.</i>	33
<i>Cultivo líquido y conservación con leche descremada</i>	33
<i>Preparación del aguamiel</i>	33
<i>Conteo de UFC</i>	34
<i>Fermentación de aguamiel para la obtención de etanol.</i>	35
pH	36
°Bx.....	36
Azúcares totales	37
Determinación de Etanol	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
<i>Activación de los Microorganismos</i>	38
<i>Identificación de cepas de levaduras colección UAAAN-DCTA</i>	38
<i>Fermentación de Agua miel</i>	40
pH	42
°Brix.....	43
<i>Producción de Etanol</i>	44
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFÍA	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo morfológico del Agave spp.....	17
<i>Figura 2: Distribución regional de las principales tipos de agave aprovechados en México.</i>	18
Figura 3 : aguamiel presente en el cajete realizado en el tallo del agave.....	21
Figura 4: Ruta Embden Meyerhof Parnas para la utilización de la glucosa.	28
Figura 5: primer paso Dilución para el conteo UFC con la cámara de Neubauer	34
Figura 6: Vaciado en Placa y Extendido.....	35
Figura 7: Cuenta de colonias.....	35
Figura 8: Métodos para medir pH.....	36
Figura9: Modo de empleo de Refractómetro manual para la cuantificación de °Bx.....	36
Figura 10: Muestras Macro y Micro de Las cepas: a) L1, b) L2, c) L3	39
Figura 11: Muestras Macro y Micro de las cepas: d) L4, e) L5, f) L6, g) L7	40
Figura 12: Cuantificación de azúcares totales en Aguamiel. Las cantidades encontradas se muestran en g/mL	41
Figura 13: monitoreo de pH durante los días a evaluados de las 7 diferentes cepas.	42
Figura 14: Monitoreo de °Brix de las diferentes cepas de levaduras a evaluar en los dos días.	43
Figura 15: Comparaciones de la producción de etanol de 7 muestras en ambos tiempos. Las cantidades obtenidas de etanol se expresan como %.....	44

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Área de siembra, cosecha, producción y precios de Agave spp	20
Tabla 2 Principales Aplicaciones y usos de la planta de agave.....	20
Tabla 3: Composición química y características fisicoquímicas del aguamiel procedente de diferentes especies de Agave.....	24
Tabla 4: Principales microorganismos hallados en el aguamiel.....	26
Tabla 5: Material para la formulación de Medio YPD.	32

Abstrac

Yeasts are widely distributed in nature, their habitats can be not only the upper layers of the soil, but also many organic materials, especially those of vegetable origin that contain carbohydrates. In the semidesert areas of Mexico there is a great diversity of plants that belong to the Agavaceae family and one of these can be found in the semi-desert of Coahuila. Of the diverse natural sources with great potential of industrial applications is the *Agave salmiana* also known as “maguey pulquero”. The exploitation of mead can be based on the wide range of nutraceutical compounds that contain such carbohydrates, especially oligosaccharides that function as prebiotics and natural antioxidants, which can be used in the fermentation industry. The samples for Aguamiel obtained of Guadalupe Victoria ejido were translated to laboratory in boxes freeze. The plates with YEPD agar used for first step to yeast isolates and incubated at 30°C for 72 h, in the next step was inoculated in a liquid medium for yeast production, after which a purification and conservation process for maintained ready used. The identification of these microorganisms was done in order to identify them microscopically and make the count of viable cells, in order to make the measurement of ethanol produced by the isolated yeasts. Seven yeast strains were obtained, which were identified as characteristic rounded and others a bit elongated, with a greater amount. The results in the viability assay obtained blue and less white cells, which shows that viable for ethanol production. The fermentation was using aguamiel with substrate. The need for new alternatives for the production of ethanol presents the use of these yeasts obtained from the semi-desert due to their biotechnological characteristics.

Keywords: Ethanol, yeasts isolation, Semiarid of Coahuila

Resumen

Las levaduras están ampliamente distribuidas en la naturaleza, sus hábitats pueden ser no solo capas superiores del suelo, sino también muchos materiales orgánicos, especialmente aquellos de origen vegetal que contienen carbohidratos. En las zonas semidesérticas de México existe una gran diversidad de plantas que pertenecen a la familia Agaváceae y una de estas puede encontrar en el semidesierto de Coahuila. De las diversas fuentes naturales con gran potencial de aplicaciones industriales está el Agave salmiana, también conocido como “maguey pulquero”. La explotación de hidromiel se puede basar en la amplia gama de compuestos nutracéuticos que contienen tales carbohidratos, especialmente oligosacáridos que funcionan como prebióticos y antioxidantes naturales, que pueden usarse en la industria de la fermentación.

Las muestras de Aguamiel obtenidas del ejido Guadalupe Victoria fueron trasladadas al laboratorio en cajas congeladas. Las placas con agar YEPD se usaron para el primer paso para aislar las levadura y se encubaron a 30°C durante 72 horas, en el siguiente paso se inoculó en un medio líquido para la producción de levadura, después de lo cual se mantuvo en un proceso de purificación y conservación para mantener listo para usa. La identificación de estos microorganismos se realizó con el fin de identificarlos microscópicamente y hacer el recuento de células viables, con el fin de realizar la medición de etanol producido por las levaduras aisladas.

Se obtuvieron 7 cepas de levadura. Que se identificaron como características redondeadas y otras un poco alargadas, con una mayor cantidad. Los resultados en el ensayo de viabilidad obtuvieron glóbulos azules y menos blancos, lo que demuestra que es viable para la producción de etanol. La fermentación se realizó con aguamiel como sustrato.

La necesidad de nuevas alternativas para la producción de etanol presenta el uso de estas levaduras obtenidas del semidesierto debido a sus características biotecnológicas.

Palabras clave: Etanol, Aislamiento de levaduras, Semiárido de Coahuila.

Introducción

En las áreas semidesérticas de México existe una gran diversidad de plantas que pertenecen a la familia *Agavaceae* y una de estas podemos encontrarla en el semidesierto de Coahuila. De las diversas fuentes naturales con gran potencial de aplicaciones industriales se encuentra el maguey pulquero también conocido como *Agave salmiana*. La explotación del aguamiel puede basarse en la amplia gama de compuestos neutracéuticos que contienen tales como carbohidratos, especialmente oligosacáridos que funcionan como prebióticos y antioxidantes naturales, los cuales pueden ser utilizados en la industria fermentación.

Las levaduras están ampliamente distribuidos en la naturaleza, sus hábitats puede ser no solo las capas superiores del suelo, sino también muchas materias orgánicas, sobre todo los de origen vegetal que contienen hidratos de carbono, también se pueden aislar del suelo de viñedos y huertos, superficies de frutas dulces como uvas, manzanas, limón, etc., de las hojas y otras partes de la planta, así mismo, se puede aislar de las frutas y verduras, en los que se producen la fermentación del azúcar con desprendimiento de CO₂ y liberación de etanol. ^(1,2,3)

Las bebidas destiladas son las descritas generalmente como aguardientes y licores; sin embargo la destilación, agrupa a la mayoría de las bebidas alcohólicas que superen los 20° de carga alcohólica. Generalmente los materiales de los que se parte para la elaboración de bebidas destiladas, son alimentos dulces en su forma natural como la caña de azúcar, la miel, leche, frutas maduras, etc. y aquellos que pueden ser transformados en melazas y azúcares. Todos estos elementos de los que se parte contienen agentes activos que transforman naturalmente en alcoholes ⁽³⁾

Los procesos de fermentación requieren en general una serie de operaciones unitarias cuyo objetivo es la conversión de un sustrato dado (fuente de carbono) en un producto final, utilizando un microorganismo como catalizador. Estas operaciones unitarias pretenden tanto el cubrir los requerimientos nutritivos

necesarios para el crecimiento y la formación de productos, como el control del medio ambiente para la optimización del proceso.⁽⁵⁾

El proceso de producción y excreción de etanol, así como los factores que lo regulen, están por ser aclarados con el conocimiento de los aspectos fisiológicos y genéticos en la producción de etanol por las células de levaduras.⁽⁶⁾ *Sacharomyces cerevisiae* es la levadura más utilizada en dicho proceso; sin embargo, existen diferencias entre las especies y las cepas respecto a las condiciones en que logran su mayor rendimiento.^(7,8); se considera que para ello la cepa debe tener buena velocidad de fermentación y deberá ser tolerante a elevadas concentraciones de glucosa y de etanol.^(9,10,11)

En base a lo anterior se pretende realizar un estudio con cepas de levaduras de muestras semiáridas de Coahuila en aguamiel de *A. salmiana* para la producción de etanol.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Aislar levaduras de muestras del semidesierto de Coahuila con capacidad de producir etanol utilizando aguamiel como sustrato.

Objetivos Específicos

- Activar las cepas de levaduras pertenecientes a la colección UAAAN-DCTA.
- Identificar Microscópicamente las levaduras para descartar contaminación.
- Evaluar mediante fermentación líquida utilizando aguamiel como sustrato para la producción de etanol.
- Seleccionar las cepas que presentaron mayor producción de etanol.

JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo es realizado con el fin de darle al agua miel un nuevo enfoque tecnológico en la industria alimentaria ya que En la actualidad, son pocos los estudios de la caracterización química de este subproducto del Agave, causando una limitación para proponer las posibles opciones de empleo para fines alimentarios, nutracéuticos o medicinales. Según lo reportado por algunos autores el aguamiel es una bebida de sabor dulce, ácida o ligeramente alcalina rica en proteínas y carbohidratos como fructosa, glucosa y sacarosa por lo cual este producto natural resultaría ser un buen candidato para ser empleado en la industria de la fermentación.

El contenido de carbohidratos en los jugos del maguey determina el rendimiento y la calidad del producto terminado, lo cual depende de los factores como fracción estructural de la planta.

En comparación con la cantidad de azúcares contenidos en el maguey *tequilana weber* y *salmina* es significativo puesto que *tequilana weber* contiene una mayor cantidad.

ANTECEDENTES

Aspectos generales

De entre toda la variedad de plantas que habitan en el continente americano, el maguey o agave (*Agave spp.*) es una de las más aprovechadas por los humanos desde tiempos precolombinos debido a que posee cualidades morfológicas y fisiológicas únicas que le confiere una gran adaptabilidad. Esta planta habita tanto regiones con climas secos y húmedos como suelos pobres de nutrientes y altitudes mayores a los 2000 msnm, estas localidades se pueden encontrar en toda Norteamérica, región donde se concentra la mayoría de las especies de agave. Este tipo de ambientes se encuentran son especialmente abundantes en la altiplanicie de México, país donde desde tiempos prehispánicos hasta hace menos de un siglo, el agave era utilizado como fuente de una de las bebidas más consumidas: el pulque. Esta bebida que se obtiene de la fermentación espontánea del aguamiel a través de un consorcio microbiano requiere de un extenso proceso que va desde el corte o capado de las hojas del agave, la elaboración de la cavidad o cajete y recolección del líquido secretado llamado aguamiel, misma que se deja fermentar en contenedores para posteriormente venderse. Debido a que actualmente ha disminuido el consumo de pulque fresco se ha reducido considerablemente, se han optado por alternativas como la elaboración del pan de pulque, la obtención de microorganismos del sedimento del pulque o, el aprovechamiento del aguamiel como sustrato en procesos biotecnológicos por su alto contenido nutricional con la finalidad de obtener enzimas y metabolitos de interés industrial también, se considera a esta savia como una posible bebida funcional debido a sus efectos benéficos al organismo. Por todo esto, el objetivo de este artículo de revisión es presentar la información más recientes que se tiene sobre el aguamiel y su fermentado, así como sensibilizar al lector sobre la necesidad de generar más información a través de la investigación científica acerca de esta savia y su potencial en las diversas ramas de la salud y la biotecnología.⁽¹²⁾

Agave spp.

La planta de agave es conocida en Latinoamérica, principalmente en México como “magüey”. Esta planta puede ser hallada en todo el territorio mexicano, en donde se alberga más del 75% de las especies de este género, no obstante, esta planta se distribuye ampliamente en todo el continente americano.⁽¹²⁾

El agave por su clasificación taxonómica, se separa en dos géneros *Litsea* y *Agave* que cuentan con 54 y 82 especies respectivamente. Al subgénero *Agave* lo integran 12 secciones, 82 especies, 21 subespecies y 23 variedades, dando un total de 197 taxones, sin embargo, las especies donde se puede extraer el aguamiel para su aprovechamiento son contadas.⁽¹²⁾

El agave (Figura 1) está clasificado como una planta monocárpica, debido a que florece solamente una vez en su vida. Pasado este proceso de floración la planta muere. Las hojas, denominadas regionalmente como “pencas” están distribuidas de manera circular alrededor del tronco o piña dando una forma tipo roseta. Las pencas son de color verde o amarillo; de cuerpo grueso y carnoso y terminan con una punta afilada o espina apical. Debido a su estructura e interacción con el medio, esta planta puede adaptarse fácilmente a las condiciones ambientales con suelos pobres en nutrientes como regiones montañosas o rocosas que superen los 2500 msnm o planicies y zonas cercanas al nivel del mar. El tipo de clima donde esta planta se desarrolla de manera favorable es en zonas donde escasea el agua, principalmente en zonas áridas o semiáridas.⁽¹²⁾

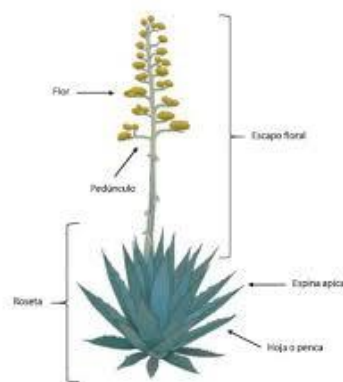


Figura 1. Desarrollo morfológico del *Agave spp.*.

Domesticación y reproducción de *Agave spp.*

Tras más de 3000 años de interacción con el ser humano, la domesticación del agave ha dado como resultado variaciones fisiológicas y morfológicas importantes; como la planta de la especie *A. salmiana* la cual ha desarrollado mayor tamaño en la roseta y ha reducido sus estructuras de protección mecánica. La especie con mayor grado de domesticación fue la encontrada en linderos de cultivos agrícolas, el *A. mapisaga*, con dientes pequeños y rosetas grandes. La menos domesticada, como el *A. macroculmis*, se caracteriza por tener plantas pequeñas con espinas y dientes grandes. La manera más común de su reproducción es la vía asexual, por medio de hijuelos del rizoma de la planta, seguida de la vía sexual, la cual es la más presente en especies que se desarrollan de manera silvestre, esta última da mayor resistencia genética a la planta, debido a la polinización cruzada realizada por insectos.⁽¹²⁾

Distribución y producción de *Agave spp.*

En la (Figura 2) se presenta la distribución geográfica en la República Mexicana de los tres principales tipos de agave que se aprovechan para la producción de bebidas alcohólicas (tequila, mezcal y pulque). En la región occidente de México que comprende los estados de Jalisco, Michoacán, Guanajuato y Nayarit se cultiva en su mayoría el agave tequilero, el cual es mayormente *Agave tequilana* (Weber) y es aprovechado para la elaboración del tequila, bebida altamente apreciada a nivel mundial.⁽¹²⁾



Figura 2: Distribución regional de las principales tipos de agave aprovechados en México.

Otra bebida alcohólica característica de México es el mezcal, el cual se obtiene del agave mezcalero teniendo a especies como *A. angustifolia*, *A. esperrima* Jacobi, *A. weberi* Cels., *A. patatorum* y *Agave salmiana* (NOM-070-SCFI-1994), siendo Oaxaca y Guerrero los principales productores de mezcal. En el sur-sureste, principalmente Chiapas, Quintana Roo y Yucatán se encuentran *Agave sisalana* y *A. fourcroydes* los cuales son empleados principalmente para la elaboración de fibras y textiles.⁽¹²⁾

Por último, la región centro y norte que va desde las sierras veracruzanas y poblanas hasta las planicies coahuilenses y duranguenses se presenta en abundancia el agave forrajero o pulquero que son aprovechados para la extracción del aguamiel, que tras ser fermentado se obtiene el pulque.⁽¹²⁾

Las variedades de la sección *Salmianae* más utilizados para producir aguamiel y por ende el pulque son: *Agave macroculmis*, *A. mapisaga*, *A. mapisaga* var. *Lisa*, *A. salmiana*, *A. angustifolia*, *A. ferox*, *A. salmiana* subsp. incluyen otras variedades para la obtención de aguamiel como: *A. atrovirens* Karw., *A. hookeri*, *A. americana* y específicamente para el Estado de México incluyen: *A. teometl* Zucc., *A. weberi* Cels., *A. altissima* Jacobi., *A. compliala* Trel., *A. gracillispina* Englem., *A. malliflua* Trel., y *A. mapisaga* Trel. Hay que mencionar que la planta *Agave salmiana* var. *salmiana* es la más adecuada para la producción del pulque debido a su alta aceptación entre los consumidores.⁽¹²⁾

En la Tabla 1 se muestran los principales indicadores de la siembra, cosecha y producción del agave producido en México durante los últimos 7 años, donde durante la última década la producción de esta planta presentó un aumento del 25.45 % del 2008 hasta el 2014 con casi 2.5 millones de toneladas, lo que representa un incremento mayor al 85 %, demostrando el interés sobre esta planta. Este interés también se ve reflejado en el precio por tonelada que se manejó en 2014 que cuadruplica su valor con respecto a años pasados. Cabe destacar que si bien su producción va en aumento, las áreas de siembra se están reduciendo en un 24.21 % de 2008 a 2014 en parte debido a los largos tiempos de maduración que la planta requiere para poder ser aprovechada enteramente, por lo

que un cultivo más sustentable y organizado garantizaría que no haya desabasto o escases de esta planta (SIAP, 2015).⁽¹²⁾

Tabla 1 Área de siembra, cosecha, producción y precios de *Agave spp*

Año	Área sembrada (Ha)	Área cosechada (Ha)	Producción (ton)	Rendimiento (ton/Ha)	Precio (\$/ton)
2008	181,575.15	19,032.14	1,795,078.20	94.32	1,476.05
2009	165,475.10	15,321.47	1,197,943.03	78.19	1,086.32
2010	162,388.89	15,880.20	1,246,790.13	78.51	1,013.21
2011	165,310.38	19,731.10	1,703,852.61	86.35	1,132.30
2012	137,625.27	19,876.07	1,686,337.41	84.84	1,258.54
2013	128,133.28	23,697.11	1,899,735.14	80.17	1,712.51
2014	120,339.51	27,689.34	2,408,884.28	87.00	4,208.27
2015	108,119.83	21,731.41	1,846,345.07	84.96	4,337.73

Fuente: SIAP (2015).

Usos y aplicaciones tradicionales de Agave spp.

Antes del arribo europeo a Mesoamérica, las civilizaciones presentes en esta región supieron del valor de estas plantas aprovechando cada parte de la misma para diversas tareas en su día a día, tanto para el consumo como para la edificación de casas las cuales hasta el día de hoy siguen realizando. En la (tabla 2) se muestran las principales aplicaciones y usos de esta planta.

Tabla 2 Principales Aplicaciones y usos de la planta de agave.

Usos	Producto	Parte de la planta
Alimentación	Azúcar, Pan de pulque	Piña
	Guisos, Dulces	Flores
	Mixiote, Gusanos blancos y rojos	Hojas
Bebidas	Aguamiel, Atole, Pulque	Piña
	Mezcal, Tequila	
	Vinagre	
	Jarabe	
Agrícola	Cerca delimitante, Inhibidor de la erosión	Planta entera Hojas
	Composta o Fertilizante	
Otros	Celulosa para papel, Producción de etanol, Glucósidos	Hojas y fibra
	Producción de saponinas	Piña

Fuente: Centro de Propagación de Agave del Estado de Guanajuato.

Históricamente, la aplicación principal del agave es la elaboración de bebidas alcohólicas, precedidas por una fermentación tanto controlada como espontánea. Bebidas como el tequila o el mezcal, son obtenidas tras la fermentación controlada de los azúcares obtenidos tras la cocción y estrujado de la piña o tallo del agave. Otra bebida alcohólica con menor grado de consumo es el pulque. (12)

Aguamiel

La savia que excreta el agave tras ser cortadas las pencas céntricas del tallo se le denomina como aguamiel (Figura 3). Esta savia es un líquido translúcido que llega a tener un color ámbar, de un pH neutro y con un ligero olor herbal cuando se encuentra recién secretado. Esta constituido principalmente por agua, azúcares, proteínas, vitaminas y sales minerales.

La recolección del aguamiel se realiza dos veces al día normalmente en la mañana y en la tarde, donde el cajete o cavidad se raspa después de recolectar la savia con la finalidad de estimular la secreción de la misma. Determinando que la producción inicial promedio de aguamiel es de 0.4 L por planta en un día recién capada la planta. Esta producción llega a alcanzar volúmenes de 4-6 L al día en los primeros dos meses generando entre 500-1000 L. Especies como *A. atrovirens* y *A. salmiana* llegan a producir 1500 L. Sin embargo, estos volúmenes comienzan a decrecer hasta obtener diariamente 0.4 L en el cuarto o sexto mes después del capado.



Figura 3 : aguamiel presente en el cajete realizado en el tallo del agave

Fructano

Uno de los polisacáridos más estudiados del aguamiel y pulque son fructanos (agavinas y levanos). Este polisacárido es derivado de la sacarosa conformado por varias unidades de fructosa y un residuo común de glucosa. Este polisacárido es sintetizado por una amplia gama de bacterias de diferentes fisiologías, un número limitado de hongos y en algunas especies de plantas pertenecientes a las familias monocotiledóneas y dicotiledóneas reportaron la presencia de fructanos tipo agavinas en el aguamiel de *A. atrovirens*, empero se ha reportado la presencia de fructano en algunas especies de agave desde la década de los 50's y 70's. Este compuesto llamo la atención de los investigadores con la finalidad de ver sus posibles aplicaciones en la industria. El término abarca tanto los oligosacáridos como polisacáridos que tienen principalmente residuos de fructosa. Los fructanos sintetizados en la naturaleza son los azúcares no reductores y solubles en agua que se encuentran desde una hasta mil unidades de fructosas unidas a la molécula de sacarosa precursora.

En los agaves, durante la fotosíntesis que realizan, se fija el dióxido de carbono mediante el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), del cual el principal subproducto que se obtiene son los fructanos. Estos fructanos pueden ser clasificados en función del tipo de enlace fructosil, siendo tipo inulina si poseen un enlace β -2,1 y tipo levanos si el enlace es β -2,6. ⁽¹²⁾

Los fructanos son altamente solubles en agua, esto les confiere propiedades osmóticas dependiendo del grado de polimerización de la molécula en las vacuolas de las células de la planta. La hidrolisis interna de los fructanos esta mediada por las enzimas endoinulinasas, estas generan fructanos con diferentes grados de polimerización lo que permite a la planta osmoregular su contenido de agua, consiguiendo tolerar las bajas temperaturas durante el invierno y desarrollarse en regiones donde escasea el agua. La síntesis de estos carbohidratos en las plantas de agave parece ser inducido por la acumulación de sacarosa en las vacuolas celulares, algo común en las plantas monocotiledóneas, donde estas

moléculas son el sustrato para las enzimas sacarosa: sacarosa fructosiltransferasa (1-SST), la cual transfiere las moléculas de fructosa a otra sacarosa formando un enlace β -2,1, y la enzima 6-fructosiltransferasa (6-SFT) en la formación de la 1- y 6-kestotriosa, respectivamente. Una segunda enzima llamada fructano: fructano 1-fructosiltransferasa permite la elongación de la cadena de fructosa dando lugar al fructano.

Saponinas

Las saponinas, son glucósidos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, incluyen un grupo diverso de compuestos caracterizados por su estructura la cual contiene una aglicona esteroideal o triterpenoide y una o más cadenas de azúcar. Su función biológica reside en sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas. Su consumo confiere propiedades benéficas a la salud, como reducir niveles de colesterol en sangre, antiinflamatorio, inmunoestimulante y antiparasitante, todas determinadas sobre modelos animales. El género *Agave* no es la excepción, en el cual especies como *A. Americana* y *A. salmiana* presentan saponinas derivadas de la kammogenina, manogenina, gentrogenina y hecogenina en concentraciones de 179.0 - 478.3 $\mu\text{g/g}$ de aguamiel, respectivamente; concentración que tiende a disminuir en el aguamiel conforme el capado del agave se realice en periodos previos a la maduración de la planta.⁽¹²⁾

Otros compuesto del aguamiel

Más del 95 % de los sólidos solubles procedentes del aguamiel son carbohidratos, de los cuales 55.6-90 % son reportados como frútanos en algunas especies de *Agave*.

La Tabla 3 muestra el contenido de azúcares dentro de los sólidos solubles de la savia obtenida de varias especies de agave, donde se puede percatar que en función de la especie de *Agave* varia el contenido de carbohidratos, en este caso, *Agave salmiana* es la especie que presenta mayor cantidad de fructanos y de

sacarosa, los cuales son azúcares altamente fermentables por microorganismos. Un comportamiento muy similar entre las tres especies de Agave es la cantidad de glucosa donde oscila en un promedio de 3 %, así como las proteínas las cuales no superan el 1 %, empero esta es altamente aprovechada por los microorganismos para su desarrollo. Cabe destacar que estos valores pueden variar según el ambiente donde se desarrolla la planta.

Tabla 3: Composición química y características fisicoquímicas del aguamiel procedente de diferentes especies de Agave.

Parámetro	Agave mapisaga (Ortiz-Basurto et al., 2008)	Agave atrovirens (Romero-López et al., 2015)	Agave salmiana (Santos-Zea et al., 2016)
pH	4.50	6.29	4.63
°Brix	ND	11.10	75.53*
Fructosa (%)	3.73	3.63	5.22
Sacarosa (%)	1.01	1.43	4.69
Glucosa (%)	3.05	3.18	3.48
FOS (%)	1.17	1.72	ND
Proteínas (%)	0.35	0.39	0.97

*Valor obtenido del aguamiel concentrado.

El 0.26-0.30 % de los sólidos solubles son aminoácidos los cuales son comunes en el agave. Siendo el ácido glutámico (20.08 mg/100 g), la valina (16.35 mg/100 g), la fenilalanina (10.03 mg/100 g), el ácido aspártico (7.91 mg/100 g) y la prolina (7.38 mg/100 g) los más abundantes y algunos de ellos ser precursores en algunas reacciones metabólicas de la propia planta.

Las cantidades presentes de aminoácidos esenciales para consumo humano (lisina, fenilalanina, isoleucina, leucina, valina y metionina) puede llegar a considerar al aguamiel como una fuente alternativa y económica de aminoácidos.⁽¹²⁾

Se detectaron en el aguamiel en muestras de A. mapisaga ácido γ -amino butírico (GABA) en una concentración de 26 mg/mL, este aminoácido no proteico está involucrado en la regulación metabólica de las plantas. Reconocen que una ingesta diaria de 10 mg/mL del GABA mejora la calidad de vida de personas que padecen problemas de hipertensión. Por lo que el aguamiel podría ser considerado como una bebida funcional. Vitaminas y minerales también son hallados en esta savia; en la obtenida de A. atroviren el ácido ascórbico (vitamina C) es la que en

mayor concentración se encuentra (17.99 mg/ 100g), seguida de la niacina (vitamina B3) en cantidades de 4.77 mg/ 100 g. En menor medida se encuentran vitaminas solubles como la piridoxina (vitamina B6), riboflavina (vitamina B2) y tiamina (vitamina B1).

Las cantidades halladas de minerales en el aguamiel pueden considerarlo como un suplemento alimenticio en lugares donde la presencia de hierro y zinc sea muy limitado. Metales como el cobre y magnesio están presentes en concentraciones que van desde 0.03-0.07 y 0.034–0.055 mg/100 g, respectivamente. El selenio es otro mineral importante que previene la oxidación celular y su presencia en el aguamiel es óptima para el consumo humano (0.047 mg / 100 g). Microorganismos en el aguamiel El aguamiel es una rica fuente de carbohidratos y compuestos proteicos que tiene un valor de pH casi neutro y una matriz acuosa características que la hacen favorable como sustrato para el desarrollo y obtención de microorganismos. Esto se demuestra en la fermentación que ocurren en la savia expuesta al polvo, insectos, residuos vegetales, generando una población heterogénea de microorganismos que inician una serie consecutiva de fermentaciones como la láctica, alcohólica y acética. En la elaboración del pulque, la cual usa fermentaciones espontáneas, se han identificado una serie de microorganismos que en su mayoría producen alcohol, ácidos y polímeros. Entre estos, los géneros más estudiados que producen alcohol en el pulque son *Zymomonas spp.* Y *Saccharomyces spp.* En la Tabla 4 se muestran los principales microorganismos encontrados en el aguamiel. (12)

Tabla 4: Principales microorganismos hallados en el aguamiel

Microorganismo	Producto	Referencia
<i>Zymomonas mobilis</i>	Alcohol; levano	
<i>Gluconobacter oxydans</i>	Alcohol; ácidos orgánicos	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Ácidos orgánicos	
<i>Lactobacillus ASF360</i>	Ácidos orgánicos	Escalante et al., 2004
<i>Lactobacillus acetotolerans</i>	Ácidos orgánicos	
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	Enzimas	
<i>Saccharomyces carbajali</i>	Alcohol; ácidos orgánicos	
<i>Pseudomonas lindneri</i>	Alcohol	
<i>Pichia barragani</i>	Alcohol	Sánchez-Marroquín & Hope, 1953
<i>Torulopsis hydromelitis</i>	Alcohol	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Dextrano	
<i>Leuconostoc dextranicum</i>	Dextrano	
<i>Leuconostoc kimchii</i>	Dextrano	Torres-Rodríguez et al., 2014

Levaduras productoras de etanol.

Las cepas de levaduras convencionales y no convencionales poseen la capacidad de producir etanol bajo distintas condiciones operativas y nutricionales durante la fermentación, mostrando distintos rendimientos en la producción de biomasa y etanol.

La fermentación del mosto es un proceso bioquímico complejo, en el que intervienen e interaccionan levaduras, bacterias y otros microorganismos. Entre todos ellos, las levaduras son clave en la vinificación, ya que son los responsables de la fermentación alcohólica, la principal reacción en la conversión del mosto en vino.

Las fermentaciones espontáneas son aquellas que se producen de forma natural, sin necesidad de un inóculo. En el caso del tequila y del mezcal, las fermentaciones son realizadas por las levaduras provenientes de la planta (Agave) y del ambiente dentro de la industria de producción. Esto hace que estas fermentaciones no sean producto de la acción de una única especie o cepa de levadura, sino de una sucesión de especies y cepas de levaduras diferentes a lo largo de la fermentación; siendo importante estudiar la dinámica poblacional propia de las fermentaciones.⁽⁴⁾

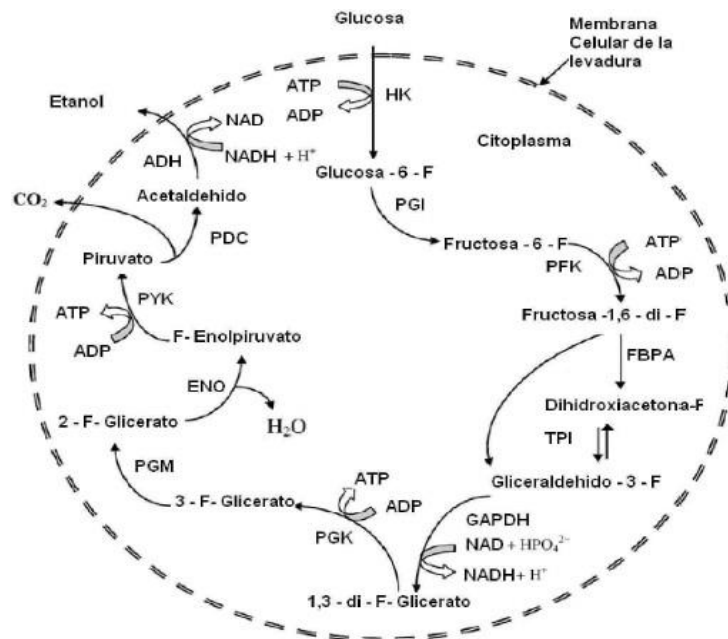
Las levaduras son hongos unicelulares de forma ovalada o alargada de 6 a 8 milésimas de milímetros, pertenecen a la familia *Endomycetaceas*, subfamilia de *Saccharomycetidae*, género *Saccharomyces*. Las levaduras tienen gran importancia en el proceso de fermentación para la producción de alcohol, ya que son las responsables de la transformación del azúcar en alcohol y CO₂ por medio de la asimilación de los azúcares simples que conforman el mosto. Muchas veces las levaduras son consideradas como un subproducto que es recuperable y contribuye a un menor costo de producción.⁽¹⁹⁾ Siendo la *Saccharomyces cerevisiae*, la especie de levadura usada con más frecuencia. Debido principalmente a su capacidad de convertir eficientemente azúcares. Se debe tener en cuenta que para cada levadura existe una temperatura óptima de desarrollo, en la cual se muestra activa. En el caso de la *Saccharomyces cerevisiae* se tiene un desarrollo óptimo entre 28–35 °C, recomendable 30 °C. ⁽²⁰⁾

Los nutrientes más importantes para las levaduras son el nitrógeno y el fósforo, para ello se debe utilizar la urea y el fosfato de amonio, el primero como suministro de nitrógeno y el segundo de fósforo.⁽²¹⁾ La levadura trabaja mejor en medio relativamente ácido por lo que el pH debe mantenerse entre 3.0 y 5.0, por lo que deberá ajustarse el mosto a este requerimiento.⁽²²⁾

La principal vía metabólica de este tipo de microorganismo en la producción de etanol es la glucólisis o vía EMP, a través de la cual una molécula de glucosa es metabolizada y dos moléculas de piruvato son producidas. En la glucólisis se producen dos moléculas de ATP los cuales son empleados para llevar a cabo la biosíntesis de las células de la levadura lo cual involucra una variedad de bioreacciones que requieren energía. Además, la producción de etanol está estrechamente ligada al crecimiento celular del microorganismo, lo que significa que la biomasa se obtiene como un subproducto. Sin el consumo continuo de ATP por parte del microorganismo que está en crecimiento, el metabolismo glucolítico se vería interrumpido inmediatamente, debido a la acumulación intracelular de ATP, causando una inhibición a la fosfofructoquinasa (PFK), una de las enzimas de

regulación más importantes en la glucólisis. El mecanismo de producción de etanol a partir de glucosa en las levaduras se presenta en la Figura 4.(23)

HK: Hexoquinasa, PGI: Fosfoglugosimerasa, PFK: Fosfofructoquinasa, FBPA: Fructosa bifosfato aldolasa, TPI: Triosa fosfato isomerasa, GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato aldolasa, PGK: Fosfoglicerato quinasa, PGM: Fosfogliceromutasa, ENO: Enolasa, PYK: Piruvato quinasa, PDC: Piruvato



Descarboxilasa, ADH: Alcohol deshidrogenasa.

Figura 4: Ruta Embden Meyerhof Parnas para la utilización de la glucosa.

Fermentación

La fermentación es un proceso de tipo catabólico, es decir, de transformación de moléculas complejas, en moléculas simples, dentro del metabolismo. Así la fermentación es un proceso catabólico de oxidación que tiene lugar de forma incompleta, siendo además un proceso totalmente anaeróbico (sin presencia de oxígeno), dando como producto final un compuesto de tipo orgánico, el cual

caracteriza por lo general, a los distintos tipos de fermentaciones existentes, pudiendo así realizar una clasificación y una diferenciación.

En las fermentaciones, los sustratos son oxidados de forma parcial, formándose el ATP solamente por fosforilación en el nivel del sustrato, no necesitando oxígeno. Son numerosos los hongos, bacterias, protozoos, y algas que fermentan los azúcares, transformándolos en etanol más CO₂, en procesos conocidos como fermentaciones alcohólicas. Donde el piruvato se descarboxilado, pasando a formarse el acetaldehído, el cual a la misma vez se reduce a etanol gracias a la alcohol deshidrogenasa, utilizando en dicho proceso al NADH como dador de electrones.⁽¹⁴⁾

Fermentación Alcohólica.

La fermentación alcohólica, es el proceso biológico en plena ausencia de aire, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los azúcares para obtener alcohol etílico y dióxido de carbono gaseoso.⁽¹⁴⁾

La actividad de las levaduras y de las enzimas se ve influenciada por agentes externos y que se reflejan en el rendimiento de la operación, entre estos factores tenemos el pH, temperatura, presión, azúcares presentes, ácidos. La fermentación se realiza entre un rango de pH entre 3.0 a 4.0, con este rango no permite que en él se desarrollen agentes patógenos. La actividad de las levaduras es intensa entre 20 y 25 °C, máxima a 30 °C y por encima de los 40 °C disminuye. En la actividad fermentativa se forma etanol y se desprende gas carbónico, en la medida que su concentración aumenta en el recipiente de fermentación, la presión aumenta y trae como consecuencia una disminución de la actividad celular.⁽¹⁵⁾ El mosto para fermentación alcohólica debe tener una concentración entre 12 a 22 °Brix, pues si la concentración de ° Brix es muy bajo el grado alcohólico obtenido será pobre, por lo contrario si la concentración de °Brix es muy alto la fermentación no se efectúa, pues la presión osmótica que se ejerce sobre las levaduras es grande y no permite que actúen sobre los azúcares.⁽¹⁶⁾

En la fermentación alcohólica las levaduras descarboxilan el piruvato obtenido de la ruta Embden-Meyerhof-Parnas (glicólisis) dando acetaldehído, y éste se reduce a etanol por la acción del NADH₂ (Nicotinamida adenina dinucleótido). La transformación de glucosa en alcohol es de 40 kcal. Mientras que la formación de un enlace de ATP necesita 7.3 kcal, por tanto se requerirán 14.6 kcal, al crearse dos enlaces de ATP. Esta energía es empleada por las levaduras que llevan a cabo la fermentación alcohólica para crecer. De forma que sólo quedan, $40 - 14.6 = 25.6$ kcal que se liberan, calentando la masa de fermentación.⁽¹⁷⁾ Los rendimientos de etanol y CO₂ en la práctica son siempre menores a los valores teóricos. Estos dependen del inóculo (tipo, actividad y concentración de la cepa de levadura), de la composición del medio de cultivo (concentraciones de fuentes de macronutrientes, micronutrientes, factores de crecimiento, e inhibidores), de las condiciones ambientales (temperatura, presencia o ausencia de O₂, pH y aw), del crecimiento microbiano, y de la formación de más de 800 metabolitos en pequeñas cantidades.⁽¹⁸⁾

Morfología de las levaduras

Levaduras se determinan mediante su observación microscópica. Además, los criterios morfológicos se basan en el modo de reproducción vegetativa de la morfología celular, de la formación de Pseudomicelio y de Micelio. La forma de la levadura puede ser desde esférica a ovoide, en forma de limón, piriforme, cilíndrica, triangular, e incluso alargada formando un verdadero micelio o un falso micelio.

También se diferencian en cuanto a su tamaño, miden de 1-10 um ancho por 2-3 um de longitud. Son partes observables de su estructura, la pared celular, el citoplasma, las vacuolas, los glóbulos de grasa, y los gránulos, los cuales pueden ser metacromáticos, de albúmina o de almidón. Para poder observar el núcleo es preciso utilizar tinciones especiales.

La estructura celular es de tipo eucariótico, pero sin sistema fotosintético. La pared rígida, se caracteriza por la presencia, en su composición, de dos polisacáridos: manano y glucano. Algunas levaduras producen una cápsula constituida por fosfomanos. El núcleo está rodeado de una membrana que persiste durante la división celular. El número de cromosomas es variable de unas a otras. Las levaduras en ningún caso son móviles.⁽¹⁸⁾

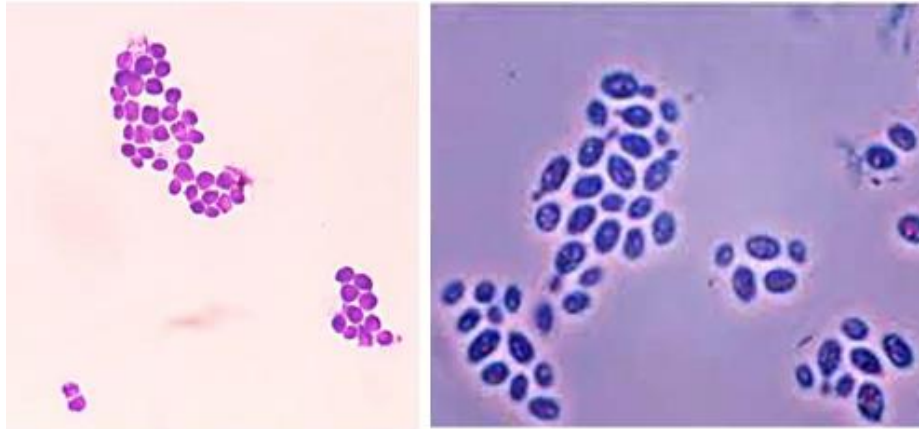


Figura 15. Características Microscópicas de cultivos de levaduras.

METODOLOGÍA

La investigación se realizó en el departamento de ciencia y tecnología de alimentos en el laboratorio de genética de microorganismo de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Todas las muestras fueron recolectadas y trasladadas a este laboratorio, tomando en cuenta los protocolos de transportación dependiendo del tipo de muestra.

Preparación de los medios de cultivo

Se formuló medio de cultivo YPD sólido y líquido (para el medio se omitió agregar agar bacteriológico) con las siguientes cantidades mostradas en la tabla 5 las cantidades mostradas son para 14 cajas Petri de 20 mL.

Tabla 5: Material para la formulación de Medio YPD.

Material	Cantidad (g)
Peptona de carne	5.6
Extracto de Levadura	2.8
Dextrosa	5.6
Agar Bacteriológico	4.2

Activación de cepas de levadura

De la colección UAAAN-DCTA se tomaron los viales de 2 mL que contenían los microorganismos conservados en congelación a -20°C. Se tomaron 7 cepas de levaduras sembrándose por estriado y se incubaron en medio solido YPD a 30°C por 72 h.

Purificación

Las cepas de Levadura activadas al observarlas microscópicamente se observaron con contaminantes. Al observar esto se tomó la decisión de purificarlas por la técnica de agotamiento por estriado en agar solido YPD encubándose a 30°C por 72 h.

Identificación Microscópica.

Las tinciones ofrecen una información adicional es por eso que utilizo la tinción con azul de metileno para la observación de la morfología, ya que ponen de manifiesto características de la pared celular o la existencia de estructuras especiales, como las esporas bacterianas.

Para observar levaduras al microscopio se utiliza el objetivo de inmersión (máximo aumento). Para ello se colocó sobre la preparación una gota de aceite de inmersión. Para enfocar con este objetivo, se colocó la preparación con el aceite en la platina del microscopio, aproximarla con el tornillo macro métrico mirando desde fuera, hasta que el objetivo toque el aceite.

Cultivo líquido y conservación con leche descremada

Se preparó medio líquido YPD como se muestra anteriormente en la figura 5 omitiendo agregar agar bacteriológico, se inocularon las 7 cepas de levadura y se incubaron a 30°C por 72 h.

Una vez que los microorganismos se aislaron en medio líquido se preparó leche descremada en 10 ml de agua destilada, se le agregaron 10 mL de glicerol en una relación 1:1 posteriormente preparada la mezcla se le añadieron 10 mL de microorganismos activados y purificados para su conservación.

Preparación del aguamiel

Del ejido Guadalupe Victoria fueron trasladadas al laboratorio las muestras de aguamiel puro se sometió a un tratamiento térmico (esterilización) en una autoclave a 121 °C por 15 minutos en frascos de vidrio.

Conteo de UFC

La cuadrícula de recuento muestra 9 cuadrados grandes, cada uno de 1 mm². Los 4 cuadrados grandes de las esquinas están divididos en 16 cuadrados con aristas de 0,25 mm. Se utilizan para el recuento de levaduras o cualquier microorganismo. El cuadrado grande central está dividido en 25 cuadrados medianos con aristas de 0,2 mm estando cada cuadrado mediano subdividido en 16 cuadrados pequeños con aristas de 0,05 mm y una superficie de 0,0025 mm².⁽²⁴⁾

Para el recuento de levaduras totales: viables + muertas, se utiliza la cámara de neubauer que tiene capacidad de 0.3 mm³ y permite realizar el conteo de microorganismos a través de una cuadrícula d (400cuadritos) impresa en la cámara como se muestra en la figura 7. Se Obtiene el número aproximado de UFC/ml. ⁽²⁴⁾

UFC/ml=n° colonias x10000 x F. dilución ⁽²⁴⁾

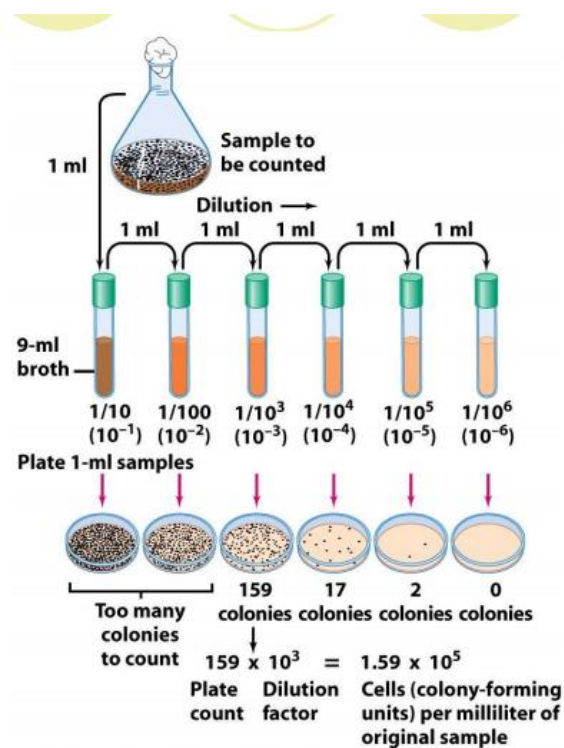


Figura 5: primer paso Dilución para el conteo UFC con la cámara de neubauer

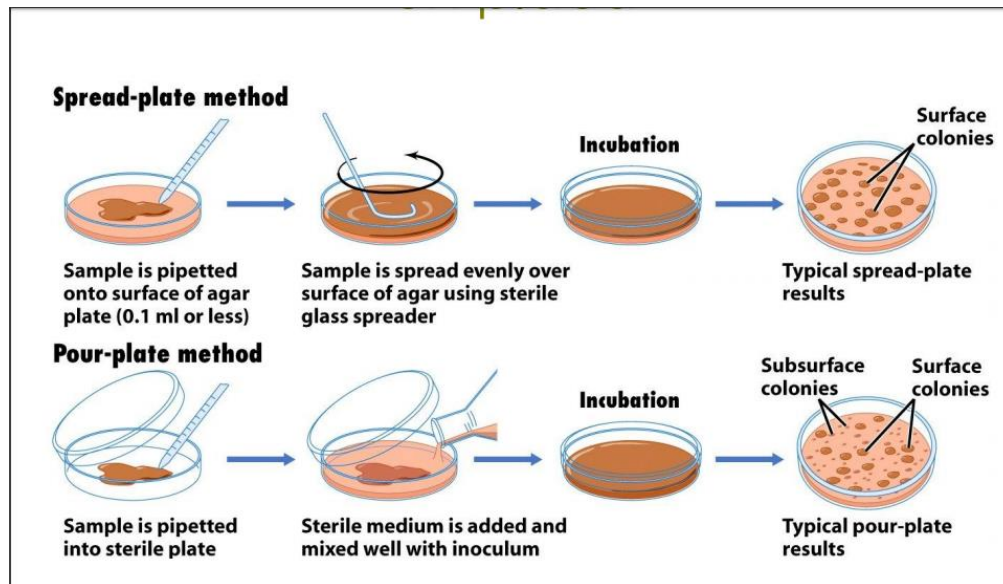


Figura 6: Vaciado en Placa y Extendido

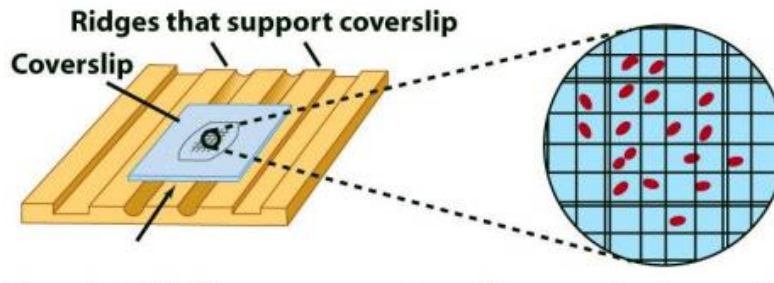


Figura 7: Cuenta de colonias

Fermentación de aguamiel para la obtención de etanol.

En un matraz de 250 ml se añadieron 50 ml de aguamiel a su vez se inocularon 1×10^6 UFC por mililitro de sustrato.

Se inoculo y posteriormente se incubo a una temperatura de 30°C durante 8 días; Se tomó una muestra en el cuarto y octavo día evaluando. pH, °Brix, Azucares totales con Fenol sulfúrico.

pH

Para medir el pH de una disolución podemos emplear dos métodos, en función de la precisión con que queramos hacer la medida:

Para realizar medidas del pH que no necesiten ser muy precisas se utilizan unas sustancias llamadas indicadores, que varían reversiblemente de color en función del pH del medio en que están disueltas. Se pueden añadir directamente a la disolución o utilizarlas en forma de tiras de papel indicador (tabla inferior).

Para realizar medidas exactas se utiliza un pH-metro, que mide el pH (la tabla inferior) por un método potencio métrico indicador en disolución papel indicador pH-metro.(25)



Figura 8: Métodos para medir pH

°Bx

Los grados Brix se miden con un refractómetro. Para efectuar una medición se agrega al prisma una pequeña gota de zumo utilizando una pipeta o, con muestras altamente viscosas, utilizando una espátula. Observando a través de ocular del dispositivo se puede leer los grados Brix. Al comienzo de cada serie de mediciones, se recomienda realizar una medición de control con agua.(26)

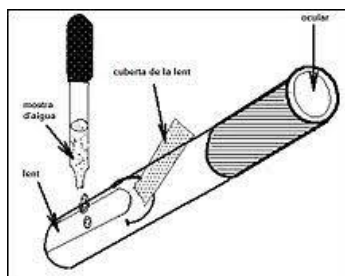


Figura9: Modo de empleo de Refractómetro manual para la cuantificación de °Bx

Azucares totales

Para la aplicación del método Dubois (Método Fenol-Sulfúrico), se mezclaron 2 mL de muestra con 2 mL de fenol al 5% en tubos digestores se colocaron en una gradilla sumergida en un baño de agua fría. A los tubos se les añadieron 5 mL de H₂SO₄, se dejaron reposar por 15 min ebullición durante 10 minutos y se analizaron en un espectrofotómetro (BIOBASEEL-10^a) a una longitud de onda de 480 nm. (27)

Determinación de Etanol

La determinación de etanol se realizó en el laboratorio de análisis Instrumental en la Facultad de ciencias químicas.

Se realizaron diluciones de la muestra conocida (etanol) para la realización de una curva de calibración, se utilizó el programa Quant para la obtención de los datos mediante este se obtuvieron bandas con una longitud de onda determinada haciendo un análisis de regresión lineal lo que posteriormente el programa arroja los % de etanol presentes en cada una de las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente proyecto se desarrollaron en los laboratorios de genética de microorganismos en colaboración con la facultad de ciencias químicas de la UA de C.

Activación de los Microorganismos.

Se utilizaron microorganismos de la colección UAAAN-DCTA que se encontraban conservados en congelación por lo que se sembraron alícuotas del microorganismo en los diferentes medios de cultivo (YPD) y PDA. Para poder identificar alguna contaminación, por lo que después de la incubación se revisaron las cajas Petri identificando las cepas con las características de una levadura. Las cajas no solo presentaron crecimiento de las levaduras, sino también de la contaminación con hongos filamentosos, por lo que se procedió a la purificación de las levaduras.

Identificación de cepas de levaduras colección UAAAN-DCTA

En la figura 10 se presentan 3 de las 7 cepas de levaduras. En la a) se observa la cepa L1 que tiene como característica en su crecimiento una coloración beige y un crecimiento compacto que a diferencia de la cepa L2 y L3 presenta un crecimiento cremoso menos compacto y su coloración más blanquecina. Desde la parte macroscópica se identificaron diferencias en la coloración que presentaron en el medio de cultivo, una vez que las cepas fueron purificadas. Lo cual sirvió como parámetro para ser seleccionadas como diferentes. La forma de crecimiento en los medios de cultivo sirvió para que dentro de los microorganismos que crecieron estas levaduras fueran seleccionadas como levaduras diferentes. Al observar el crecimiento macroscópico no presenta ninguna contaminación al poder ver la forma uniforme con una consistencia cremosa y homogénea en todo el medio de cultivo.

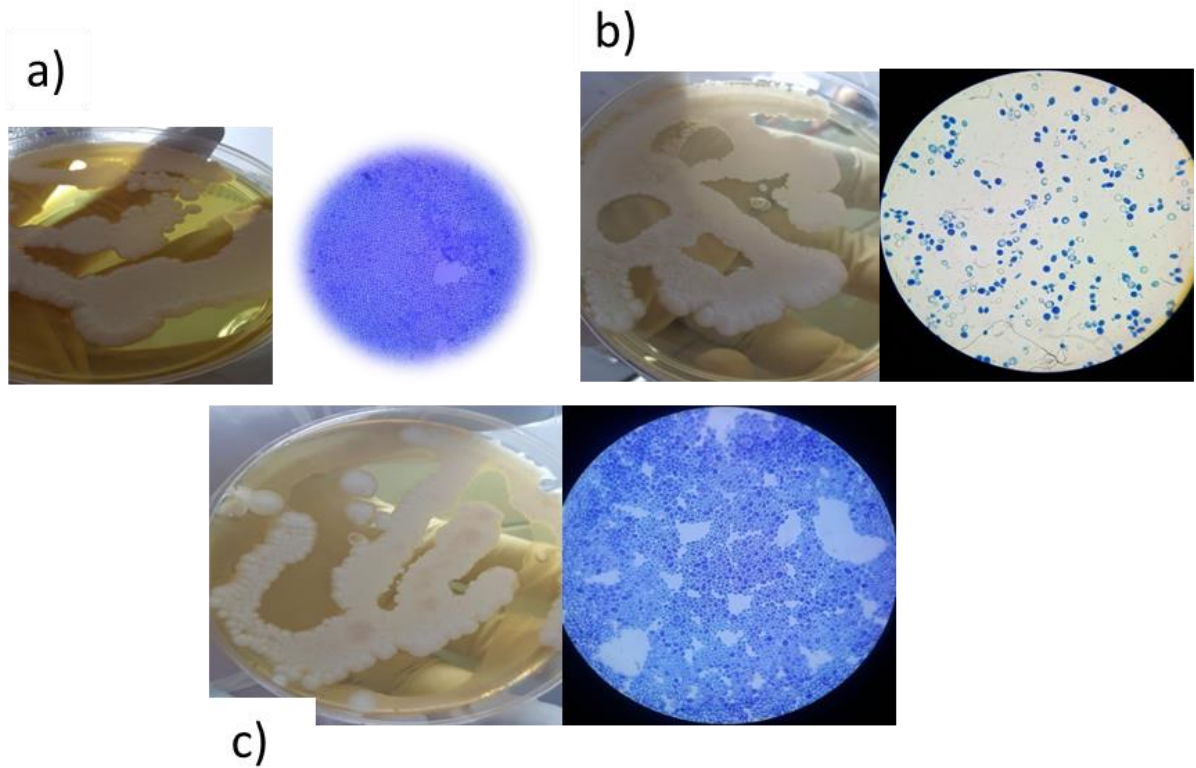


Figura 10: Muestras Macro y Micro de Las cepas: a) L1, b) L2, c) L3

Desde el punto de vista microscópico utilizando la tinción con azul de metileno se observa claramente la diferencia de los microorganismos ya la cepa L1 presenta una morfología más pequeña con las células más compactas que en el campo del microscopio se observa un mayor volumen. Con esta técnica las células consideradas como viables toman una coloración más oscura por lo que en este caso se tenían mayor cantidad de células por campo. Mientras que la cepa L2 en su morfología con la técnica de azul de metileno las células se observaban de mayor tamaño y con un volumen de esporas más pequeño.

Para la figura 11 se presenta las cepas L4, L5, L6 y L7. La figura 11 e) y g) tiene un crecimiento macroscópico muy similar ya que las colonias que forman tiene un aspecto compacto dando una apariencia de que estuvieran secas. En cuanto a las cepas L4 y L6 el aspecto macroscópico era más cremoso, liquido, muy blanquecino,

que al ver las preparaciones al microscópico encontramos diferencias significativas en cuanto al tamaño de las células ya que como se puede observar en la figura 11d) las características morfológicas que presenta esta cepa son muy parecidas con la cepa L2. Y las cepas L5 y L7 tienen más similitud con la cepa L1.

Utilizando esta técnica de tinción se pueden ver claramente las diferencias entre los tipos de levadura, ya que utilizando el mismo objetivo (100X) las estructuras se observan de diferente tamaño.

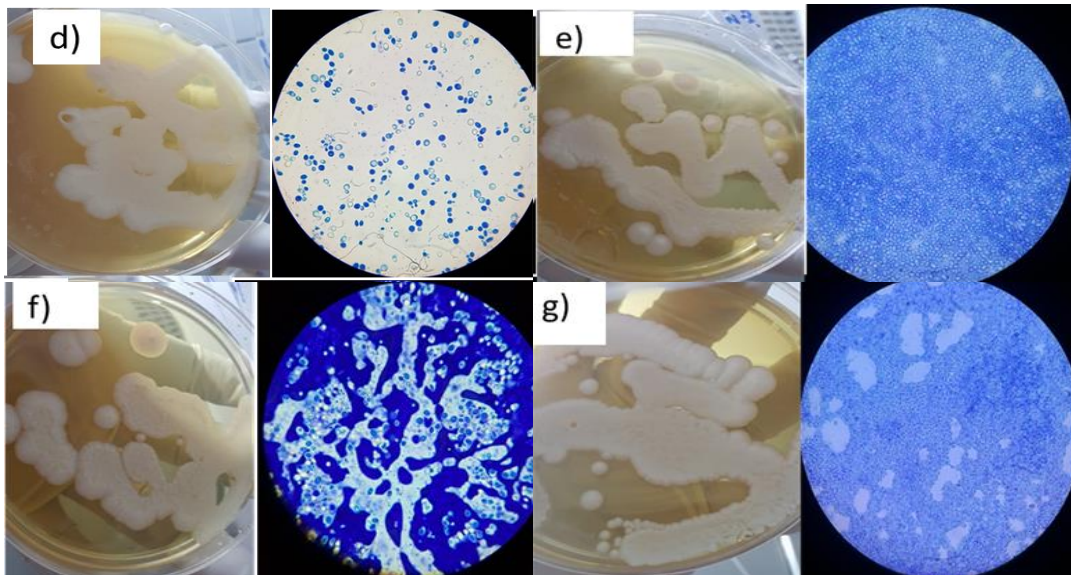


Figura 11: Muestras Macro y Micro de las cepas: d) L4, e) L5, f) L6, g) L7

Se obtuvieron 7 cepas de levadura. Que se identificaron como características redondeadas y otras un poco alargadas, con una mayor cantidad. Los resultados en el ensayo de viabilidad obtuvieron glóbulos azules y menos blancos, lo que demuestra que es viable para la producción de etanol, Lo cual nos indica que las cepas identificadas ⁽¹⁸⁾ las características morfológicas son las indicadas.

Fermentación de Agua miel

Se realizó una fermentación para la evaluación de las 7 cepas de levaduras de la colección DCTA-UAAAN tomando muestras al 4 ° y 8 ° día. Evaluando diferentes parámetros como azúcares totales.

En la figura 12 se muestra los resultados obtenidos de azúcares totales por el método Dubios obtenidas en la fermentación de las 7 cepas en aguamiel en los dos diferentes tiempos muestreados.

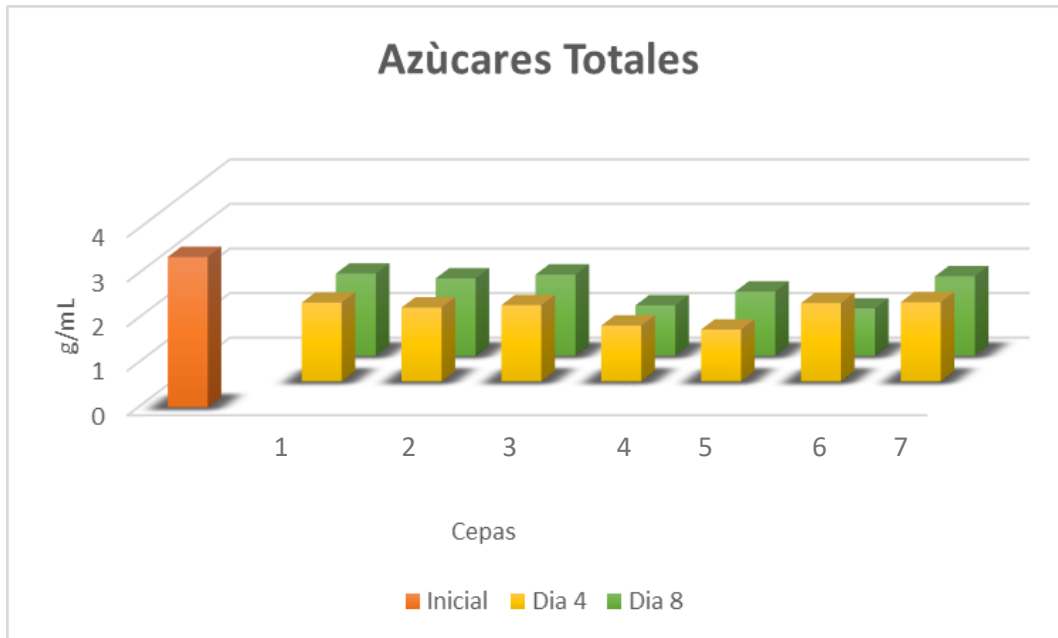


Figura 12: Cuantificación de azúcares totales en Aguamiel. Las cantidades encontradas se muestran en g/mL

De las cepas evaluadas la L4 es la que menor cantidad de azúcares totales se determina tanto en la muestra que se tomó a los 4 días como la que obtuvo a los 8 días mientras que la que se obtuvo con mayor cantidad la cepa 7. Estos resultados demuestran como la cepa L4 tiene una capacidad de metabolizar el sustrato con mayor velocidad, por lo que se la gran mayoría de estas se encuentra con cantidades similares y esto es debido a que cada una de las cepas inoculadas son diferentes en consecuencia a esto la forma en la que estas trabaja varia.

pH

En la figura 13 se muestra la variación de pH conforme a los dos tiempos en los que se llevó a cabo la fermentación del aguamiel.

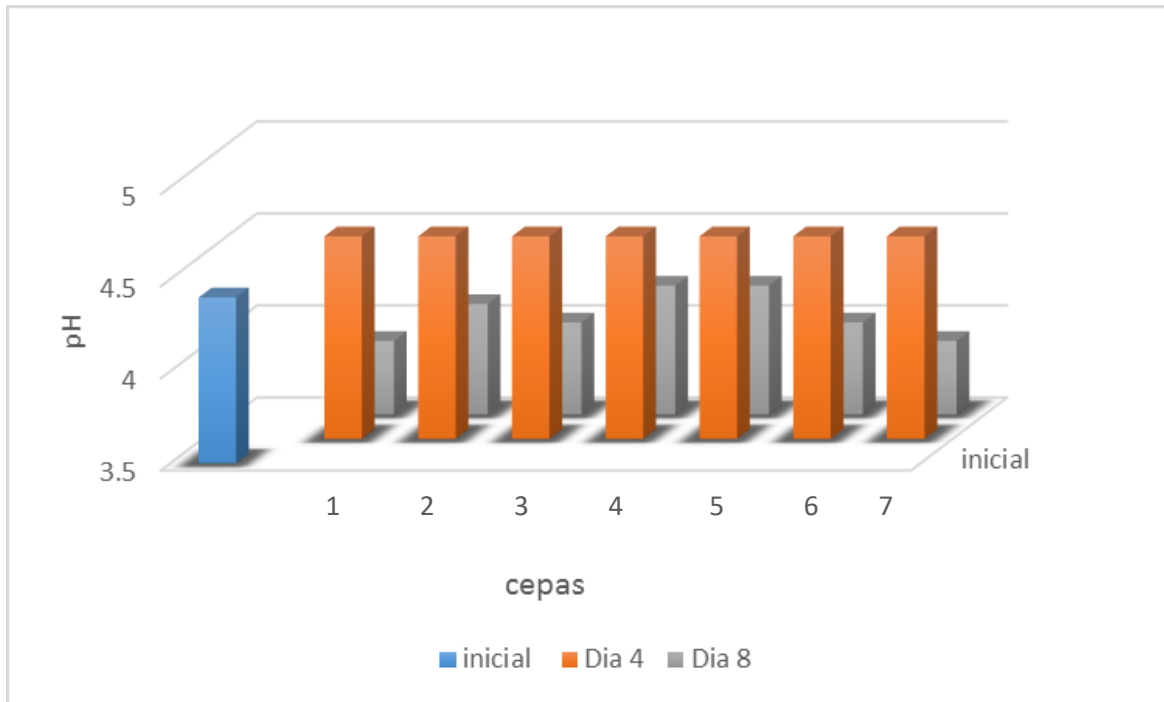


Figura 13: monitoreo de pH durante los días a evaluados de las 7 diferentes cepas.

En la figura anterior nos muestra cómo es que a mayor tiempo el pH disminuye en todas las muestras. Lo que nos muestra que ⁽¹⁶⁾ la fermentación está produciendo etanol puesto que el pH es uno de los factores importantes en esta ya que es uno de los parámetros indirectos para medir la producción de etanol.

°Brix

En la figura 14 se muestra la variación de °Brix durante la fermentación de los dos tiempos resaltando que en el octavo día se obtuvo una mayor disminución de grados.

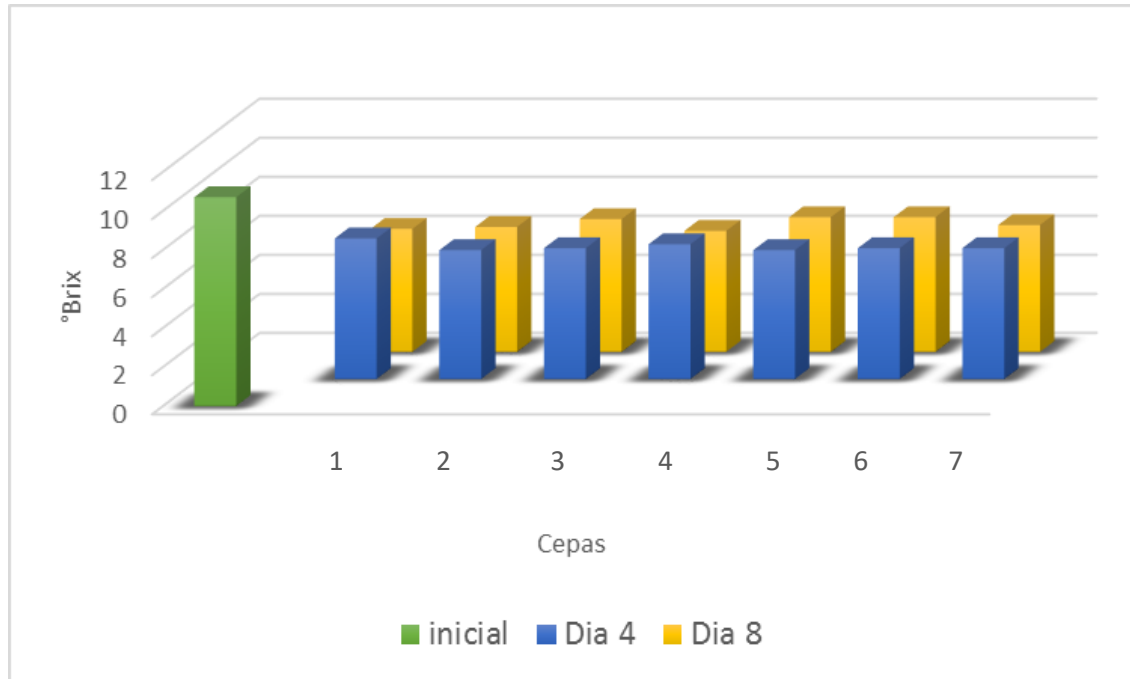


Figura 14: Monitoreo de °Brix de las diferentes cepas de levaduras a evaluar en los dos días.

Según ⁽¹⁶⁾ al igual que los últimos dos parámetros evaluados en este trabajo son indispensables para que las cepas de levadura produzcan mayor cantidad de etanol con el proceso de fermentación, aunque la cantidad de sólidos solubles provenientes del sustrato son un bajos en comparación con algún otro de las variedades de agave existentes, las cepas de levadura utilizadas relacionaron mejor a mayor tiempo de incubación.

Producción de Etanol

En la Figura 15 se muestra la producción de etanol de la muestra inicial y los dos tiempos a evaluar.

Según ⁽¹²⁾ nos dice que uno de los mejores tipos de agave para la producción de etanol es el *tequilana weber* por su contenido de azúcares fermentables, los resultados obtenidos en % de etanol en la fermentación de las diferentes cepas de levadura usando como sustrato aguamiel proveniente de *A. salmiana* y aun que el contenido de azúcares presentes en este son menores, el % de etanol producido al momento analizarlo en el spectrum Quantum son significativas seleccionando L4, L6 y L7 como las mayores productoras de etanol en los dos tiempos.

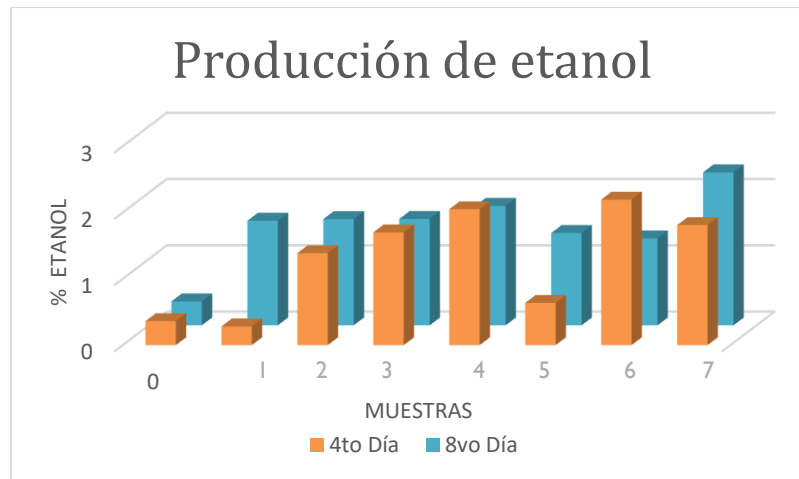


Figura 15: Comparaciones de la producción de etanol de 7 muestras en ambos tiempos. Las cantidades obtenidas de etanol se expresan como %.

La producción de Etanol observada en la Figura 15. Siendo L4, L5 y L6 con una mayor producción de este ya que en lo observado las figuras 12, 13 y 14. Fueron las mismas que tuvieron mayor actividad respecto a Azúcares totales, pH y °Brix.

Aun que las muestras seleccionadas observadas microscópicamente cada una de ellas tiene características muy diferentes las condiciones en las que se sometieron a Fermentación hicieron que su producción de etanol fueran mayores.

CONCLUSIONES

- De las cepas de levaduras pertenecientes de a la colección UAAAN-DCTA fueron seleccionadas 7 cepas que cumplieron con las características para la producción de etanol.
- Las levaduras seleccionadas que microscópicamente presentaron las características. L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7 descartando contaminantes
- El proceso de fermentación y las condiciones (temperatura, Tiempo y medio de cultivo) aplicadas en tratamiento fueron evaluadas para la producción de etanol con los siguientes factores; pH, °Brix, Azúcares totales.
- Se seleccionaron tres cepas de levaduras que fueron las de mayor producción de etanol en los dos tiempos ya que en los cuatro factores evaluados tuvieron la mayor actividad, debido a que estos son parámetros indirectos para la medición de etanol.

BIBLIOGRAFÍA

1. Prescott C, Dunn G. Microbiología Industrial. 3ª ed. España: Edit. Aguilar. SA. 1962.
2. Frazier C, Westhoff D. Microbiología de los Alimentos. 2da ed. España: Edit. Acribia. 1985.

3. Mossel D, Moreno B, Struijk CB. Microbiología de los alimentos. 2da ed. España: Edit. Acribia SA.2006.
4. E. Perez J.C. Gonzalez-Hernandez, M.C. Chavez-Parga y C. Cortes-Penagos ´ 2. (2013). Caracterización fermentativa de levaduras productoras de etanol a partir de jugo de *Agave cupreata* en la elaboración de mezcal. Revista Mexicana de Ingeniería Química, Vol. 12, No. 3 , 461.
5. Pellón JR. La Ingeniería Genética y sus Aplicaciones. España: Edit. Acribia SA. 1986.
6. Prentis S. Biotecnología. España: Salvat Editores, SA. 1987.
7. Meléndez LM, Herrera NP. *Saccharomyces cerevisiae*: rendimiento en distintas fuentes carbonadas. Tesis:Ingeniería Química Fac. de Química e Ingeniería Química. UNMSM. Lima, Perú.
8. Ough SC. Tratado Básico de Enología. España: Edit. Acribia, SA. 1992.
9. Owen PW. Biotecnología de la Fermentación. Principios, procesos y productos. España: Edit. Acribia,SA. 1989.

10. Varnama AH, Sutherland JP. Bebidas. Tecnología, química y microbiología. Serie Alimentos Básicos .España: Edit Acribia. 1997.
11. Quintero R. Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicación. México: Edit. Alambra Mexicana, SA. 1981.
12. Guzmán, Rodrigo & Contreras-Esquivel, Juan. (2018). Aguamiel and its fermentation: Science beyond tradition. Mexican Journal of Biotechnology. 3. 1-22.
13. Mendez, A. (2011, 27 enero). Fermentación | La Guía de Química. Recuperado 30 noviembre, 2019, de <https://quimica.laguia2000.com/general/fermentacion>.
14. Peitzner R, “Diseño de la Investigación de evaluación de efectividad del complejo catalizador Effimoln en la productividad de la fermentación alcohólica de la melaza”, Guatemala, [Tesis], Facultad de Ingeniería, Escuela Ingeniería Química, 2013.
15. Coronel M, “Los vinos de fruta”, Grainger K, Tattersall H., Producción de Vino (Desde la Vid hasta la botella), Editorial Acribia, Zaragoza – España, 2005.
16. Mora Y., “Modelación cinética de la fermentación alcohólica del zumo de pomarrosa”, Quito, Ecuador, [Tesis], Universidad Central de Ecuador, 2014. 5-6p.
17. Sociedad Venezolana de Microbiología, “Levaduras Para La Fermentación De Bebidas Alcohólicas”, Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Coro, estado Falcón, Venezuela. El Marqués, Caracas – Venezuela, 2008, 2p.
18. Shirai K, Malpica F., “Manual de prácticas de laboratorio de tecnología de fermentaciones “alimentarias”, México, Universidad Autónoma Metropolitana, 2013
19. Ponce M, “Aprovechamiento de levadura recuperada de la fermentación en destilería”, Tesis de grado de ingeniería de alimentos, Escuela

- Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil- Ecuador, 2011, 6p.
20. Esteva S., "Obtención de bioetanol a partir del mango criollo del Istmo de Tehuantepec", Oaxaca, México, [Tesis], Universidad Nacional del Istmo, 2009.
 21. Coronel M., "Los vinos de fruta", Grainger K, Tattersall H., Producción de Vino (Desde la Vid hasta la botella), Editorial Acribia, Zaragoza – España, 2005.
 22. Ferreyra M., Schwab M del C, Gerard L, et al. "Fermentación alcohólica de jugo de naranja con *S. cerevisiae*", La Plata, Argentina, Facultad de Ciencias de la Alimentación, Universidad Nacional de La Plata, 2009, 16p.
 23. Torres M., "Valoración de la calidad microbiológica del producto en proceso de una planta productora de bebidas alcohólicas", Facultad de Microbiología Industrial Universidad Pontificia Javeriana, Bogotá, 2007, 28
 24. Urbina. (2015). recuento de levaduras viables. 2017, de urbina vinos blog Sitio web: <http://urbinavinos.blogspot.com/2015/02/recuento-de-levaduras-viables-metodo-de.html>.
 25. Juan Manuel González Mañas. (2015). Biomoleculas. 2016, de irilonet Sitio web: <http://www.ehu.eus/biomoleculas/index.htm>
 26. NMX F. 1965. Norma Oficial de Método de Prueba para la Determinación de "Grados Brix".
 27. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Robers, P.A.; Smith, F. (1956). Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. Anal. Biochem. 28: 350-356