



SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



**AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE LEVADURAS PARA LA
PRODUCCIÓN DE ETANOL DURANTE LA FERMENTACIÓN
ESPONTÁNEA DE JUGO DE SORGO DULCE**

Por

I.B.Q. Libia Elena Díaz Nava

Para obtener el grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Asesores:

Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

Dr. Mario Ramírez Lepe

Dr. Noé Montes García

Veracruz, Veracruz, México

Junio 2014

SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



Subsecretaría de Educación Superior
Dirección General de Educación Superior Tecnológica
Instituto Tecnológico de Veracruz

"2014, Año de Octavio Paz"

Veracruz, Ver., 17 Junio 2014
CIRCULAR No. 216

**C. LIBIA ELENA DÍAZ NAVA
P R E S E N T E**

Por este conducto se le comunica que su tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica Titulada:

"Aislamiento y selección de levaduras para la producción de etanol durante la fermentación espontánea de jugo de sorgo dulce"

Fue aprobada en su totalidad en cuanto a formato y calidad del contenido a satisfacción del H. Jurado del examen, por lo que está Usted autorizado a editar la presentación definitiva del trabajo.

A T E N T A M E N T E
Antorcha y Luz de fuego permanente®

Rosa María Oliart Ros
DRA. ROSA MARÍA OLIART ROS
JEFE DE LA UNIDA

EL H. JURADO

Maria Guadalupe Aguilar USCANGA
DRA. MARÍA GUADALUPE AGUILAR USCANGA
PRESIDENTE

Beatriz Torrestiana Sánchez
DRA. BEATRIZ TORRESTIANA SÁNCHEZ
SECRETARIO

Mario Ramírez Lepe
DR. MARIO RAMÍREZ LEPE
VOCAL 1

Benigno Ortiz Muñiz
DR. BENIGNO ORTIZ MUÑIZ
VOCAL 2

Rosa María Oliart Ros
DRA. ROSA MARÍA OLIART ROS
SUPLENTE



Calz. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar,
C.P. 91897, H. Veracruz, Ver.,
Tel.: (229) 934 1500, Fax: (229) 934 2279,
www.itver.edu.mx

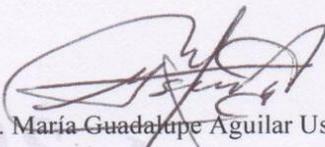


"2014, Año de Octavio Paz"

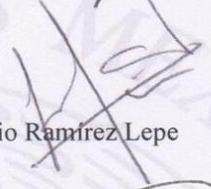
El presente trabajo de tesis titulado "Aislamiento y selección de levaduras para la producción de etanol durante la fermentación espontánea de jugo de sorgo dulce" Presentado por la C. LIBIA ELENA DÍAZ NAVA ha sido aprobado por su comité tutorial como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRIA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

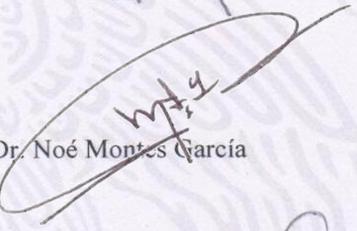
Asesor


Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

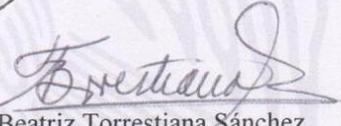
Asesor


Dr. Mario Ramírez Lepe

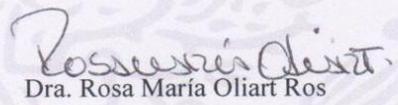
Asesor


Dr. Noé Montes García

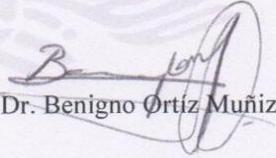
Revisor


Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez

Revisor


Dra. Rosa María Oliart Ros

Revisor


Dr. Benigno Ortiz Muñiz



DEDICATORIA

A MIS PADRES

Con todo mi amor. A ustedes por siempre, mi corazón y mi eterno agradecimiento.

A IVÁN

A ti babe, que nunca has dejado de creer en mí, te amo.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia

A quienes jamás encontraré la forma de agradecer una vida llena de sacrificios, esfuerzos y amor, gracias por su apoyo en los momentos buenos y difíciles; Mamá, Papá, Manolo, somos un equipo y este logro es nuestro, los amo.

A Iván

Gracias por tu cariño, comprensión, tu apoyo incondicional y por hacerme vivir los mejores momentos de mi vida, porque a tu lado nada parece imposible. Te amo babe.

Dra. Lupita

Por sus enseñanzas, su amistad, su paciencia y su motivación; pero sobre todo por confiar en mí. Mi admiración y cariño por siempre.

Mis asesores y revisores

Quienes me han transmitido sus amplios conocimientos y sus sabios consejos.

A CONACYT

A quien agradezco por brindarme la oportunidad de lograr alcanzar ésta meta.

A mis compañeros

A todos ustedes que han hecho de esta experiencia única y especial, a quienes han tenido que soportar mis buenos y malos ratos, GRACIAS, son para mí parte fundamental en este trabajo.

RESUMEN

Díaz-Nava, Libia Elena, IBQ. Programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz. Junio, 2014. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE LEVADURAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL DURANTE LA FERMENTACIÓN ESPONTÁNEA DE JUGO DE SORGO DULCE. Asesores: Aguilar-Uscanga, María Guadalupe, Ramírez Lepe, Mario y Montes-García, Noé.

El etanol obtenido a partir de cultivos o residuos agrícolas, constituye una fuente alternativa de energía renovable. El sorgo dulce (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), por sus características, se considera adecuado para la producción de etanol. Las levaduras representan el factor más importante para alcanzar un eficiente proceso de conversión de estas materias primas hacia etanol. En base a lo anterior, el presente trabajo ha tenido como objetivo: aislar, seleccionar y caracterizar levaduras autóctonas aisladas del jugo de diferentes materiales mejorados genéticamente de sorgo dulce, capaces de producir etanol. Este propósito se llevó a cabo a través de la siguiente metodología: se caracterizó el jugo de 21 variedades de sorgo dulce, a partir de las cuales se aislaron y seleccionaron 60 levaduras productoras de etanol, posteriormente se determinó a cada una de ellas, la osmotolerancia, resistencia a etanol, termotolerancia, tolerancia a compuestos tóxicos y actividad Killer, identificándose las cepas que presentaran estas características y finalmente se evaluó la producción de etanol en jugo de sorgo dulce con las cepas seleccionadas. Los resultados obtenidos fueron: 60 cepas de levadura aisladas, de las cuales 22 presentaron rendimientos de etanol por arriba de los 0.35 g/g, 18 de ellas presentaron características de osmotolerancia hasta los 200 g/L de glucosa, de las cuales 7 mostraron ser resistentes a etanol hasta 6% v/v, ser termotolerantes a 40°C y tolerantes a ácido acético, furfural y 5-hidroximetil furfural, siendo solamente las cepas S30 y S42 quienes presentaron actividad Killer; las cepas seleccionadas fueron identificadas como *Pichia kudriavzevii*, mostrando rendimientos de etanol en jugo de sorgo dulce de 0.4 g/g. Estas levaduras resultan ser de interés para su implementación en tecnologías para la producción de bioetanol de primera y segunda generación.

ABSTRACT

Díaz-Nava, Libia Elena, Biochem. Eng. B.Sc. Biochemical Engineering MSc. Program. Veracruz Institute of Technology. Food Research and Development Unit. June 2014. YEAST ISOLATION AND SELECTION FOR ETHANOL PRODUCTION FROM SPONTANEOUS FERMENTATION OF SWEET SORGHUM JUICE. Assessors: Aguilar-Uscanga, María Guadalupe, Ramírez-Lepe, Mario y Montes-García, Noé.

Ethanol is an alternative source of renewable energy, obtained from agricultural crops and waste. Because of its characteristics, Sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) is considered appropriate for ethanol production. Yeasts are the main factor to be considered in order to achieve an efficient process for ethanol production from these types of raw materials. Therefore, the aims of the present study have been the isolation, selection and characterization of indigenous yeasts capable of ethanol production from sweet sorghum juice from different materials genetically improved modified. This objective was achieved through the following methodology: 21 varieties of sweet sorghum juice were characterized and from these 60 ethanol yeast producers were isolated and selected. Features such as osmotolerance, ethanol resistance, thermotolerance, and tolerance to toxic compounds, killer activity, were determined. Strains that showed these characteristics were identified and finally ethanol production was evaluated in sweet sorghum juice with those selected strains. Results obtained were: 60 yeast strains isolated, 22 of which produced ethanol yields above 0.35 g/g, 18 were osmotolerant up to 200 g/L glucose, and of these, 7 were resistant in up to 6% v/v ethanol, thermotolerant up to 40° C, tolerant to acetic acid, furfural and 5-hydroxymethylfurfural, and only S30 and S42 being the strains exhibiting Killer activity. These two last strains were identified as *Pichia kudriavzevii*, producing ethanol yields of 0.4 g/g when grown in sweet sorghum juice. These yeasts are of interest for first and second generation bioethanol production technologies.

CONTENIDO

RESUMEN.....	iii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Etanol.....	3
2.1.1. Fermentación alcohólica.....	4
2.1.2. Materias primas utilizadas para la producción de etanol.....	6
2.2. Sorgo dulce	7
2.3. Factores importantes en la producción de etanol.....	10
2.4. Problemas presentes en la fermentación alcohólica	11
2.4.1. Inhibición por producto	11
2.4.2. Inhibición por sustrato.....	13
2.4.3. Contaminación.....	14
2.5. Levaduras en la fermentación alcohólica	16
2.5.1. Características deseables en levaduras para la producción de etanol.....	17
2.5.1.1. Osmotolerancia	17
2.5.1.2. Resistencia a etanol	18
2.5.1.3. Termotolerancia.....	19
2.5.1.4. Compuestos tóxicos presentes en hidrolizados lignocelulósicos.....	20
2.5.1.5. Actividad Killer	21
2.6. Aislamiento e identificación de levaduras.....	22
2.6.1. Métodos de caracterización morfológica y fisiológica de levaduras	24
2.6.2. Métodos de caracterización molecular de levaduras.....	25
3. JUSTIFICACIÓN.....	27
4. OBJETIVOS.....	28

4.1.	Objetivo General	28
4.2.	Objetivos Específicos	28
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1.	Material biológico	29
5.2.	Medios de cultivo	30
5.2.1.	Medio de aislamiento y conservación	30
5.2.2.	Medio de fermentación a nivel matraz	30
5.2.3.	Medio para la determinación de la actividad Killer	31
5.3.	Metodología.....	31
5.3.1.	Aislamiento de microorganismos	31
5.3.2.	Selección primaria de microorganismo	32
5.3.3.	Selección secundaria de microorganismos	32
5.3.3.1.	Condiciones de activación y fermentación	32
5.3.3.2.	Determinación de la osmotolerancia.....	33
5.3.3.3.	Determinación de la resistencia a etanol	33
5.3.3.4.	Determinación de la termotolerancia	33
5.3.3.5.	Determinación de la resistencia a compuestos tóxicos	33
5.3.3.6.	Determinación de la actividad Killer	34
5.3.4.	Identificación de levaduras	34
5.3.4.1.	Extracción y purificación de ADN.....	34
5.3.4.2.	Amplificación de las regiones ITS del ADN por PCR	35
5.3.4.3.	Determinación del tamaño de los fragmentos de PCR.....	36
5.3.4.4.	Secuenciación de los fragmentos amplificados.....	36
5.3.5.	Fermentación en jugo de sorgo dulce	36
5.4.	Métodos analíticos	37
5.4.1.	Cuenta celular	37
5.4.2.	Viabilidad celular	38
5.4.3.	Análisis de formación de producto y consumo de sustrato	39
5.5.	Análisis de datos experimentales	40
5.5.1.	Rendimientos y productividades	40

5.5.2. Inhibición celular	41
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
6.1. Caracterización del jugo de sorgo	42
6.2. Aislamiento de levaduras	44
6.3. Selección de las cepas de levadura productoras de etanol	46
6.4. Evaluación de la osmotolerancia en las cepas aisladas de jugo de sorgo dulce	47
6.5. Evaluación de la resistencia a etanol en las cepas aisladas de jugo de sorgo dulce.....	49
6.6. Evaluación de la termotolerancia en cepas seleccionadas.....	52
6.7. Determinación de la actividad killer en cepas de levaduras seleccionadas	55
6.8. Identificación molecular de las levaduras seleccionadas	57
6.9. Evaluación de los compuestos tóxicos presentes en hidrolizados lignocelulósicos....	60
6.10. Producción de etanol en jugo de sorgo	66
7. CONCLUSIONES	70
8. RECOMENDACIONES	71
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Proceso de fermentación alcohólica por medio de microorganismos (Mathews et al., 1998).	5
FIGURA 2. Esquema del proceso de producción de etanol a partir de diferentes materias primas (Bueno et. al., 2009).	7
FIGURA 3. Cultivo típico de sorgo dulce.	8
FIGURA 4. Cámara de Thoma (Distribución de cuadrícula).	38
FIGURA 5. Algunas de las cepas de levadura aisladas de la fermentación espontánea de jugo de sorgo dulce.	44
FIGURA 6. Morfología macroscópica de algunas de las cepas de levaduras aisladas a partir de la fermentación espontánea de jugo de sorgo dulce.	45
FIGURA 7. Morfología microscópica observada en ciertas levaduras aisladas de la fermentación espontánea de jugo de sorgo.	45
FIGURA 8. Rendimientos máximos de etanol obtenidos con las cepas aisladas de jugo de sorgo dulce.	46
FIGURA 9. Efecto de la concentración inicial de glucosa sobre la productividad de etanol en las cepas de levadura aisladas de jugo de jugo de sorgo dulce.	47
FIGURA 10. Efecto de las diferentes concentraciones de etanol inicial en el medio de cultivo sobre la producción máxima de etanol en las levaduras seleccionadas.	50
FIGURA 11. Efecto de las diferentes concentraciones iniciales de etanol sobre el consumo de glucosa en las cepas de levadura seleccionadas.	51
FIGURA 12. Efecto de las diferentes temperaturas evaluadas sobre el consumo de glucosa en las cepas de levaduras seleccionadas.	53
FIGURA 13. Efecto de las diferentes temperaturas sobre la producción máxima de etanol en las cepas de levaduras seleccionadas.	53

FIGURA 14. Efecto de las diferentes temperaturas sobre el rendimiento(a) y productividad de etanol (b) de las cepas seleccionadas.	54
FIGURA 15. Actividad Killer de las levaduras seleccionadas.	56
FIGURA 16. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados por PCR de las regiones ITS del ADN nuclear de las cepas de levadura aisladas de jugo de sorgo dulce.	57
FIGURA 17. Árbol filogenético para las cepas seleccionadas.	58
FIGURA 18. Efecto de diferentes concentraciones de ácido acético en el medio de cultivo sobre la producción de etanol (a) y productividad de etanol (b) en las cepas aisladas de jugo de sorgo dulce.	61
FIGURA 19. Efecto de diferentes concentraciones de ácido acético en el medio de cultivo sobre la inhibición celular (a) y el consumo de ácido (b) en las cepas aisladas de jugo de sorgo dulce.	62
FIGURA 20. Efecto de diferentes concentraciones furfural sobre la producción de etanol (a), productividad (b) e inhibición del crecimiento celular (c) en las cepas aisladas de jugo de sorgo dulce.	64
FIGURA 21. Efecto de diferentes concentraciones 5-HMF sobre la producción de etanol (a), productividad (b) e inhibición del crecimiento celular (c) en las cepas aisladas de jugo de sorgo dulce.	65
FIGURA 22. Producción de etanol (a), consumo de azúcares totales (b) y viabilidad celular (c) de las cuatro cepas seleccionadas en jugo de sorgo dulce.	67
FIGURA 22. Continúa.	68

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Características generales del etanol (Mathews <i>et al.</i> , 1998).	3
TABLA 2. Composición promedio del jugo de sorgo dulce (Ariyajarearnwong <i>et al.</i> , 2011).	10
TABLA 3. Variedades de sorgo dulce (INIFAP).	29
TABLA 4. Composición del medio de conservación.	30
TABLA 5. Composición del medio de cultivo de fermentación a nivel matraz.	30
TABLA 6. Medio para la determinación de la actividad Killer.	31
TABLA 7. Oligonucleótidos iniciadores de la región ITS del ADN nuclear (White <i>et al.</i> , 1990).	35
TABLA 8. Condiciones para amplificación de ITS del ADN nuclear por PCR (White <i>et al.</i> , 1990).	35
TABLA 9. Cantidad de jugo de sorgo por Kg de tallo fresco y contenido de azúcares totales en las variedades de sorgo dulce de alta densidad.	42
TABLA 10. Cantidad de jugo de sorgo por Kg de tallo fresco y contenido de azúcares totales en las variedades de sorgo dulce de baja densidad.	43
TABLA 11. Efecto de la concentración inicial de glucosa sobre el porcentaje de consumo de sustrato en las cepas de levadura aisladas de jugo de jugo de sorgo dulce.	49
TABLA 12. Identificación de la actividad Killer en cepas seleccionadas.	56
TABLA 13. Homologías de las cepas aisladas de jugo de sorgo dulce con especies reportadas en NCBI.	58

1. INTRODUCCIÓN

La utilización del etanol como combustible constituye una opción para encontrar fuentes alternativas de energías no contaminantes y renovables. Actualmente la producción de etanol se lleva a cabo a partir de diversas materias primas, como son los cultivos agrícolas, los residuos de cosechas, forestales y los desechos industriales. Los cultivos agrícolas se han situado como la mejor opción para satisfacer la demanda de etanol proyectada a gran escala. Principalmente por su alto contenido de azúcares, se encuentran: caña de azúcar, melaza, remolacha, maíz y sorgo dulce. (Almodares *et al.*, 2008).

El Sorgo Dulce (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) se ha considerado para la producción de etanol en algunos países como complemento energético a los derivados del petróleo, logrando maximizar la producción del mismo, gracias a las características que el sorgo posee, tales como la resistencia a diferentes tipos de suelos, su alto contenido de azúcares fermentables, sus múltiples periodos de cosechas, entre otros (Almodares y Hadi, 2009).

La fermentación de los azúcares es llevada a cabo por microorganismos como bacterias, hongos y levaduras; la importancia de estas últimas en la fermentación alcohólica ha hecho que sean estudiadas más ampliamente. Se han reportado características deseables en cepas de levaduras productoras de etanol, como son: la resistencia a etanol, osmotolerancia, termotolerancia y cepas que presenten actividad Killer (toxina que produce muerte celular a levaduras sensibles) (Panchal, 2009).

Con el fin de contrarrestar los problemas que se presentan en las fermentaciones alcohólicas industriales, debido a: la inhibición por etanol, inhibición por sustrato, compuestos tóxicos presentes en hidrolizados lignocelulósicos y la contaminación microbiana, es necesaria la búsqueda de cepas de levaduras que presenten las características deseables para resistir a tales inhibiciones y que impidan el desarrollo de microorganismos, ya que de no combatir estos problemas conllevará a la disminución en la producción de etanol y a las pérdidas económicas en el proceso fermentativo.

Los cultivos puros y autóctonos de levaduras son más efectivos en las fermentaciones alcohólicas, debido a que se encuentran adaptados a las condiciones climáticas de la zona, a la materia prima a fermentar y brindan características únicas al producto, lo que permite crear alternativas para optimizar el proceso fermentativo y así impulsar a una mejora progresiva en el rendimiento y productividad del producto final.

Es por ello que el presente trabajo consistió en el aislamiento, selección y caracterización de levaduras productoras de etanol a partir de jugo de sorgo dulce. En el capítulo dos se presentan los antecedentes relacionados al proceso de producción de etanol, los principales factores que influyen en su producción, así como los problemas de inhibición y contaminación y la importancia del aislamiento e identificación de levaduras productoras de etanol.

Posteriormente, la metodología y resultados obtenidos del aislamiento de las levaduras a partir de diferentes variedades de sorgo dulce, y el procedimiento de selección primaria (cepas productoras de etanol) y secundaria (cepas que presentaran osmotolerancia, resistencia a etanol y a compuestos tóxicos, termotolerancia y actividad Killer), y finalmente la caracterización molecular de las siete mejores cepas seleccionadas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Etanol

El etanol o alcohol etílico es un compuesto líquido, incoloro, volátil, inflamable y soluble en agua cuyas moléculas se componen de carbono, hidrógeno y oxígeno. Su fórmula química es $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$. El etanol presenta las siguientes propiedades físicas y químicas (Tabla 1).

TABLA 1. Características generales del etanol (Mathews *et al.*, 1998).

Propiedades físicas y Químicas	Valor
Masa molar	46.07 g/mol
Densidad	0.789 g/cm ³
Punto de ebullición	79°C
Punto de fusión	-117°C
Solubilidad en agua	miscible
Densidad relativa (agua = 1)	0.8
Presión de vapor, kPa a 20°C	5.8
Presión crítica	63 atm
Acidez	15,9 pK _a

El etanol tiene muchos usos en la industria como ingrediente para las bebidas alcohólicas, en el sector farmacéutico como excipiente de algunos medicamentos y cosméticos, y actualmente uno de los principales usos es como combustible.

Se conocen dos maneras de obtener el etanol: por medio de la vía química mediante la modificación química del etileno, a través de la hidratación catalítica de este con ácido sulfúrico como catalizador y mediante la vía fermentativa a partir de la conversión de azúcares. Gran parte de la producción mundial se obtiene del procesamiento de cultivos ricos en azúcares. (Mathews *et al.*, 1998).

El etanol así producido se conoce como bioetanol, y éste puede ser utilizado como un producto sustitutivo de la gasolina en estado puro, mezclado con ésta o como aditivo para

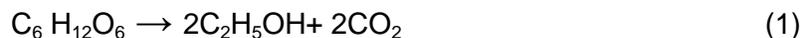
el combustible a través de su transformación a ETBE (etil terbutil éter) (García y García, 2006).

2.1.1. Fermentación alcohólica

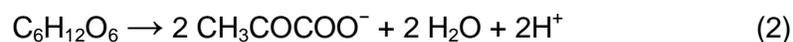
El proceso de fermentación de azúcares para producción de etanol es conocido y utilizado desde hace miles de años. Este proceso ha sido estudiado a lo largo de la historia, permitiendo su optimización.

Los microorganismos que llevan a cabo la transformación de los azúcares a etanol son las levaduras, siendo *Saccharomyces cerevisiae* la levadura más comúnmente utilizada y la más estudiada para este tipo de procesos. Sin embargo se ha encontrado que algunos tipos de hongos y levaduras denominadas como no-*Saccharomyces* pueden ser productores de etanol, pero su uso a nivel industrial es aún limitado debido a que no compiten en cuanto a tolerancia a etanol, osmotolerancia y actividad killer con respecto a *Saccharomyces* (Jolly *et al.*, 2006).

La fermentación alcohólica es un proceso anaerobio y exotérmico que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono. La conversión de manera general se representa mediante la reacción 1:



En donde una molécula de glucosa es oxidada parcialmente hasta obtener 2 moléculas de piruvato tal y como se describe a continuación en la ecuación 2:



El piruvato se descarboxila mediante la acción de la piruvato descarboxilasa para dar como producto final acetaldehído liberando por ello dióxido de carbono (CO_2) a partir de iones del hidrógeno (H^+) y electrones del NADH.

Tras esta operación, el NADH sintetizado en la reacción bioquímica se vuelve a oxidar por la enzima alcohol deshidrogenasa, regenerando NAD^+ para la continuación de la glucólisis y sintetizando al mismo tiempo etanol (Mathews *et al.*, 1998) (Figura 1).

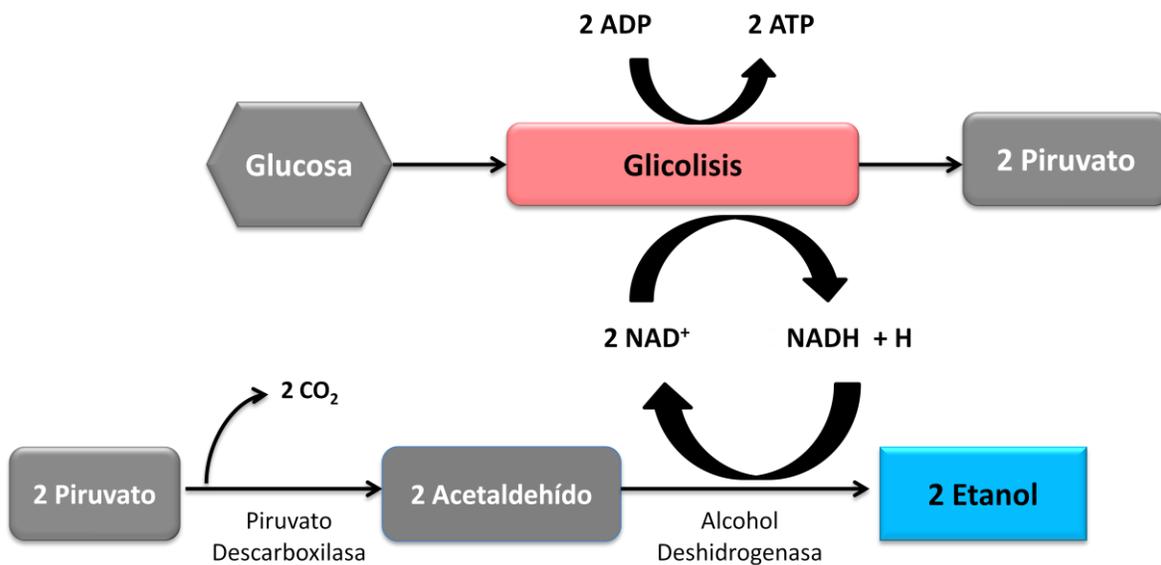


FIGURA 1. Proceso de fermentación alcohólica por medio de microorganismos (Mathews *et al.*, 1998).

Para evaluar la transformación de azúcares a etanol se utiliza como parámetro estequiométrico el rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{X/S}$), que se define como la cantidad de levadura producida por cantidad de sustrato consumido, el rendimiento producto/sustrato ($Y_{P/S}$) el cual es la cantidad de producto sintetizado por cantidad de sustrato consumido, y la productividad (Q_p) la cual se define como la cantidad de etanol producido por unidad de tiempo y volumen (Vázquez y Dacosta, 2007).

El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 gramos de etanol producido por gramos de glucosa consumida, y 0.49 gramo de CO_2 por gramo de glucosa consumida; es difícil lograr este rendimiento, ya que el microorganismo utiliza la glucosa para producir otros metabolitos y para su mantenimiento celular (Owen, 1991).

Una alternativa para la producción de etanol por vía fermentativa, es a partir de la utilización de una gran variedad de materias primas ricas en carbohidratos (Aristidou y Penttilä, 2000).

2.1.2. Materias primas utilizadas para la producción de etanol

Actualmente se utilizan varios tipos de materias primas para la producción a gran escala de etanol de origen biológico, tales como las sustancias con alto contenido de azúcares, almidón y celulosa (Vázquez y Dacosta, 2007).

- **Azúcares.** Estos se puede encontrar en cultivos como: la caña de azúcar, la melaza, el sorgo dulce, remolacha azucarada, etc. El jugo que se obtiene de estas plantas puede ser fermentado directamente para la obtención de etanol.
- **Almidones.** Se encuentran en cereales (maíz, trigo, cebada) y tubérculos (yuca, camote, papa). Los almidones contienen carbohidratos de mayor complejidad molecular que necesitan ser transformados en azúcares más simples mediante un proceso de sacarificación, introduciendo un paso adicional en la producción de etanol.
- **Celulosa.** La cual está presente en la madera, residuos agrícolas y forestales. Las materias primas ricas en celulosa son las más abundantes, sin embargo, la complejidad de sus azúcares hacen que la conversión a carbohidratos fermentables sea más complicada que en el caso del almidón. Los biocombustibles obtenidos a partir de biomasa lignocelulósica son denominados de "segunda generación" ya que son producidos a partir de materias primas que no son fuentes alimenticias, para lo cual se utilizan tecnologías que todavía están en etapas de investigación y desarrollo y con costos de producción aún muy elevados (Sánchez y Cardona, 2005).

En la Figura 2, se muestra el proceso de producción de etanol a partir de diferentes materias primas.

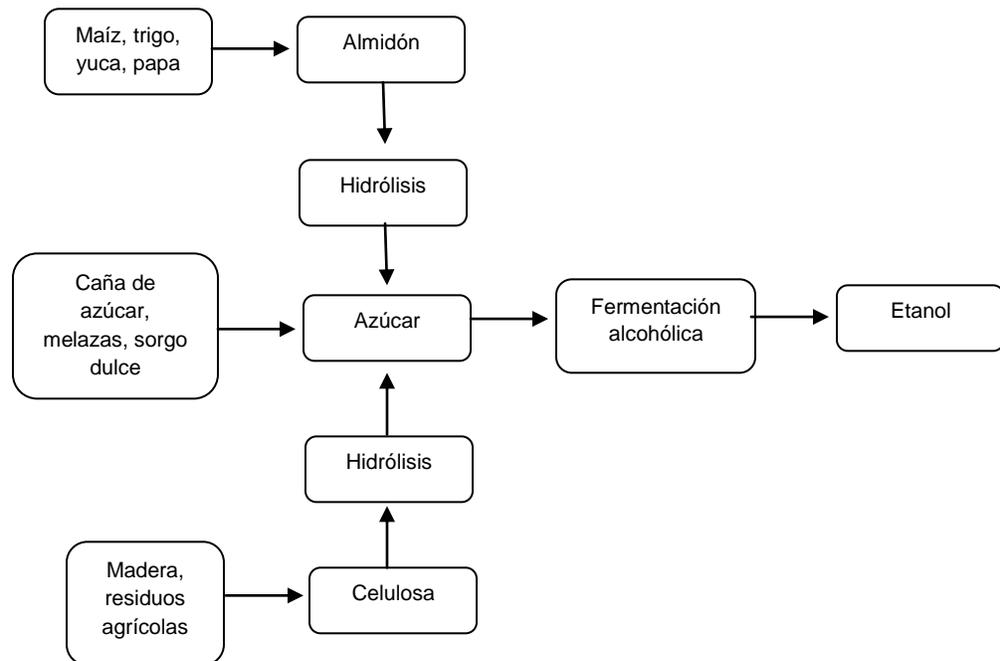


FIGURA 2. Esquema del proceso de producción de etanol a partir de diferentes materias primas (Bueno *et. al.*, 2009).

2.2. Sorgo dulce

Dentro de las materias primas alternativas que están alcanzando importancia a nivel mundial para la producción de etanol se encuentra el sorgo dulce.

El sorgo dulce (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) (Figura 3), originario del este de África, pertenece a la familia de las gramíneas, tiene una altura de 1 a 3 metros en dependencia de la subespecie, es un cultivo de alta eficiencia fotosintética, debido a su metabolismo C4 fotosintético que permite que el sorgo acumule CO₂ durante la noche, reduzca la tasa de la fotorrespiración en presencia de luz y disminuya la pérdida de agua a través del estoma (Keeley y Rundel, 2003).

Como resultado, el sorgo es extremadamente eficiente en el uso de agua, de dióxido de carbono, los nutrientes y la luz solar (Serna-Saldívar, 2010).



FIGURA 3. Cultivo típico de sorgo dulce.

A partir del uso final que se le da, el sorgo puede ser clasificado en sorgo de grano que se utiliza como alimento para humanos y animales, en sorgo forrajero para forraje de ganado, en sorgo de alta biomasa para la producción de biomasa lignocelulósica y el sorgo dulce, donde el jugo de este es empleado para producir etanol (Almodares *et al.*, 2008).

Debido a las características que posee, el sorgo dulce se puede utilizar como materia prima para la producción de etanol, ya que es resistente a la salinidad, a las inundaciones y sequía, presenta de 2 a 3 cosechas por año, la cantidad de fertilizante que requiere es mucho menor en comparación con la caña de azúcar y el maíz, cultivos que se utilizan actualmente como materias primas para la producción de biocombustible (Kim y Day, 2011).

Además, el tallo del sorgo dulce está compuesto por un alto contenido de carbohidratos y azúcares fermentables (16-23% °Brix), que lo convierten en la principal alternativa para la producción de etanol.

El sorgo es un cultivo complaciente de las modificaciones genéticas, lo cual facilita el mejoramiento de las plantas y el desarrollo de nuevas variedades adaptadas a diferentes regiones en todo el mundo (Zhang *et al.*, 2010).

Almodares y Hadi (2009), sugieren plantar sorgo dulce para incrementar la producción de biocombustibles en los países cálidos y secos, para resolver problemas como el aumento de octano en la gasolina, así como reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, ya que es un cultivo que se encuentra bien adaptado a diferentes tipos de climas como tropicales y áridos.

2.2.1. Composición del jugo de sorgo dulce

El jugo de sorgo dulce se obtiene tradicionalmente a través de una operación mecánica con un molino de rodillos compuesto por un conjunto de cilindros, similares a los empleados para la molienda de caña de azúcar.

En este jugo se pueden encontrar diferentes tipos de azúcares, como: sacarosa, glucosa, fructosa, maltosa y xilosa (Almodares *et al.*, 2008), los cuales, al fermentarse, pueden producir aproximadamente 74 litros de etanol por tonelada de caña (Smith y Frederiksen, 2000).

Los jugos de sorgo dulce generalmente contienen 16-18% de azúcar fermentable, que puede ser fermentado directamente en etanol por las levaduras. (Wu *et al.*, 2010).

Los tallos maduros de sorgo dulce contienen aproximadamente 73% de humedad y los sólidos se dividen en carbohidratos estructurales y no estructurales. Alrededor del 13% son carbohidratos no-estructurales compuestos de sacarosa, glucosa y fructosa, en cantidades variables según el cultivo, temporada de cosecha, etapa de madurez, entre otros factores agronómicos (Mamma *et al.*, 1996; Phowchinda *et al.*, 1997).

En términos generales, la composición de azúcares simples en el jugo de sorgo dulce es: 53-85% de sacarosa, 9-33 % de glucosa y 6-21% de fructosa (Gnansounou *et al.*, 2005; Mamma *et al.*, 1996; Phowchinda *et al.*, 1997). También contiene otros componentes esenciales para el crecimiento de los microorganismos como son vitaminas, sales y minerales entre otros. En la Tabla 2 se presenta la composición promedio del jugo de sorgo.

TABLA 2. Composición promedio del jugo de sorgo dulce (Ariyajarearnwong *et al.*, 2011).

Componente	Jugo concentrado de sorgo dulce
Total de sólidos solubles (°Bx)	75
Nitrógeno (%)	0.276
Fosfato (%)	0.164
Potasio (%)	5.0550
Sodio (%)	0.394
Calcio (%)	0.064
Magnesio (%)	0.0638
Fierro (%)	0.0004
Manganeso (%)	0.0003
Cobre (%)	0.0002
Zinc (%)	0.0023
Azufre (%)	0.0230

2.3. Factores importantes en la producción de etanol

Existen factores importantes que influyen en el proceso de fermentación alcohólica como lo son: el medio de cultivo enriquecido con los nutrientes necesarios (fuente de carbono, de nitrógeno, fosfato, potasio, azufre, magnesio), las condiciones del medio (temperatura, pH, aireación, agitación, etc.), el modo de operación del biorreactor (lote, lote alimentado, continuo, semicontinuo, etc.), y el material biológico con el que se llevará a cabo la fermentación, utilizando algunos hongos, bacterias como *Zymomonas mobilis* y, principalmente, levaduras del género *Saccharomyces*. Estas últimas presentando las características adecuadas llevaran al incremento del rendimiento y la productividad del proceso y a la disminución de los productos secundarios (Ortiz-Zamora, 2006; Querol y Fleet, 2006).

2.4. Problemas presentes en la fermentación alcohólica

En los procesos de fermentación alcohólica de manera industrial existen problemas que limitan que ésta se lleve a cabo, como es el caso de la exposición de las levaduras a altas concentraciones de etanol (Ortiz-Zamora, 2006), o cuando se encuentran inmersas en medios con altas concentraciones de azúcares. Esto conlleva a la inhibición en el crecimiento celular y de producción de etanol, afectando con ello los rendimientos y la productividad en el proceso fermentativo. Además, debido a que las fermentaciones industriales no se realizan en medios estériles, se presentan problemas por la contaminación de otros microorganismos en el medio de fermentación, lo cual genera la producción de metabolitos secundarios y de compuestos tóxicos, como el ácido acético que provocan la muerte celular de la levadura implementada (Aguilar-Uscanga, 1998).

2.4.1. Inhibición por producto

Durante mucho tiempo, las industrias productoras de etanol se han topado con la problemática de la acumulación de grandes cantidades de etanol mientras se lleva a cabo el proceso de fermentación. Este metabolito actúa inhibiendo el crecimiento y capacidad fermentativa en las levaduras, las cuales dependiendo de la cepa que se trate, difieren en su capacidad para tolerar diferentes niveles de etanol, aunque muchas cepas de levaduras permanecen viables en presencia de concentraciones de etanol (3-4 % p/v) que son letales para otros microorganismos. (Casey e Ingledew, 1986).

El mecanismo de inhibición por etanol durante las fermentaciones por lote con cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o cuando este se añade al medio de cultivo, ha sido estudiado extensivamente debido a su complejidad.

Nagodawithana *et al.* (1977), reportaron que el etanol exógeno, adicionado a cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, fue menos tóxico que el etanol endógeno producido por la levadura. Esto puede deberse a que la velocidad de producción de etanol dentro de las células es inferior o igual a la velocidad a la que podría ser excretado, lo que origina, que durante el proceso de fermentación la concentración de etanol se eleve, y cuando ésta

alcanza aproximadamente un 12% de volumen, las levaduras tienden a morir (Panchal *et al.*, 1980, Beaven *et al.*, 1982).

Se ha reportado también que la concentración de etanol dentro de la célula puede ser mayor que afuera de ésta en ciertas etapas, especialmente bajo condiciones ambientales como la temperatura o las altas presiones osmóticas. El aumento de la temperatura y/o la presión osmótica se han relacionado con el aumento de las concentraciones intracelulares de etanol y disminución de la tolerancia de las células al etanol (D'Amore *et al.*, 1990).

Diferentes efectos de inhibición se manifiestan en la célula cuando se expone a concentraciones elevadas, como es el caso de la inhibición en el crecimiento celular y la viabilidad, aumentando la muerte celular (Benitez *et al.*, 1983).

Ingram y Buttke (1984) señaló que existen dos hipótesis básicas para explicar el mecanismo inhibitorio del etanol: inhibición por producto final de las enzimas glicolíticas y el deterioro de la membrana plasmática.

La desnaturalización de proteínas y enzimas glicolíticas por efecto del etanol ha sido estudiada por diversos autores, encontrando que muchas de estas enzimas eran inhibidas (Nagodawithana *et al.*, 1977). Además observaron una inhibición no competitiva entre la velocidad de crecimiento y la producción de etanol, lo cual puede predecir el patrón cinético para estas inhibiciones, pudiendo reflejar, el efecto que tiene el etanol sobre la enzima específica de la glucólisis que presente mayor sensibilidad hacia éste, una enzima que comúnmente sugiere esta inhibición es la hexoquinasa.

Navarro *et al.* (1978), realizó un estudio con *Saccharomyces carlsbergensis*, en el cual utilizó cada uno de los intermediarios glucolíticos, desde la glucosa hasta gliceraldehído-3-fosfato como sustrato de inicio en el proceso de fermentación alcohólica. Sólo cuando se utilizó glucosa se redujo significativamente la velocidad fermentación, lo cual sugirió que la hexoquinasa era la enzima glucolítica más sensible al etanol.

Sin embargo, la estructura de la membrana plasmática parece ser parte fundamental en el transporte del etanol hacia la célula, debido a que es el sitio de control de transporte de nutrientes y la excreción de productos de desechos en el medio circundante (Casey e Ingledew, 1986). Al actuar sobre la membrana, el etanol daña el núcleo hidrofóbico de la misma, lo que altera su organización y permeabilidad y provoca el flujo de cofactores esenciales y coenzimas (Van Uden *et al.*, 1985). De forma general, el etanol provoca un incremento de la fluidez en la membrana debilitando su estructura. You *et al.* (2003), reportó que el sitio de acción del etanol es la membrana plasmática, las proteínas hidrofóbicas y membranas mitocondriales, membranas nucleares, membrana vacuolar, retículo endoplásmico y proteínas hidrofílicas del citoplasma.

Existe evidencia considerable que indica que los ácidos grasos insaturados y esteroides en la membrana plasmática de levaduras son importantes para mejorar la tolerancia a etanol y la producción de metabolitos en diversos microorganismos, ya que estos ácidos grasos se requieren como factores de crecimiento para las células. Rose *et al.*, (1978), reportaron que los esteroides presentaban un papel importante en la regulación del estado fisiológico de la membrana, ya que un incremento en el contenido de esteroides podría facilitar los cambios de estado de gel a líquido.

2.4.2. Inhibición por sustrato

Las altas concentraciones de sustrato en el medio de fermentación inhiben el crecimiento celular y la actividad fermentativa de las levaduras como resultado de la alta presión osmótica y la baja actividad de agua (Casey e Ingledew, 1986).

La inhibición por el azúcar se explica por un fenómeno de ósmosis: si una célula de levadura se encuentra en una disolución de azúcar de presión osmótica más fuerte que la del contenido de sus vacuolas, la célula será más o menos plasmolizada (Brown y Oliver, 1974), es decir, cuando las condiciones del medio extracelular tienen una concentración mayor que la que existe en el interior celular (hipertónicas), el agua que hay dentro de la célula sale al medio hipertónico (ósmosis) y la célula se deshidrata, ya que pierde el agua que la llenaba, reduciendo así su tamaño.

Cuando la concentración de azúcar inicial es elevada, la fase lag se prolonga, la viabilidad celular durante la fase lag disminuye y los recuentos de células viables durante la fermentación dan valores bajos, es decir la fermentación se retarda y quedan elevados niveles de azúcar residual.

La naturaleza del azúcar también es importante. Por ejemplo, la inhibición por sustrato en fermentaciones con concentraciones iguales de glucosa y sacarosa, la presión osmótica ejercida por la glucosa es 1.73 veces mayor que la de la sacarosa (Casey e Ingledew, 1986).

La inhibición por sustrato directo en la capacidad fermentativa, en general llega a ser significativa si la concentración de azúcares en el medio se encuentra entre 15 a 25% (p/v) (Jones *et al.*, 1981).

Ingledew (1995), con un suplemento de nutrientes en el medio, ha enfrentado los inconvenientes de la presión osmótica y ha logrado fermentar mostos de cereales, cuyos contenidos de azúcares reductores son superiores a 300g/L, obteniendo rendimientos alcohólicos de hasta 23% (v/v). El método de Ingledew es usado en las industrias de la fermentación alcohólica, ya que buscan trabajar con elevadas concentraciones iniciales de azúcares, tecnología a la que se le ha llamado VHG (very high gravity). Para poder trabajar con este tipo de tecnología se requieren cepas osmotolerantes y que resistan a altas concentraciones de etanol.

2.4.3. Contaminación

Las condiciones de acidez, temperatura, concentración de sustratos e higiene, y debido a que los procedimientos industriales en las fermentaciones alcohólicas industriales no son estériles (preparación de mosto, limpieza, etc.), pueden permitir el desarrollo de otros tipos de microorganismos que compiten por los azúcares, produciendo compuestos orgánicos indeseables para la calidad final del alcohol, que a su vez resultan ser tóxicos para las levaduras (Camargo *et al.*, 1990).

Los ácidos orgánicos de mayor importancia en los procesos fermentativos son el láctico y el acético. El ácido láctico es inhibitorio en la producción de etanol cuando se encuentra en concentraciones que superan 0.8% p/v y el acético por encima de 0.05% p/v. El primero es producido principalmente por bacterias ácido lácticas, mientras que el segundo puede ser producido tanto por bacterias como por levaduras, como es el caso de las levaduras del género *Brettanomyces*.

Aguilar-Uscanga (1998), realizó la caracterización cinética de *Brettanomyces bruxellensis*, y observó que este tipo de levaduras, al ser productoras de ácido acético, pueden estar presentes en una fermentación alcohólica llevada a cabo por levaduras del género *Saccharomyces* e incrementar las concentraciones de ácido acético en el medio, lo que conlleva a una disminución de la viabilidad de las células de *Saccharomyces* y por lo tanto manifestarse una disminución en la producción de etanol.

La contaminación por bacterias no representa un problema tan grave ya que puede ser controlada por medio de antibióticos adicionados al medio de cultivo, sin embargo, en caso de encontrarse levaduras no deseables en el proceso de fermentación, que puedan fomentar la aparición de metabolitos secundarios, es necesario recurrir a otras alternativas, como el uso de cultivos de levaduras que presenten actividad Killer, las cuales ayudaran a controlar el crecimiento de levaduras no deseadas.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la actividad antagonista de levaduras hacia otras levaduras, y estos incluyen la producción de toxinas killer y otras proteínas y péptidos inhibidores, la competencia por los nutrientes y el espacio, la producción de glucanasas líticas de la pared celular de hongos y quitinasas, la producción de metabolitos tóxicos, e inducción de reacciones de resistencia o de defensa de hongos (Punja y Utkhede, 2003).

La producción de etanol y la actividad killer son propiedades importantes en la selección y comercialización de levaduras, ya que ponen a consideración el hecho de que las levaduras probablemente tienen mayor potencial como agentes de control biológico (Degre, 1993).

2.5. Levaduras en la fermentación alcohólica

Las levaduras han sido estudiadas a lo largo de la historia, principalmente por la capacidad que tienen para producir etanol. Son hongos unicelulares que se encuentran comúnmente en los ambientes naturales. Hay alrededor de 1.500 especies conocidas en la actualidad, y se estima que menos del 1 % de todas las especies han sido identificadas. De estas especies, sólo algunas se sabe que son útiles en los procesos de fermentación alcohólica. Aunque muchas especies suelen fermentar principalmente hexosas y disacáridos, otras no lo hacen, como los géneros *Cryptococcus* y *Rhodotorula*.

La distribución de las levaduras en la naturaleza, pueden no ser sólo las capas superiores del suelo, sino también encontrarse en diversas materias orgánicas, sobre todo las de origen vegetal que contienen hidratos de carbono. Se encuentran con frecuencia en las hojas, sobre la epidermis de las frutas y pueden penetrar a los tejidos subyacentes como resultado de un daño mecánico. Su presencia depende de la temperatura, el pH, la humedad y la disponibilidad de azúcares simples (Carlile *et al.*, 2001).

Un rasgo relativamente único de levaduras que las distingue de la mayoría de otras formas de vida, es que son capaces de crecer tanto en ambientes aeróbicos como anaeróbicos. El género *Saccharomyces* y algunos más, son fermentadores enérgicos de los azúcares bajo condiciones anaeróbicas. *Dekkera*, su anamorfo *Brettanomyces* y algunas otras, fermentan glucosa más rápido en aerobiosis (Déak y Beuchat ,1996).

Para llevarse a cabo la fermentación alcohólica por levaduras, es necesario contar con medios ricos en azúcares fermentables. Existe un gran número de trabajos realizados con jugos, melazas, residuos lignocelulósicos, para la producción de etanol por levaduras. Por ejemplo, Laopaiboon *et al.* (2007) utilizaron el jugo de sorgo dulce para producir etanol por medio de *S. cerevisiae* TISTR 5048, en donde obtuvieron 100 g/L de etanol, con un rendimiento y una productividad de, 0.42 g/g y 1.67 g/Lh respectivamente, al llevarse a cabo la fermentación por lote.

Las levaduras llamadas *no-Saccharomyces* están recibiendo cada vez más atención en la producción de etanol, ya que han presentado numerosas contribuciones debido a sus altos rendimientos de producto. Las especies que han sido objeto de investigación para la producción de vino, hasta el momento, incluyen los géneros de *Candida*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota*, *Brettanomyces*, *Saccharomycodes*, *Pichia* y *Williopsis* (Jolly *et al.*, 2006).

Una alternativa para mejorar el proceso de fermentación alcohólica, es el empleo de especies de levaduras que posean características de interés que logren altos rendimientos y productividades, por lo cual se incrementará la eficiencia del proceso (Strehaiano *et al.*, 2006). Por ello, es importante conocer e identificar, que especie de levadura será utilizada para llevar a cabo el proceso de fermentación, debido a la necesidad de diferenciar grupos y especies que taxonómicamente se encuentran muy cerca, pero que poseen atributos muy diferentes en lo que respecta a su capacidad fermentativa (Meléndez y Herrera, 2011).

2.5.1. Características deseables en levaduras para la producción de etanol

Se han definido características deseables en las levaduras que promoverán las mejoras en procesos fermentativos, estas características son: la fácil propagación, genéticamente estables, resistentes a etanol, osmotolerantes, termotolerantes, que presenten actividad Killer, resistentes a compuestos tóxicos, capaces de utilizar diferentes sustratos, ácido tolerantes, deficientes respiratorias (Panchal *et al.*, 1980).

2.5.1.1. Osmotolerancia

Las levaduras resistentes a altas concentraciones de azúcar se denominan osmotolerantes ya que son capaces de adaptarse a potenciales de agua (a_w) muy bajos y a presiones osmóticas elevadas. Existen varias respuestas fisiológicas de las levaduras al ser expuestas a elevadas concentraciones de azúcares, incluyendo flujo de salida de agua intracelular, la reducción del volumen de la vacuola, aumento en los intermediarios glicolíticos, y la acumulación de osmolitos en el citosol (Pitt *et al.*, 2009).

Este tipo de levaduras presentan ciertas propiedades que les permiten la adaptación a tales condiciones de a_w reducida. La principal es la capacidad de acumular en su interior polioles (arabitol, manitol, arabinitol o glicerol) implicados en la osmorregulación, y que al acumularse en niveles altos, protegen a las enzimas intracelulares en condiciones de estrés (Deak y Beuchat, 1996).

Se ha reportado que la máxima concentración tolerante de glucosa para levaduras del género *Saccharomyces* ha sido de 200 g/L (Ortiz-Zamora, 2006; Walker *et al.*, 1998), sin embargo, algunas cepas han sido capaces de crecer a concentraciones alrededor de 250 g/L, pero debido a la elevada concentración de sustrato inicial en el medio, la velocidad de producción disminuye (Walker *et al.*, 1998).

2.5.1.2. Resistencia a etanol

Se han buscado diversas maneras de contrarrestar la inhibición por producto en la fermentación alcohólica, por ello se han buscado levaduras que presenten la capacidad de crecer y fermentar a concentraciones elevadas de etanol en el medio. La concentración máxima de etanol producido, es el resultado de la capacidad intrínseca de diferentes cepas de levadura utilizadas en fermentaciones alcohólicas para tolerar etanol (Querol y Fleet, 2006).

Se han reportado diversos métodos para definir tolerancia al etanol, de los cuales el método más ampliamente empleado para la determinación de la tolerancia al etanol implica la supresión del crecimiento celular en presencia de etanol exógeno. Otro método utilizado consiste en medir la relación de las velocidades de fermentación en la ausencia de etanol comparadas con los que contienen altos niveles de etanol. Por último, se ha propuesto que la inhibición de la capacidad fermentativa es el mejor indicador de tolerancia al etanol, el cual puede ser observado a través de la cantidad de etanol resultante de la fermentación de azúcar (Casey e Ingledew, 1986).

Diversos autores han demostrado que la viabilidad y la velocidad del crecimiento celular decrecen al ser expuestas a altas concentraciones de etanol. Brown *et al.* (1982) observaron que a concentraciones por arriba de 13 % de etanol en el medio, existía una inhibición completa en el crecimiento de levaduras.

Por otra parte, Holzberg *et al.* (1967), observaron que en cepas del género *Saccharomyces* la concentración máxima tolerada de etanol fue de aproximadamente 70 g/L.

Pina *et al.* (2004) mencionan que especies no-*Saccharomyces* pueden sobrevivir a las concentraciones crecientes de etanol producido en la fermentación, con el máximo de tolerancia a 6% v/v. Sin embargo, observaron que, al efectuar cambios en los lípidos de la célula, inducidos por ciertas condiciones de cultivo, incrementaban la adaptación de las levaduras a etanol.

2.5.1.3. Termotolerancia

Con respecto a la temperatura, la mayoría las levaduras generalmente crecen bien en ambientes cálidos. Sin embargo, es muy importante en la industria utilizar levaduras que crezcan a temperaturas elevadas debido a que las fermentaciones industriales suelen llevarse a cabo en ambientes expuestos a altas temperaturas, que aunado con al calentamiento de los medios de fermentación por las reacciones metabólicas exotérmicas, provoca un incremento de temperatura en los fermentadores que puede llegar a superar los 40 °C, provocando estrés térmico y disminuyendo la productividad de etanol (Hernández *et al.*, 1986).

El uso de levaduras termotolerantes u otros organismos termófilos permite abaratar el proceso, ya que se evita el uso de sistemas de enfriamiento costosos. Otras ventajas de la utilización de altas temperaturas en el proceso de producción de etanol son el aumento de la productividad, la reducción de los riesgos de contaminación y una mayor facilidad en la recuperación del producto (Querol y Fleet, 2006).

El concepto de levaduras termotolerantes no está claramente definido en la literatura, según algunos investigadores (D'Amore *et al.*, 1989) las levaduras termotolerantes son aquellas capaces de crecer a temperaturas superiores a 40 °C. Las especies de levaduras más resistentes al calor incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *P. membranifaciens*, *P. anómala*, *P. galeiformis* y *Candida albicans*, *Clavispora lusitania*, *I. orientalis* y *Schizosaccharomyces pombe* (Lee *et al.*, 1993).

En otros reportes se consideran termotolerantes a las levaduras con crecimiento en el rango de 33-35 °C y termófilas a las levaduras capaces de crecer a temperaturas superiores a 48°C (Morimura *et al.*, 1997).

2.5.1.4. Compuestos tóxicos presentes en hidrolizados lignocelulósicos

Con el aprovechamiento integral de los residuos lignocelulósicos para producción de etanol de segunda generación a escala industrial, se han desarrollado diversas técnicas de obtención de azúcares a partir de ellos mediante procesos ácidos o enzimáticos, ya que los materiales lignocelulósicos están compuestos de polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) que representan entre el 60-80% del total del material, la lignina y otras sustancias que no forman parte de la pared celular (Delgenes *et al.*, 1998).

La hidrólisis ácida, en la cual no sólo obtienen azúcares provenientes de la hidrólisis y la solubilización de la celulosa y hemicelulosa sino que, debido a las altas temperaturas y condiciones ácidas utilizadas en este tratamiento, se originan una serie de compuestos que pueden actuar como inhibidores potenciales de la fermentación (Larsson *et al.*, 2000).

La hemicelulosa es degradada originando dos compuesto derivados del furano: el furfural, formado a partir de la degradación de las pentosas (xilosa y arabinosa) y el 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), formado como consecuencia de la degradación de las hexosas (glucosa, manosa y galactosa); y a partir de la hidrólisis de los restos acetilos de la hemicelulosa se origina ácido acético (Rangel, 2006; Oliva-Domínguez, 2003).

En cuanto a los efectos producidos por el furfural sobre las levaduras en las fermentaciones alcohólicas, se encuentran: la disminución de la productividad volumétrica de etanol, el descenso de la productividad específica de etanol y la disminución de la producción de biomasa; dichos efectos se manifiestan de la misma manera para el 5-HMF, aunque en menor proporción, debió a que la toxicidad por éste compuesto es menor que la del furfural. La toxicidad por ambos compuestos puede ocasionar, daño en la membrana plasmática de la célula o la inhibición de las enzimas glicolíticas (Oliva-Domínguez, 2003).

El ácido acético también es el responsable de inhibir el crecimiento celular y la capacidad fermentativa de diversas levaduras, el efecto tóxico depende del pKa de los ácidos y del pH del medio ya que solo la forma no disociada de los ácidos penetra en la célula por difusión, donde, debido al mayor pH intracelular se disocia, provocando un descenso del pH que debe ser compensado por una ATPasa de membrana que expulsa los protones al exterior. Cuando la concentración de ácido es muy alta, la capacidad de eliminar los protones disminuye, lo que provoca la muerte celular a consecuencia de la concentración de ácido en el interior (Smith *et al.* 1995).

Delgenes *et al.* (1998) y Hongzhi *et al.* (2011) han reportado concentraciones críticas de inhibidores presentes en hidrolizados lignocelulósicos, para ácido acético de 6 g/L, y de 1-2 g/L de furfural y 5-HMF, al utilizarse cepas del género *Saccharomyces*, *Pichia* y *Candida*.

2.5.1.5. Actividad Killer

El fenotipo Killer parece estar ampliamente distribuido dentro de muchos géneros de levaduras aisladas a partir de diversas fuentes. Este fenotipo fue descubierto en cepas del género *Saccharomyces* por Bevan y Makower (1963).

El interés en la actividad killer en levaduras para aplicaciones industriales ha aumentado recientemente ya que pueden ser utilizadas como un antimicrobiano potencial ante contaminaciones por levaduras, hongos y bacterias debido a su amplio espectro (Ortiz-Zamora, 2006).

Los procesos fermentativos, en su mayoría, no utilizan medios estériles, lo que permite la aparición de cepas de levadura silvestres procedentes de la materia prima a fermentar.

Las levaduras con actividad Killer pueden producir proteínas o glicoproteínas tóxicas que causan la muerte a levaduras sensibles a estas toxinas. Las toxinas killer provocan alteraciones a nivel de la membrana plasmática, originando la salida de sustancias de bajo peso molecular como nucleótidos, ATP, aminoácidos y iones, provocando con esto una alteración del gradiente electroquímico de la célula con la consiguiente muerte celular (Álvarez *et al.*, 2007).

La actividad Killer puede representar uno de los mecanismos antagónicos en levaduras en las fermentaciones espontáneas. Se han encontrado tres grupos de actividad de la toxina Killer en cepas del género *Saccharomyces* (K1, K2 y K3) y 5 sensibles, sin embargo los grupos más estudiados son los K1 y K2. El K2 es el más utilizado en la industria de fermentaciones alcohólicas ya que esta toxina requiere un rango de pH de 2.9 y 4.9 el cual coincide con el del vino, se ha reportado, que las temperaturas por arriba de los 25 °C desestabilizan la producción de toxinas Killer (Shimizu *et al.*, 1985).

2.6. Aislamiento e identificación de levaduras

El aislamiento de levaduras ha sido de vital importancia para la obtención de cepas de interés en las fermentaciones alcohólicas, principalmente para la producción de vinos. La elaboración de vino es realizada por fermentaciones alcohólicas espontáneas, utilizando cepas de levadura presentes de forma natural en: las bodegas, viñedos y en las propias uvas (Querol y Fleet, 2006).

Las levaduras autóctonas producen vinos de alta calidad y de sabor único; sin embargo, son impredecibles, pudiendo contribuir con el deterioro del producto. Por lo tanto, seleccionar cepas adecuadas para cada tipo de proceso fermentativo podría llevar a mejorar la calidad del producto deseado (Barnett *et al.*, 2000).

Las levaduras han sido tradicionalmente aisladas a partir de pulpa de fruta y el zumo industrializado, así como de otros alimentos naturales o procesados. Esto se debe a su asociación con sustratos azucarados y la consiguiente participación en diversos procesos de fermentación (Trindade *et al.*, 1999).

Se han reportado una gran cantidad de aislamientos de levaduras a partir de diferentes materiales, como jugos, melazas, variedades de plantas, fermentación de vinos. Los criterios utilizados para la selección de cepas consisten en una sucesión de pruebas para determinar la ausencia o presencia de determinados caracteres que se consideran importantes para el proceso que se lleva a cabo (Carvajal-Barriga *et al.*, 2011).

Salcedo-Cárdenas (2008) aisló 27 cepas de levadura utilizando melaza de caña de azúcar, y tomando como criterio de selección la producción de etanol, resultando ser tres de ellas capaces de tolerar concentraciones de etanol entre 5 y 10% (v/v).

Por otra parte, Osho (2005) aisló e identificó 17 cepas de levadura a partir de la fermentación de jugo de marañón. Solo cuatro cepas lograron crecer a concentraciones de 15 (p/v) de glucosa y tolerar concentraciones de etanol de 10 % (v/v); tres cepas fueron identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* y una como *Saccharomyces uvarum*.

Sin embargo, en los últimos años, especies de levaduras denominadas no-*Saccharomyces* han ido adquiriendo cada vez más relevancia debido a su contribución positiva tanto en la fermentación de alimentos como de bebidas. Entre algunos de estos géneros de levaduras destacan *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Issatchenkia*, *Pichia* y *Metschnikowia*, que han sido aisladas de fermentaciones de sidra y vino, productos lácteos, embutidos y varias fermentaciones de vegetales. (Querol y Fleet, 2006; Barata *et al.* 2008).

Por ejemplo, Gschaedler Mathis *et al.* (2004), a partir de trece destilerías de tequila aislaron e identificaron cepas de levadura del género *Candida magnoliae*, *H. vineae*, *H. uvarum*, *Issatchenkia occidentalis* y *K. lactis*.

La biotecnología en levaduras es un campo en crecimiento, donde nuevas especies y sus capacidades fisiológicas, son potencialmente útiles en la búsqueda de nuevos productos; uno de los campos más prometedores relacionados con la caracterización y la identificación de la diversidad de levaduras tiene que ver con el posible uso de ellas en la producción de nuevas enzimas y productos químicos (Carvajal-Barriga *et al.*, 2011).

La identificación de levaduras se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante técnicas microbiológicas convencionales, que tienen en cuenta las características fisiológicas, morfológicas y bioquímicas de las cepas. Por otro lado, las técnicas moleculares desarrolladas actualmente se han convertido en una herramienta valiosa para la identificación y clasificación de levaduras. Estas técnicas se basan en el análisis de los ácidos nucleicos extraídos de los microorganismos en forma directa, o bien de una muestra conteniendo el microorganismo en cuestión (Rodríguez-Herrera *et al.*, 2009).

2.6.1. Métodos de caracterización morfológica y fisiológica de levaduras

Los análisis morfológicos que son utilizados para la caracterización de cepas de levaduras, consideran diversos factores como el color: si la colonia es blanca, crema, amarillenta, naranja, rosa, roja, café oscuro o negro; el tamaño de la célula que oscila alrededor de 2 a 25 μm de largo; forma: si son esféricas, elipsoidales, cilíndricas, anchas, angostas; y características del contorno de la cepa si es lisa, rugosa, brillante, opaca (Pitt y Hocking, 2009).

Estas características pueden variar de acuerdo a las condiciones de cultivo (Querol y Fleet, 2006) por lo que, para evaluar la morfología, se utilizan también medios selectivos que consisten en facilitar nutricionalmente el crecimiento de una población microbiana específica, dependiendo de las habilidades de producción de un metabolito de interés o de la capacidad de crecimiento en condiciones de estrés (Pitt y Hocking, 2009).

Las principales pruebas fisiológicas que se utilizan en la identificación de levaduras son las asimilación de compuestos nitrogenados, requerimientos vitamínicos, asimilación de fuentes de carbono, termotolerancia (Querol y Fleet, 2006).

Generalmente este tipo de técnicas son tardadas, suelen llevarse a cabo en un periodo de 2 ó 3 semanas, ya que requieren de la realización de muchas pruebas para lograr una correcta identificación, sin embargo, los resultados pueden resultar ambiguos.

En consecuencia, los métodos moleculares se han convertido en la mejor opción para la identificación rápida y precisa en muestras heterogéneas procedentes de la industria, de origen clínico y ambiental. Los datos obtenidos del estudio del genoma, han generado cambios importantes en la taxonomía de géneros y especies y han contribuido al esclarecimiento de las relaciones filogenéticas entre los grupos taxonómicos de estos microorganismos (Kurtzman *et al.*, 2011).

2.6.2. Métodos de caracterización molecular de levaduras

En la actualidad, las técnicas moleculares fueron desarrolladas como una alternativa a los análisis morfológicos y fisiológicos para la identificación de microorganismos, entre las que se encuentran: la especificidad, pudiendo detectar solo la molécula o microorganismo de interés; la sensibilidad, ya que son capaces de detectar la presencia de un solo microorganismo; la rapidez con que se lleva a cabo la identificación, la cual puede realizarse en menos de 24 horas y la automatización del proceso, permitiendo tener un diagnóstico en un menor tiempo y reducir los costos (Rodríguez-Herrera *et al.*, 2009).

Existen técnicas que se utilizan con frecuencia como lo son: la secuenciación de genes; el estudio del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) de las regiones ribosomales, polimorfismos de ADN amplificado al azar (RAPD); electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (PCR-DGGE) empleando iniciadores universales; y PCR en tiempo real (Kurtzman, 1998).

Este tipo de técnicas son herramientas para la identificación y clasificación taxonómica de microorganismos, están basados en el análisis de secuencias de ADN genómico, con el uso de secuencias cortas específicas de oligonucleótidos con técnicas de PCR.

Una de las técnicas más utilizada para establecer la relación filogenética entre las especies es la secuenciación de genes; para que esta pueda llevarse a cabo es necesario saber que gen debe ser secuenciado (Kurtzman, 1998).

La región genómica utilizada para detectar ADN de levaduras e identificar especies de éstas, es la que incluye los genes ribosomales (18S, 5.8S y 28S). Estos genes contienen secuencias conservadas comunes a todos los hongos y levaduras, así como también, dominios variables y regiones espaciadoras internas (ITS), altamente variables, que pueden ser utilizadas para la identificación de especies implicadas (Kurtzman, 1998).

Las regiones espaciadoras internas (ITS) se encuentran en el genoma en un alto número de copias, se estima alrededor de unas 150 repeticiones en tándem de los genes ribosómicos, lo que garantiza la sensibilidad del método (Dammann *et al.*, 1995).

La amplificación de las regiones de ADN ribosómico, utilizando los iniciadores ITS-1 e ITS-4, por medio de PCR y la secuenciación de los fragmentos amplificados, puede constituir una herramienta útil para el diagnóstico de la especie dada la estabilidad de la técnica y la obtención de un patrón único. La similitud de los patrones generados permite establecer correlaciones entre especies y cepas, y la existencia de patrones únicos permite la identificación (White *et al.*, 1990; Kurtzman, 1998).

3. JUSTIFICACIÓN

- La efectividad de las fermentaciones alcohólicas está basada en una serie de factores importantes, en donde el material biológico que se utiliza para llevarse a cabo, juega un papel fundamental. Las cepas de levaduras deben presentar las características adecuadas, para lograr un mejoramiento en el proceso de fermentación.
- Se ha establecido que es más efectivo el uso de cultivos autóctonos de levaduras ya que se encuentran adaptadas a las condiciones climáticas de la zona y a la materia prima a fermentar.
- Debido a la problemática que existe en el proceso de fermentación alcohólica: inhibición por producto, la inhibición por sustrato y la contaminación; aislar y seleccionar levaduras procedentes de la fermentación del jugo de sorgo dulce que contrarresten estos efectos, permitirá optimizar e impulsar a una mejora progresiva en el rendimiento y productividad del proceso.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Aislar, seleccionar e identificar cepas de levaduras productoras de etanol durante la fermentación espontánea del jugo de sorgo dulce.

4.2. Objetivos Específicos

- Aislar cepas de levaduras productoras de etanol durante la fermentación espontánea de jugo de sorgo dulce.
- Seleccionar las cepas de levaduras que presenten resistencia a etanol, osmotolerancia, termotolerancia y actividad Killer para la producción de etanol.
- Identificar las cepas de levaduras seleccionadas en la producción de etanol.
- Evaluar cinéticamente las cepas de levaduras seleccionadas en la producción de etanol en jugo de sorgo dulce.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material biológico

Para el aislamiento de levaduras se utilizó el jugo de 21 variedades de sorgo dulce de alta y baja densidad poblacional (Tabla 3), procedentes del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Cotaxtla, Veracruz.

TABLA 3. Variedades de sorgo dulce (INIFAP).

Tratamiento	Variedades de Sorgo	Tratamiento	Variedades de Sorgo
T2	RB- CAÑERO	T16	SBA-25XTOPPER
T3	ETANOL-1	T17	SBA-25XTHEIS
T4	ETANOL-2	T19	SBA-22XTAN-1
T5	DALE	T20	SBA-22XDALE
T9	SBA-25	T21	SBA-22XCAÑERO
T10	SBA-22	T22	SBA-22XTAN-2
T11	SBA-25XURJA	T23	SBA-22XDULCE
T12	SBA-25XSUREÑO	T24	SBA-22XSUREÑO
T13	SBA-25XTAN-1	T25	NORTEÑO
T14	SBA-25XCAÑERO	T26	HUASTECO
T15	SBA-25XDALE		

Las cepas aisladas de levadura fueron codificadas de la siguiente manera: S1, S2,..., S60 donde S se refiere a la fuente de la cual se partió para el aislamiento, en este caso sorgo dulce y el número al consecutivo de cada cepa aislada considerando diferencias morfológicas y macroscópicas.

5.2. Medios de cultivo

5.2.1. Medio de aislamiento y conservación

Las cepas productoras de etanol fueron aisladas a partir del jugo fermentado de las 21 variedades de sorgo, que se dejó fermentar de manera espontánea durante 36 h a 30°C y 250 rpm.

La conservación de cepas se realizó en refrigeración a 4°C y con el medio descrito en la Tabla 4. A este medio de conservación se añadió 0.1 g/L de antibiótico (gentamicina) con el fin de evitar el crecimiento bacteriano, y fue esterilizado a 121°C durante 15 min.

TABLA 4. Composición del medio de conservación.

Componente	g/L
Agar-agar	20
Glucosa	20
Extracto de Levadura	10
Antibiótico (gentamicina)	0.1

5.2.2. Medio de fermentación a nivel matraz

Las cinéticas de fermentación fueron realizadas utilizando un medio de cultivo sintético básico (Tabla 5) propuesto por Strehaiano (1984).

TABLA 5. Composición del medio de cultivo de fermentación a nivel matraz

Componente	g/L
Fuente de Carbono (Glucosa)	Variable según experimento
KH_2PO_4	5.0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4
Extracto de Levadura	1.0

El medio de fermentación a nivel matraz fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 min.

5.2.3. Medio para la determinación de la actividad Killer

Para la determinación de la actividad Killer en las levaduras seleccionadas se utilizó un medio de cultivo YPD-Agar-BM, con la composición que se presenta en la Tabla 6.

TABLA 6. Medio para la determinación de la actividad Killer.

Componente	g/L
Extracto de levadura	10
Peptona	20
Glucosa	20
Agar	30
Azul de metileno	0.003

Se ajustó el pH 4 con una solución tampón: citrato-fosfato y se esterilizó a 121°C y 15 min.

5.3. Metodología

5.3.1. Aislamiento de microorganismos

Para el aislamiento de las cepas de levadura se tomó en cuenta como criterio de selección la caracterización del jugo de sorgo dulce utilizando solo las variedades poblacionales que presentaran altas concentraciones de azúcares totales.

Estos jugos seleccionados se fermentaron de manera espontánea a 30°C y 250 rpm durante 36 h. Se tomó 1 mL del jugo fermentado y se prepararon diluciones, 1×10^{-4} y 1×10^{-5} cel/mL fueron sembradas por medio de la técnica de siembra en placa por expansión, la cual permite colonias aisladas, en un medio de cultivo de conservación.

5.3.2. Selección primaria de microorganismo

La selección de cepas de levadura se llevó a cabo de la siguiente manera: fueron tomadas del microorganismo aislado tres asadas y se disolvieron en matraces de 250 mL los cuales contenían 100 mL de medio sintético de fermentación con una concentración de glucosa de 20 g/L. Se incubaron por 12 h a 30°C y 250 rpm. Posteriormente se tomó una muestra y se inoculó en un segundo matraz a 3×10^6 células viables/mL a las mismas condiciones.

Se analizó el crecimiento, consumo de glucosa y producción de etanol a las 0, 7, 14 y 21 h, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y se seleccionaron las levaduras en base a su capacidad de producir etanol y que presentaran rendimientos por arriba del 0.35 g/g.

5.3.3. Selección secundaria de microorganismos

5.3.3.1. Condiciones de activación y fermentación

Para la activación de las levaduras, se tomaron tres asadas de las cepas seleccionadas y se disolvieron en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 100 mL de medio sintético (Tabla 5) a las mismas condiciones utilizadas en el proceso de selección

Después de transcurridas las 12 h de incubación, con el fin de disminuir la fase de adaptación del microorganismo al medio de cultivo de fermentación, la levadura fue adaptada por medio de un preinóculo, tomando el 10% del volumen a inocular en un segundo matraz, el cual fue incubado a las mismas condiciones durante 12 h, para después inocular en un tercer matraz 3×10^6 células viables/mL y se procedió a evaluar los diferentes criterios de selección secundaria, durante 60 h, 30°C y 250 rpm. Se determinó la producción de etanol y consumo de sustrato en función a rendimientos y productividades.

5.3.3.2. Determinación de la osmotolerancia

En cuanto a las pruebas de osmotolerancia, las levaduras productoras de etanol seleccionadas se probaron en medio sintético variando las concentraciones de glucosa de 100,150 y 200 g/L, con el objetivo de evaluar la capacidad de adaptación y resistencia a altas concentraciones de glucosa.

5.3.3.3. Determinación de la resistencia a etanol

La resistencia a etanol de las levaduras aisladas, fue determinada, variando las concentraciones de etanol inicial en el medio de cultivo. Las concentraciones de etanol que se utilizaron fueron de 0, 3, 6, 9% v/v. Se determinó el porcentaje de consumo de sustrato y la producción de etanol, con la finalidad de observar la resistencia a etanol por parte de las cepas seleccionadas y su capacidad de consumo de sustrato.

5.3.3.4. Determinación de la termotolerancia

Con el fin de determinar si las cepas aisladas mostraban ser resistentes a altas temperaturas y mantener su capacidad fermentativa, se llevó a cabo una variación de temperaturas en el medio a fermentar. Las temperaturas evaluadas fueron: 30, 34, 36, 38, 40°C.

5.3.3.5. Determinación de la resistencia a compuestos tóxicos

Con la finalidad de evaluar la resistencia de las levaduras en presencia de compuestos tóxicos presentes en hidrolizados lignocelulósicos, se probaron en las fermentaciones, concentraciones de ácido acético (0, 3, 7, 9, 18, 24 g/L), 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) y furfural (0,0.5,1.0, 1.5 g/L).

5.3.3.6. Determinación de la actividad Killer

La actividad Killer fue evaluada utilizando el método descrito por Rosini (1983): se activó la cepa de levadura sensible a la toxina Killer, en medio sintético (Tabla 5) a 30°C por 24 h a 250 rpm.

Posteriormente, se inocularon 25×10^6 células viables/mL en un medio conteniendo YPD-Agar-BM (Tabla 6) a 45°C, el cual se homogenizó y se vertió en cajas petri. Una vez solidificado, se procedió a hacer pozos sobre el agar, en donde se inoculó la biomasa de levadura seleccionada con posible actividad Killer por 48-72 h a 22°C. La formación de un halo de inhibición rodeado de azul alrededor del pozo donde la biomasa fue depositada, denota actividad Killer.

5.3.4. Identificación de levaduras

5.3.4.1. Extracción y purificación de ADN

Se hicieron crecer las cepas seleccionadas durante 24 h en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 100 mL de medio sintético (Tabla 5). Se separó la biomasa por centrifugación (4 °C; 8 min; 6000 rpm) y fue resuspendida en solución amortiguadora Tris-EDTA (TE) para ser conservada a 4 °C.

Se tomó una alícuota de 1 mL de dicha suspensión y se centrifugó (4 °C; 10 min; 6000 rpm) y se desechó el sobrenadante, y el paquete celular se sometió a ruptura mecánica con perlas de vidrio (40 s en vortex, 1 min en hielo por cuatro ciclos); se adicionó solución amortiguadora TE e inmediatamente se procedió a centrifugar (5 min; temperatura ambiente; 14000 rpm) con la finalidad de recuperar la fase acuosa y transferirla a un tubo eppendorf. La fase acuosa se sometió a purificación mediante el método fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, seguido de la precipitación por etanol-acetato de potasio (acetato de potasio 3M, 0.1 v/v; etanol absoluto, 2.5 v/v) (Sambrook *et al.*, 2001).

5.3.4.2. Amplificación de las regiones ITS del ADN por PCR

Se realizó la amplificación de la región ITS del ADN de las cepas de levaduras aisladas, por medio de PCR, para lo cual se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores ITS1-ITS4 (White *et al.*, 1990) (Tabla 7).

Para realizar la amplificación se utilizó 50 µL de reacción, que contenía: solución amortiguadora Colorless 5X, 10 µL; Mezcla de oligonucleótidos, 200 mM; oligonucleótido iniciador directo, 0.1mM; oligonucleótido iniciador inverso, 0.1 mM; enzima ADN Taq polimerasa, 2.5 Unidades; ADN templado, 10-50 ng.

TABLA 7. Oligonucleótidos iniciadores de la región ITS del ADN nuclear (White *et al.*, 1990).

	Oligonucleótido	Secuencia
Directo	ITS1	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'
Reverso	ITS4	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'

La amplificación de la región ITS del ADN de las cepas de levaduras, se llevó a cabo según las condiciones descritas en la Tabla 8, en un termociclador marca Bio Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). Para purificar los fragmentos resultantes, se utilizó un kit GeneClean®II (Bio101 Inc., California, USA) de acuerdo con las especificaciones de la compañía.

TABLA 8. Condiciones para amplificación de ITS del ADN nuclear por PCR (White *et al.*, 1990).

Proceso	T (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	1	25
Alineamiento de los oligonucleótidos iniciadores (ITS 1 –ITS 4)	55	1	25
Extensión	72	1	25
Extensión final	72	5	1

5.3.4.3. Determinación del tamaño de los fragmentos de PCR

Para llevar a cabo la determinación del tamaño de los fragmentos amplificados, se utilizó el método de electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos se separaron a través de una matriz de agarosa (1 %; 95V; 30 min), utilizando una solución amortiguadora TBE 5X (Tris: ácido bórico: EDTA 0.5M pH 8.0) (Sambrook *et al.*, 2001), y una solución amortiguadora de carga que contenía azul de bromofenol y xilencianol, ambos al 0.4% (Sambrook *et al.*, 2001).

Se utilizó un fotodocumentador (Gel DocTM XR+, BioRad) transiluminado en luz UV para observar las bandas en el gel. Posteriormente, las mezclas de PCR se purificaron haciendo uso de un kit de purificación GeneClean®II (Bio101 Inc., California, USA) de acuerdo con las especificaciones de la compañía.

5.3.4.4. Secuenciación de los fragmentos amplificados

La secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR se llevó a cabo en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA), del Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Mor., México. Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias de referencia en Genbank, haciendo uso de la base de datos NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) a través de la herramienta BLAST. Se construyó un árbol filogenético después de haber determinado la identidad de cada cepa seleccionada, utilizando los softwares *MEGA* versión 4 y *ClustalW2*, incluyendo las secuencias reportadas para ser usadas como referencia y las cepas de estudio.

5.3.5. Fermentación en jugo de sorgo dulce

Se activaron las cepas seleccionadas en 100 mL de medio sintético (Tabla 4), durante 12 h; 30°C; 250 rpm, ajustando el pH a 5.5 para todas las etapas del proceso. Para disminuir la fase de adaptación de las levaduras, se realizó un preinóculo en 100 mL de jugo de sorgo dulce enriquecido con KH_2PO_4 (5 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.8 g/L) y extracto de levadura (1.0 g/L), al cual se le inocularon 3×10^6 células viables/mL y se dejaron crecer durante 12 h; 30°C; 250 rpm.

Posteriormente se inocularon 3×10^6 células viables/mL en 300 mL de jugo de sorgo dulce enriquecido con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 g/L) y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.8 g/L), el cual se hizo fermentar durante 24 h; 30°C; 250 rpm, para evaluar la producción de etanol en función de rendimientos y productividades, el consumo de sustrato y la viabilidad celular.

5.4. Métodos analíticos

5.4.1. Cuenta celular

Las células se contaron con ayuda de una cámara de Thoma. Las muestras fueron diluidas de tal manera que el número de células viables/mL durante la cuenta en la cámara se encuentre en un rango de 30 a 300 células. Cada conteo se realizó a partir de 5 cuadros grandes (0.25 mm) (Figura 1), sabiendo que el volumen de cada cuadro es de 4×10^6 mL. La concentración de células (X) por mililitro está dada por la ecuación:

$$X = \frac{N \cdot d}{4n} \cdot 10^{-6}$$

Donde:

N: Número de células contadas

d: Dilución

n: Número de cuadros grandes

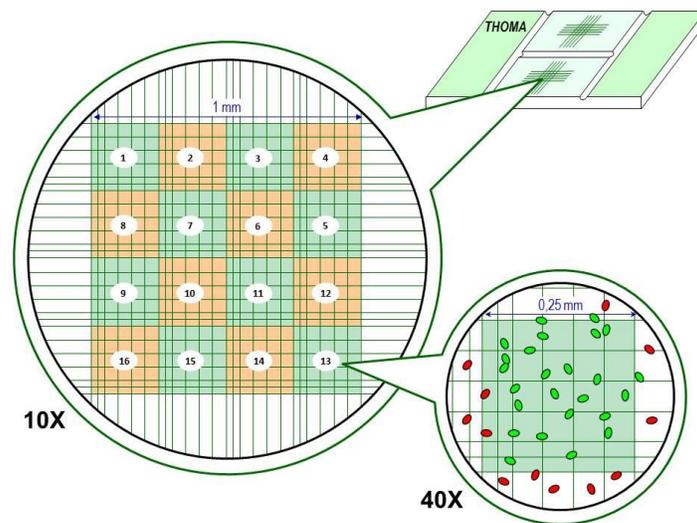


FIGURA 4. Cámara de Thoma (Distribución de cuadrícula).

5.4.2. Viabilidad celular

La viabilidad celular, se estimó a través del conteo de células vivas y muertas al microscopio después de la coloración con azul de metileno, de acuerdo con el método de Lange *et al.* (1993). La muestra se mezcló con el colorante en relación 1:1 y se dejó reposar 10 min. Después de transcurrido el tiempo de contacto, se realizó el conteo al microscopio, determinando como células vivas a todas aquellas que no presentaron coloración, mientras que las células muertas fueron coloreadas de azul.

Lo cual puede atribuirse a dos razones: que la membrana de las células muertas se debilita, permitiendo que el azul de metileno penetre a la célula, a diferencia de las células vivas, las cuales conservan la permeabilidad de su membrana; ó a que siendo el azul de metileno un colorante de óxido-reducción, sea reducido por una hidrogenasa y este se vuelva incoloro (forma reducido) si la célula está viva (Aguilar-Uscanga, 1998).

Para la preparación del azul de metileno, se disolvió 1g de azul de metileno en 1L de solución aforada de citrato de sodio dihidratado al 2% (p/v), filtrado por una membrana de nitrocelulosa (0.22 μm) marca Millipore. El reactivo se conservó a 4°C y en ausencia de luz.

Este método permite inocular con seguridad la cantidad exacta de levaduras viables para las fermentaciones realizadas. El porcentaje de viabilidad (%V) está dado por la siguiente fórmula:

$$\%V = \frac{N_v}{N_t} \cdot 100$$

Donde:

N_v: Número de células vivas

N_t: Número de células vivas y muertas

5.4.3. Análisis de formación de producto y consumo de sustrato

La concentración de glucosa, etanol, ácido acético, 5- hidroximetil-furfural y furfural se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando un equipo marca Waters modelo 2695, con un detector de Índice de refracción modelo 2414, marca Waters y una columna Shodex, SH 1011, específica para separación de azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes acoplada a una columna de exclusión molecular e intercambio catiónico. La fase móvil que se utilizó fue de H₂SO₄ 5 mM, con un flujo de 0.6 mL/min.

Las muestras obtenidas de las cinéticas de fermentación en medio sintético, fueron centrifugadas (10 min; 4°C; 10,000 rpm) y congeladas.

Para las muestras de las fermentaciones de jugo de sorgo dulce, fue necesario realizar una hidrólisis ácida y detoxificación; a 1mL de muestra se le adicionó 1 mL de HCl 4M (baño maría, 60°C, 10 min), se tomó 1mL y se adicionó 125 µL de BaO (0.3 M) y 125 µL ZnSO₄ (5% p/v), se dejó reposar la muestra por 10 min y se centrifugó (10 min; 4°C ; 10,000 rpm), antes de ser inyectadas al cromatógrafo. Las muestras de medio sintético y las muestras detoxificadas de jugo de sorgo dulce se filtraron con acrodiscos (0.22 µm) marca Millipore antes de ser inyectadas al HPLC.

El software utilizado por el equipo fue Empower, que integra el área del pico eluido y la concentración de la muestra se determina por la correlación con una mezcla de estándares previamente definidos.

5.5. Análisis de datos experimentales

5.5.1. Rendimientos y productividades

La ecuación de rendimiento $Y_{P/S}$ (g de producto/g de sustrato consumido) que expresa el producto con respecto al sustrato es:

$$Y_{P/S} = \frac{Pf - P0}{S0 - Sf}$$

Donde:

Pf: Producto final (g/L)

P0: Producto inicial (g/L)

S0: Sustrato inicial (g/L)

Sf: Sustrato final (g/L)

La ecuación de productividad Q_p (g de producto/litro/hora) que expresa la velocidad de formación de producto es:

$$Q_p = \frac{Pf}{t_f}$$

Donde:

Pf: Producto final (g/L)

t_f: Tiempo final (h)

5.5.2. Inhibición celular

La ecuación de porcentaje de inhibición celular es:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{dXC0 - dXCf}{dXC0} \cdot 100$$

Donde:

dXC0: Diferencia de la concentración de biomasa sin inhibidor (cel/mL)

dXCf: Diferencia de la concentración de biomasa con inhibidor (cel /mL)

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Caracterización del jugo de sorgo

Primero se caracterizó el jugo de sorgo de las 21 variedades de sorgo dulce de alta y baja densidad proporcionadas por el INIFAP, el cual se obtuvo con la ayuda de un molino de rodillos, con la finalidad de conocer el volumen de jugo, pH y azúcares totales. En las Tablas 9 y 10, se presenta la cantidad de jugo de sorgo por Kg de tallo fresco y el contenido de azúcares totales obtenidos por las variedades de alta y baja densidad respectivamente.

TABLA 9. Cantidad de jugo de sorgo por Kg de tallo fresco y contenido de azúcares totales en las variedades de sorgo dulce de alta densidad.

Variedades de Sorgo dulce	Jugo de sorgo/Tallo (mL/Kg)	Azúcares totales (g/L)	Variedades de Sorgo dulce	Jugo de sorgo/Tallo (mL/Kg)	Azúcares totales (g/L)
RB- CAÑERO	290.28	27.3	SBA-25XTOPPER	369.57	74.9
ETANOL-1	444.80	87.2	SBA-25XTHEIS	387.58	56.8
ETANOL-2	436.14	96.7	SBA-22XTAN-1	562.32	85.6
DALE	423.72	138.5	SBA-22XDALE	394.02	89.4
SBA-25	394.82	81.2	SBA-22XCAÑERO	413.67	32.7
SBA-22	361.11	51.0	SBA-22XTAN-2	398.60	57.3
SBA-25XURJA	336.68	79.4	SBA-22XDULCE	315.20	47.6
SBA-25XSUREÑO	357.14	61.4	SBA-22XSUREÑO	386.11	20.9
SBA-25XTAN-1	347.97	92.3	NORTEÑO	371.43	25.7
SBA-25XCAÑERO	335.31	24.5	HUASTECO	387.64	47.6
SBA-25XDALE	290.11	73.8			

TABLA 10. Cantidad de jugo de sorgo por Kg de tallo fresco y contenido de azúcares totales en las variedades de sorgo dulce de baja densidad.

Variedades de Sorgo dulce	Jugo de sorgo/Tallo (mL/Kg)	Azúcares totales (g/L)	Variedades de Sorgo dulce	Jugo de sorgo/Tallo (mL/Kg)	Azúcares totales (g/L)
RB- CAÑERO	304.35	26.88	SBA-25XTOPPER	434.67	41.60
ETANOL-1	488.15	85.12	SBA-25XTHEIS	388.42	63.51
ETANOL-2	441.53	66.25	SBA-22XTAN-1	387.95	105.62
DALE	439.72	78.77	SBA-22XDALE	412.59	81.83
SBA-25	378.75	48.31	SBA-22XCAÑERO	364.58	29.81
SBA-22	277.46	31.73	SBA-22XTAN-2	425.37	50.54
SBA-25XURJA	411.64	56.55	SBA-22XDULCE	250.65	30.50
SBA-25XSUREÑO	357.43	27.24	SBA-22XSUREÑO	295.62	67.67
SBA-25XTAN-1	412.50	41.94	NORTEÑO	392.64	13.43
SBA-25XCAÑERO	359.04	15.40	HUASTECO	422.54	55.99
SBA-25XDALE	393.65	38.98			

Se observó que las variedades de sorgo dulce de alta densidad presentaron altos contenidos de azúcares fermentables, aproximadamente entre 50 y 140 g/L, en comparación con las variedades de baja densidad que se encontraron entre 30 y 100 g/L.

El volumen obtenido por variedad de sorgo se situó entre 600-900 mL para variedades de alta densidad y entre 450-700 mL para variedades de baja densidad. Los valores aproximados de 58.62 g de azúcares totales/ kg tallo fresco, son similares a los reportados por Almodares *et al.* (2008) para diferentes cultivos de sorgo dulce, el pH de ambas densidades de población se encontró alrededor de 5.4 y 5.55, el cual favorece el desarrollo de levaduras que pudieran estar presentes en estos jugos, y también para el uso de esta materia prima sin tener que ajustar los valores de pH para su uso directo en proceso de fermentación alcohólica.

6.2. Aislamiento de levaduras

A partir de variedades de alta densidad de sorgo dulce se procedió a efectuar el aislamiento, ya que mostraron concentraciones superiores de azúcares fermentables en comparación con las variedades de baja densidad, por lo tanto se esperaba que las levaduras que encontraran en estos jugos pudieran ser osmotolerantes.

Se aislaron 60 cepas de levaduras productoras de etanol, de las cuales en la Figura 5 se muestran algunas cepas de levaduras aisladas.

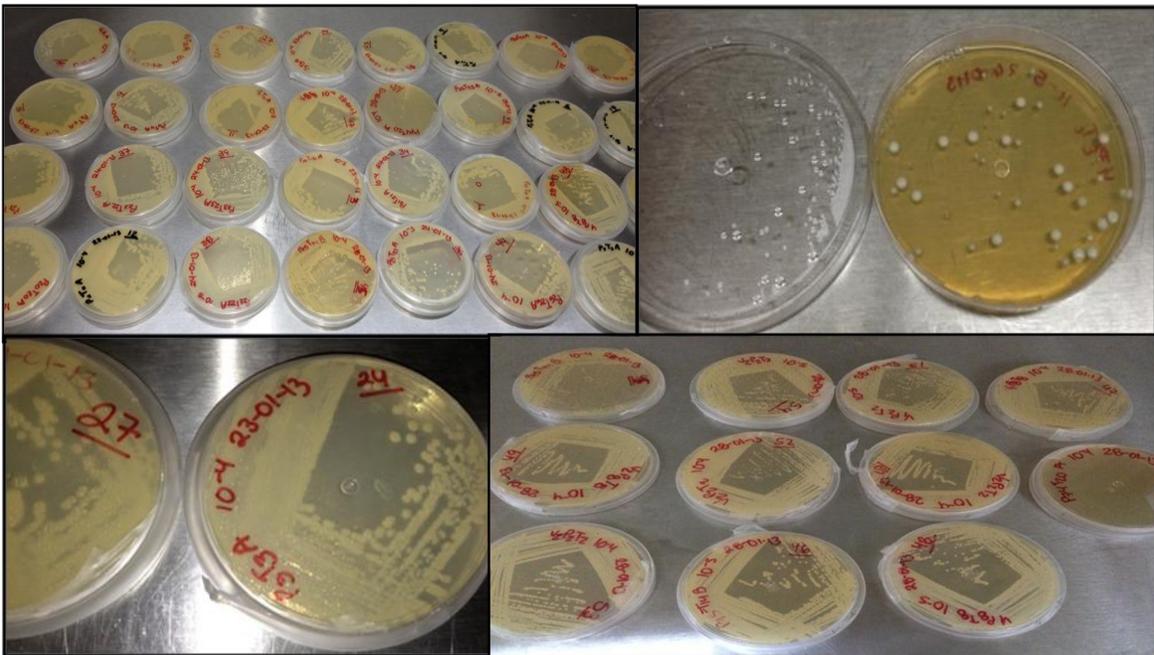


FIGURA 5. Algunas de las cepas de levadura aisladas de la fermentación espontánea de jugo de sorgo dulce.

La morfología colonial de estas cepas tuvo las siguientes características: color blanco, crema y amarillenta, con apariencia viscosa, cremosa, convexa, rugosa en la periferia, con brillo; algunas de las colonias aisladas son mostradas en la Figura 6. Esta morfología es la típica observada para levaduras (Pitt y Hocking, 2009).

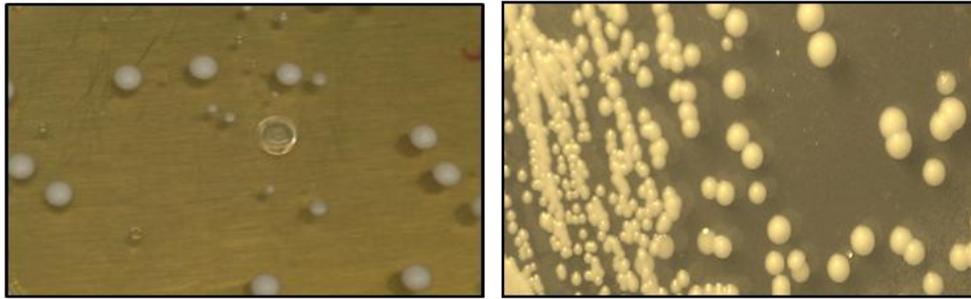


FIGURA 6. Morfología macroscópica de algunas de las cepas de levaduras aisladas a partir de la fermentación espontánea de jugo de sorgo dulce.

Con respecto a la morfología microscópica, la mayoría de las cepas aisladas tuvieron una forma elipsoide u ovoide, con gemación monopolar, y algunas de ellas tendían a agruparse en cúmulos de 5 a 6 células y cuyas dimensiones oscilaron entre 2-5 μm de ancho y 3-7 μm de longitud (Figura 7).

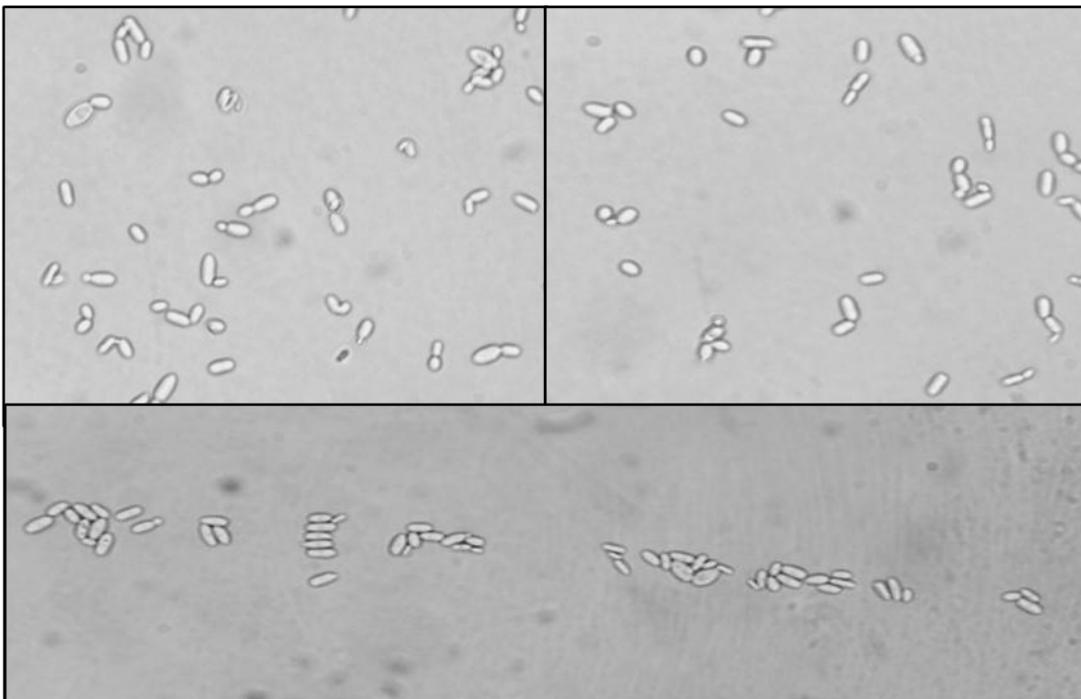


FIGURA 7. Morfología microscópica observada en ciertas levaduras aisladas de la fermentación espontánea de jugo de sorgo.

6.3. Selección de las cepas de levadura productoras de etanol

Se procedió a la selección de las levaduras aisladas, tomando como criterio de selección aquellas cepas que presentaran rendimientos de etanol por arriba de los 0.35 g/g y una eficiencia del 70 %. Se realizaron las fermentaciones en medio sintético y se evaluó la capacidad de producción de etanol de las 60 cepas aisladas. Solo 22 cepas presentaron rendimientos por arriba de 0.35 g/g. Los rendimientos obtenidos para estas 22 cepas se muestran en la Figura 8.

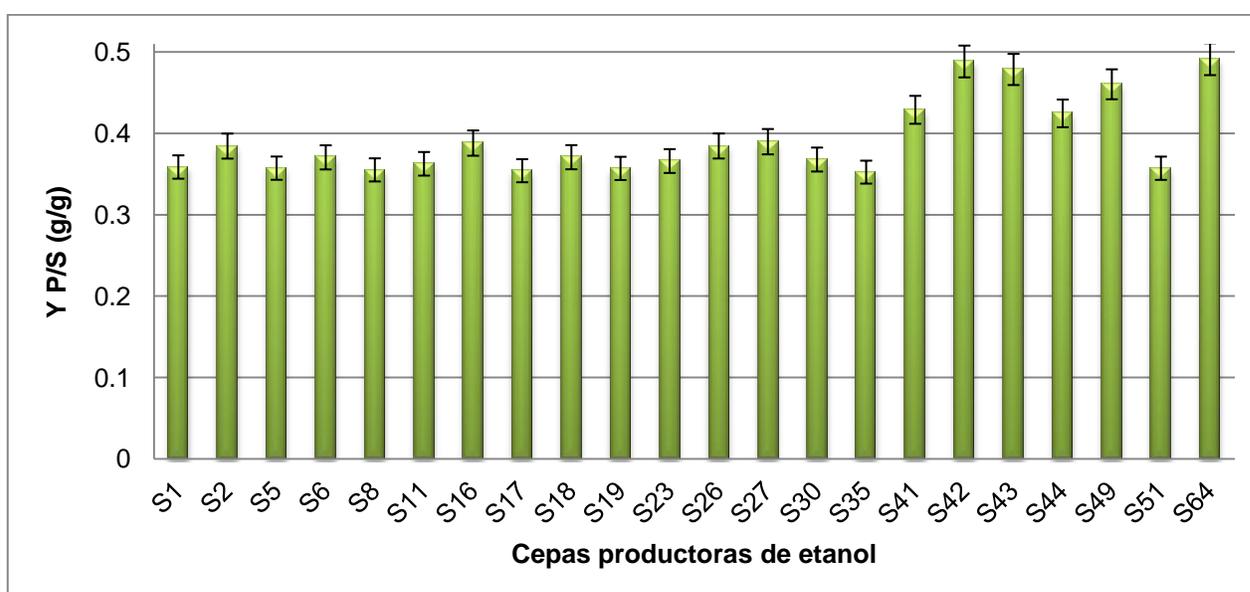


FIGURA 8. Rendimientos máximos de etanol obtenidos con las cepas aisladas de jugo de sorgo dulce.

Se puede apreciar que la mayoría de los rendimientos se situaban entre 0.35 y 0.38 g/g, sin embargo seis cepas destacaron por tener rendimientos por arriba de 0.4 g/g, que son similares a los reportados para *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, *Kluveromyces marxianus* partiendo de la misma concentración inicial de azúcares (20 g/L) (Rouhollah *et al.*, 2007). Por lo tanto las 22 cepas productoras de etanol fueron seleccionadas para continuar con la evaluación de las características deseables.

6.4. Evaluación de la osmotolerancia en las cepas aisladas de jugo de sorgo dulce

Las pruebas de osmotolerancia se llevaron a cabo con las 22 cepas productoras de etanol seleccionadas. Los resultados obtenidos mostraron que solo 18 de ellas fueron capaces de adaptarse y de crecer a altas concentraciones de sustrato (hasta 200 g/L), los cuales pueden ser comparados con los obtenidos por Ortiz-Muñiz *et al.* (2010) para una cepa de levadura aislada de melaza de caña de azúcar (*Saccharomyces cerevisiae* ITV-01), la cual tuvo osmotolerancia a concentraciones entre 100-200 g/L.

En la figura 9 se muestran las productividades de etanol para las 22 cepas seleccionadas, obtenidas a partir de las concentraciones evaluadas (100,150 y 200 g/L).

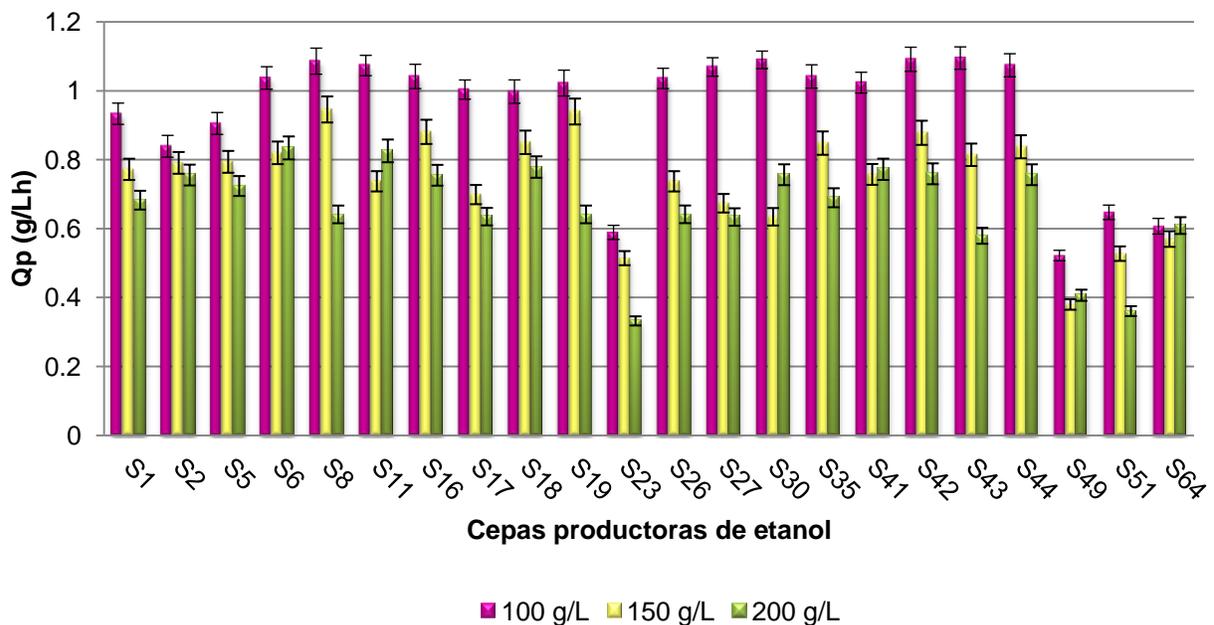


FIGURA 9. Efecto de la concentración inicial de glucosa sobre la productividad de etanol en las cepas de levadura aisladas de jugo de jugo de sorgo dulce.

La productividad de etanol se encontró alrededor de 0.8-1.0 g/Lh cuando la concentración inicial de glucosa fue de 100 g/L, las cepas mostraron una tendencia en la cual, al incrementar la concentración inicial de sustrato la productividad de etanol se veía afectada, provocando una notable disminución en ésta, cuando las cepas de levadura se encontraron en un medio de cultivo con concentraciones de 200 g/L. La misma tendencia fue observada por Ortiz-Zamora *et al.*, (2007), donde concluyeron que a altas concentraciones de sustrato, disminuye el crecimiento celular y la formación de producto, debido a los efectos que tiene el sustrato sobre las levaduras.

Las levaduras al ser expuestas a condiciones hipertónicas (mayor concentración de soluto en el medio externo) presentan una tendencia termodinámica para equilibrar la concentración de solutos dentro y fuera de la célula. Puesto que, en estas condiciones el agua fluye hacia el exterior de la célula, ésta se deshidrata y su crecimiento se ve inhibido (Strehaiano *et al.*, 1978).

Para corroborar esta tendencia se obtuvo el porcentaje de consumo de glucosa para cada cepa a las diferentes concentraciones evaluadas de glucosa (Tabla 11). Se observó, de manera similar a la productividad de etanol, que conforme aumentaban las concentraciones iniciales de sustrato en el medio, disminuía el porcentaje de consumo de glucosa.

Esto puede deberse a que a medida que la concentración de azúcar inicial en el medio de cultivo aumenta, la fase lag se prolonga, la viabilidad celular durante la fase lag disminuye y la cuenta de células viables durante la fermentación se reduce. En síntesis, el proceso de fermentación se retarda y quedan elevados los niveles de azúcar residual (Nishino *et al.*, 1985).

TABLA 11. Efecto de la concentración inicial de glucosa sobre el porcentaje de consumo de sustrato en las cepas de levadura aisladas de jugo de jugo de sorgo dulce.

CEPA	Concentraciones glucosa (g/L)			CEPA	Concentraciones glucosa (g/L)		
	100	150	200		100	150	200
	Consumo de Glucosa (%)				Consumo de Glucosa (%)		
S1	99.80 ^a	63.61 ^a	59.46 ^{ad}	S26	99.98 ^a	70.11 ^f	55.15 ^{bd}
S2	98.12 ^{ac}	56.00 ^{bd}	56.50 ^{bd}	S27	100 ^a	77.97 ^g	56.28 ^{bd}
S5	78.30 ^b	63.47 ^a	65.27 ^c	S30	100 ^a	74.92 ^g	52.56 ^f
S6	99.07 ^{ac}	56.76 ^b	56.90 ^d	S35	100 ^a	77.16 ^g	48.44 ^g
S8	100 ^a	65.41 ^a	58.98 ^a	S41	99.32 ^a	86.66 ^h	68.09 ^h
S11	100 ^a	68.14 ^c	58.08 ^d	S42	100 ^a	79.97 ^g	54.55 ^{bd}
S16	100 ^a	64.48 ^a	65.21 ^c	S43	100 ^a	76.14 ^g	51.89 ^f
S17	97.94 ^{ac}	64.48 ^a	55.49 ^{bd}	S44	100 ^a	75.32 ^g	45.86 ^g
S18	94.87 ^c	56.05 ^{bd}	55.70 ^{bd}	S49	34.51 ^d	26.54 ⁱ	28.76 ⁱ
S19	97.94 ^{ac}	53.06 ^{de}	55.20 ^{bd}	S51	34.77 ^{de}	34.18 ^j	17.08 ^j
S23	38.87 ^d	50.69 ^e	13.47 ^e	S64	65.87 ^e	57.52 ^b	42.18 ^k

No obstante esto no indica que las levaduras aisladas de jugo de sorgo dulce hayan inhibido su crecimiento y producción de etanol en el proceso fermentativo, puesto que a diferencia de Holzer (1976) y Moulin *et al.* (1984) quienes observaron que, a concentraciones por arriba de 100 g/L, la producción de etanol y el crecimiento celular se veían inhibidos. Las cepas aisladas de jugo de sorgo dulce mantuvieron su capacidad fermentativa a 200 g/L. Sin embargo las cepas S23, S49, S51 y S64 presentaron productividades y consumos de glucosa bajos en las tres concentraciones iniciales de glucosa evaluadas, por lo cual se descartaron para continuar con las siguientes pruebas.

6.5. Evaluación de la resistencia a etanol en las cepas aisladas de jugo de sorgo dulce

En cuanto a la resistencia a etanol, diversos autores, han determinando la relación entre la actividad fermentativa en ausencia y en presencia de una concentración dada de etanol.

A partir de esto, se evaluó el efecto del etanol sobre la producción de etanol y el consumo de glucosa en las 18 cepas osmotolerantes y a diferentes concentraciones de etanol (0, 3, 6, 9 % v/v). Esto debido a que se ha reportado, que el nivel máximo de etanol producido a diferentes concentraciones de etanol inicial en el medio, es un criterio para definir la tolerancia a etanol, este criterio ha sido aplicado preferentemente a especies de *Saccharomyces* empleadas en fermentaciones tipo sake (Casey *et al.*, 1986).

En la Figura 10 se observa el efecto de la concentración inicial de etanol sobre la producción de etanol en las cepas seleccionadas.

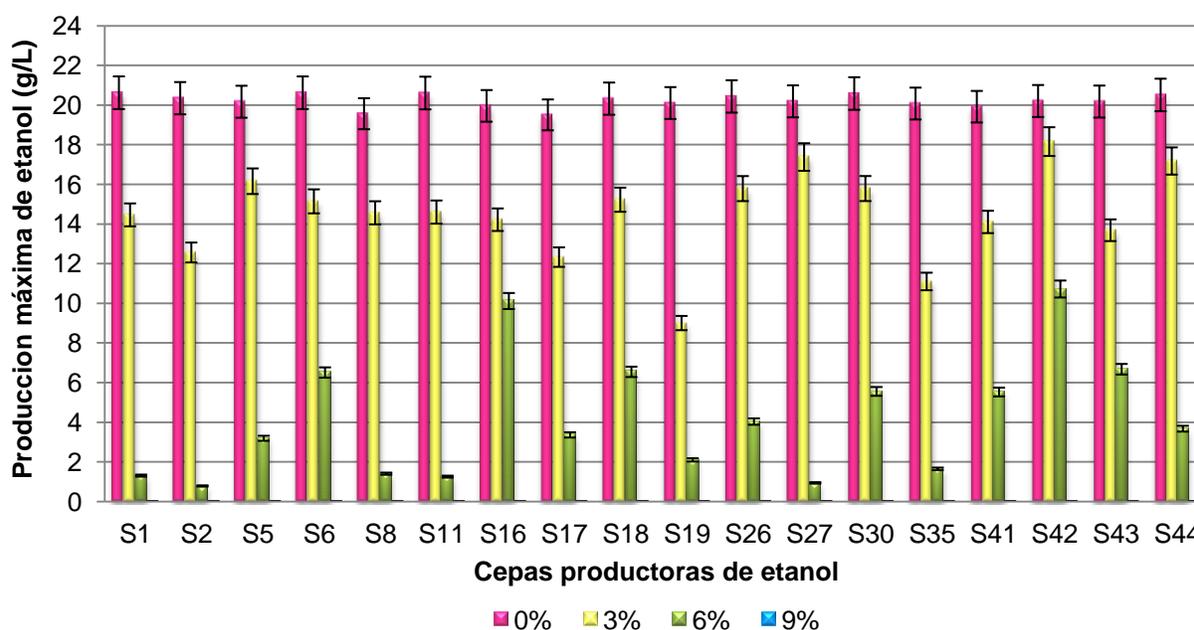


FIGURA 10. Efecto de las diferentes concentraciones de etanol inicial en el medio de cultivo sobre la producción máxima de etanol en las levaduras seleccionadas.

Se puede apreciar que en ausencia de etanol al inicio de la fermentación, las concentraciones máximas se encontraban alrededor de 20 g/L y a medida que aumentaban las concentraciones iniciales en el medio, la producción de etanol disminuía, mostrando que a 9% de etanol inicial la producción de etanol fue nula.

Esto podría deberse a que al sitio de acción del etanol es la membrana plasmática, tal como lo menciona You *et al.*, (2003). Diversos autores concluyen que, las moléculas de etanol penetran al interior de la membrana citoplasmática, alterando la permeabilidad y la fluidez de ésta, con lo que se ocasiona la muerte de las levaduras (Jirku *et al.*, 1991; Stevens y Servaas-Hofmeyer, 1993).

Continuando con las pruebas de resistencia a etanol, se procedió a evaluar el efecto de las concentraciones iniciales de etanol sobre el consumo de glucosa en las cepas seleccionadas. Los resultados se muestran en la Figura 11.

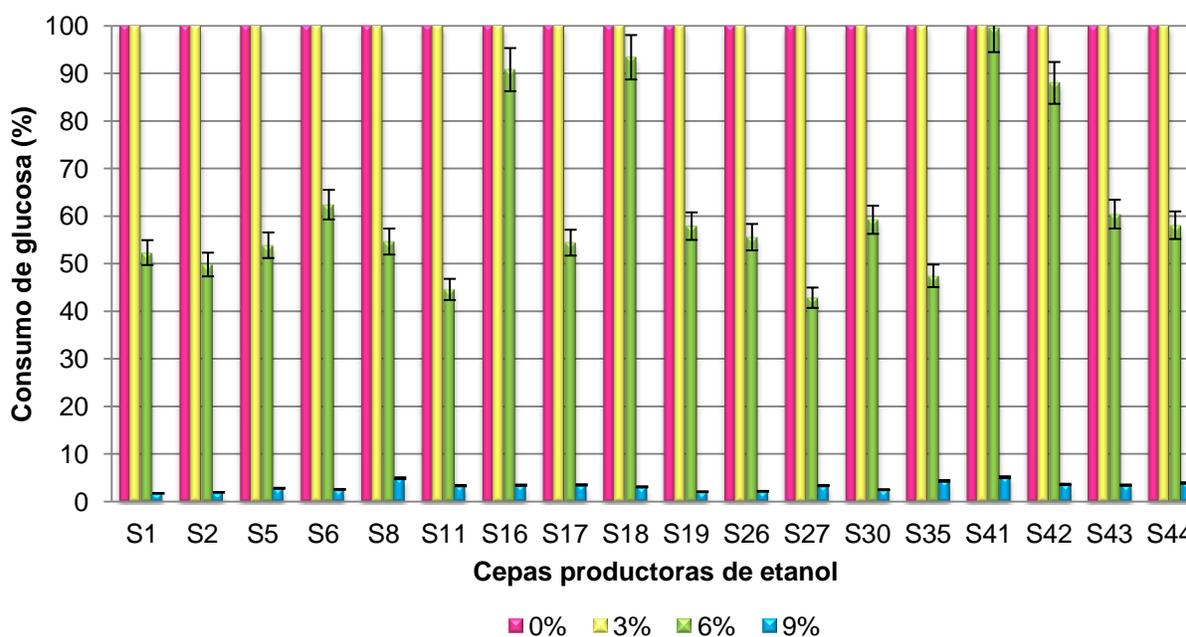


FIGURA 11. Efecto de las diferentes concentraciones iniciales de etanol sobre el consumo de glucosa en las cepas de levadura seleccionadas.

Se observa que las levaduras consumieron el 100% de glucosa en ausencia de etanol inicial y con 3% de éste. A pesar de que la concentración inicial de etanol se aumentó y el porcentaje de consumo de glucosa disminuyó, la actividad fermentativa se hizo evidente aun a los 6% de concentración de etanol inicial, lo que concuerda con lo reportado por Ortiz-Muñiz *et al.* (2010) para una cepa autóctona de *Saccharomyces cerevisiae* aislada de jugo de caña de azúcar.

Así mismo se puede apreciar que los porcentajes de consumo de glucosa a partir de 6% de etanol inicial oscilaban entre 50 y 60%. Sin embargo siete cepas presentaron consumos de glucosa por arriba del 60 % por lo que se seleccionaron para evaluar los siguientes criterios.

6.6. Evaluación de la termotolerancia en cepas seleccionadas

Se evaluó el efecto de la temperatura sobre el consumo de glucosa (Figura 12) y la producción de etanol (Figura 13) en las siete cepas seleccionadas, sabiendo que el mecanismo de respuesta celular al estrés por temperatura y por etanol es esencialmente similar (Piper, 1995) y consiste en cambios en la composición lipídica de las membranas plasmáticas.

Los fenómenos relacionados con la termotolerancia y la tolerancia a etanol de las levaduras han sido investigados por diversos autores, que han sugerido que la tolerancia a etanol y a altas temperaturas interactúan entre sí, es decir, las concentraciones elevadas de etanol disminuyen la temperatura óptima de crecimiento y el aumento de la temperatura incrementa el efecto inhibitorio del etanol (Ingram y Butke, 1984; D'Amore *et al.*, 1990).

Se observa que tanto el consumo de glucosa como la producción de etanol se mantienen constantes hasta los 38°C, con consumos de glucosa del 100% y concentraciones máximas de etanol de 20 g/L. Sin embargo se produce una notable disminución en la producción de etanol, al ser expuestos a 40 °C, lo que puede estar relacionado con lo reportado por Sohn *et al.* (1994) quienes mencionan que ciertas levaduras son capaces de crecer hasta temperaturas de entre 40-45°C pero su capacidad fermentativa disminuye o desaparece por arriba de los 40 °C.

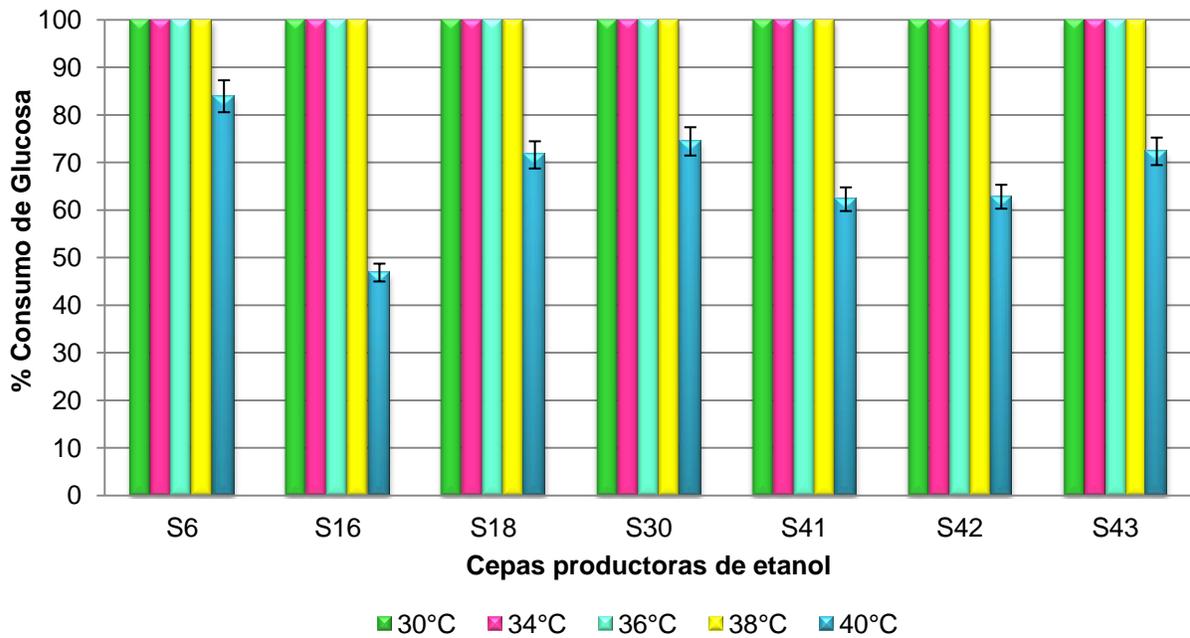


FIGURA 12. Efecto de las diferentes temperaturas evaluadas sobre el consumo de glucosa en las cepas de levaduras seleccionadas.

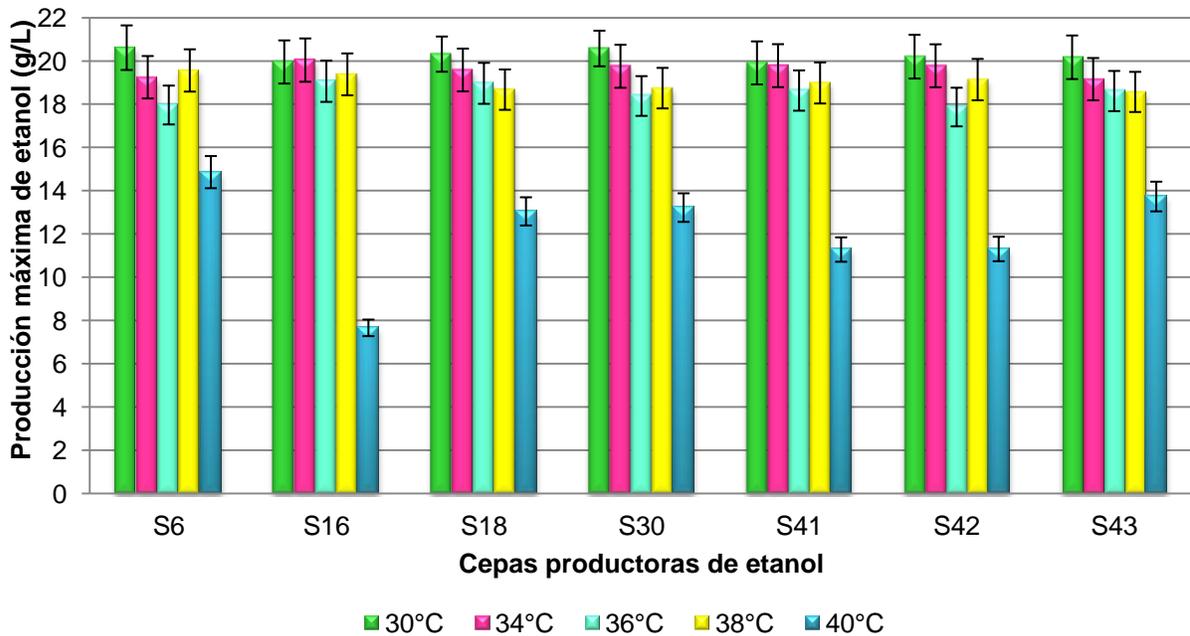


FIGURA 13. Efecto de las diferentes temperaturas sobre la producción máxima de etanol en las cepas de levaduras seleccionadas.

En la Figura 14 se muestra el efecto de las diferentes temperaturas sobre el rendimiento (Figura 14a) y la productividad de etanol (Figura 14b) de las cepas seleccionadas.

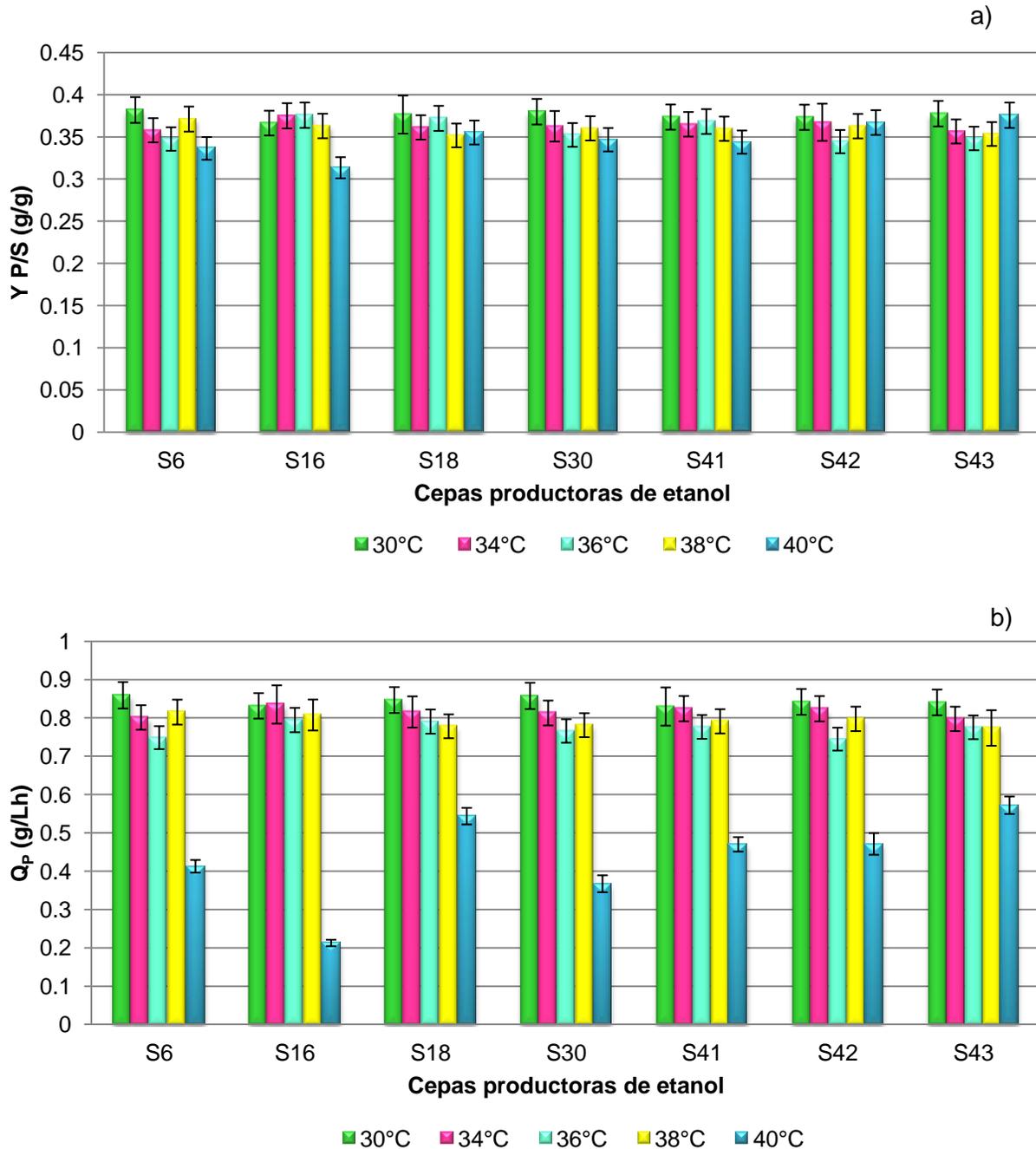


FIGURA 14. Efecto de las diferentes temperaturas sobre el rendimiento(a) y productividad de etanol (b) de las cepas seleccionadas.

En cuanto a los rendimientos de producto, se observaron valores entre 0.33-0.38 g/g para todas cepas evaluadas, sin embargo la productividad de etanol mostró una notable disminución, observándose que hasta 38°C las cepas presentaban productividades entre 0.8-1 g/Lh y que al ser expuestas a 40°C disminuían hasta en un 50 %. Esto ha sido observado previamente por Hernández *et al.* (1986), quien reporta que debido al calentamiento de los medios de cultivo por las reacciones exotérmicas y por la temperatura ambiental, las temperaturas en los biorreactores alcanzan los 40°C provocando estrés térmico y disminuyendo la productividad. Según algunos investigadores (D'Amore *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1993) las levaduras termotolerantes son aquellas capaces de crecer a temperaturas superiores a los 38 °C, por lo tanto se consideran que las cepas seleccionadas que fueron aisladas de juego de sorgo dulce, presentan termotolerancia a 40°C, ya que su capacidad fermentativa persiste.

6.7. Determinación de la actividad killer en cepas de levaduras seleccionadas

Las levaduras Killer o sus toxinas se pueden utilizar como agentes de control biológico contra patógenos de las plantas, descomposición de alimentos, hongos, levaduras y bacterias (Hernandez *et al.*, 2008). El que una cepa de levadura presente actividad Killer es muy importante en la fermentación para impedir el desarrollo de los microorganismos indeseables en el proceso, ya que disminuye el riesgo por contaminación de otras cepas de levaduras.

Por lo anterior se procedió a evaluar cada una de las 7 cepas con carácter osmotorelante, resistentes a etanol y termotolerantes, con el fin de determinar si alguna de ellas presentaba actividad Killer.

Como se observa en la Tabla 12, solo dos cepas, la S30 y la S42, presentaron actividad Killer.

TABLA 12. Identificación de la actividad Killer en cepas seleccionadas

Cepa	Actividad Killer
S6	-
S16	-
S18	-
S30	+
S41	-
S42	+
S43	-

Esta actividad se determinó a través de la presencia de un halo de inhibición del crecimiento celular, de color azul, producido por el fenotipo Killer de las levaduras S30 y S42 (Figura 15), comparadas con una cepa la cual no mostro actividad Killer.

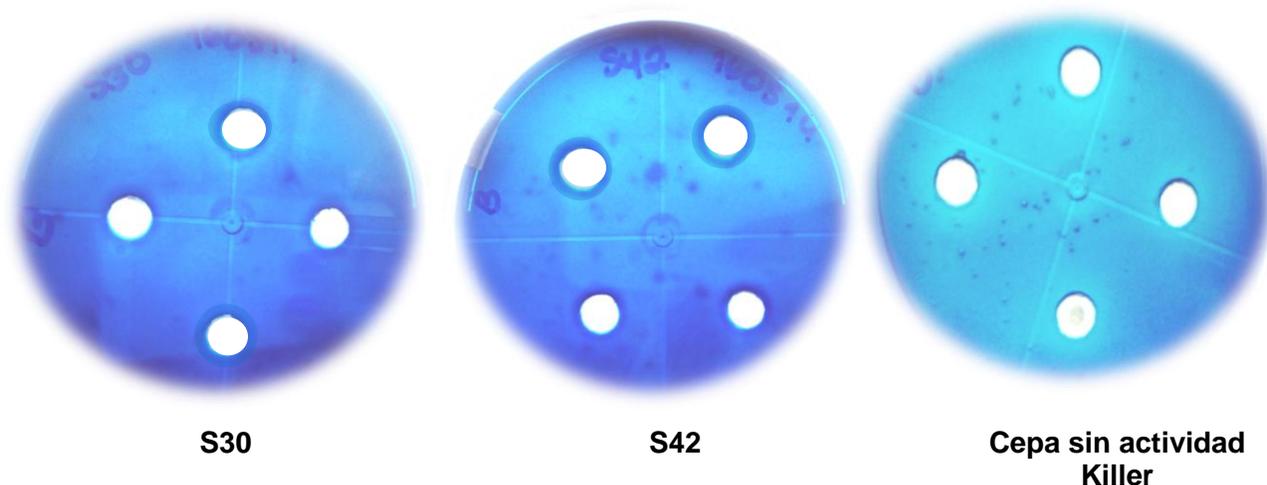


FIGURA 15. Actividad Killer de las levaduras seleccionadas.

El fenómeno Killer en levaduras fue demostrado por primera vez en cepas del género *Saccharomyces* (Bevan y Makower, 1963), pero mas tarde se encontró que se distribuye en varios generos de levaduras . Este resultado podría estar indicando la presencia de la toxina Killer en poblaciones autóctonas de levaduras aisladas del sorgo dulce.

6.8. Identificación molecular de las levaduras seleccionadas

De las sesenta levaduras aisladas de la fermentación espontánea de jugo de sorgo, se realizó la identificación de siete de ellas que presentaron características deseables en las fermentaciones alcohólicas, como osmotolerancia, resistencia a etanol, termotolerancia y actividad Killer. Esta identificación se llevó a cabo por medio de la amplificación de la región ITS1-5.8S rADN-ITS2 por medio de oligonucleótidos iniciadores (ITS1 e ITS4), de donde se obtuvieron fragmentos que correspondían a bandas únicas que oscilaban alrededor de los 600 pares de bases, las cuales concuerdan con los tamaños reportados para cepas de levaduras. En la Figura 16 se puede apreciar el tamaño de los fragmentos el cual fue determinado por medio de electroforesis en gel de agarosa.

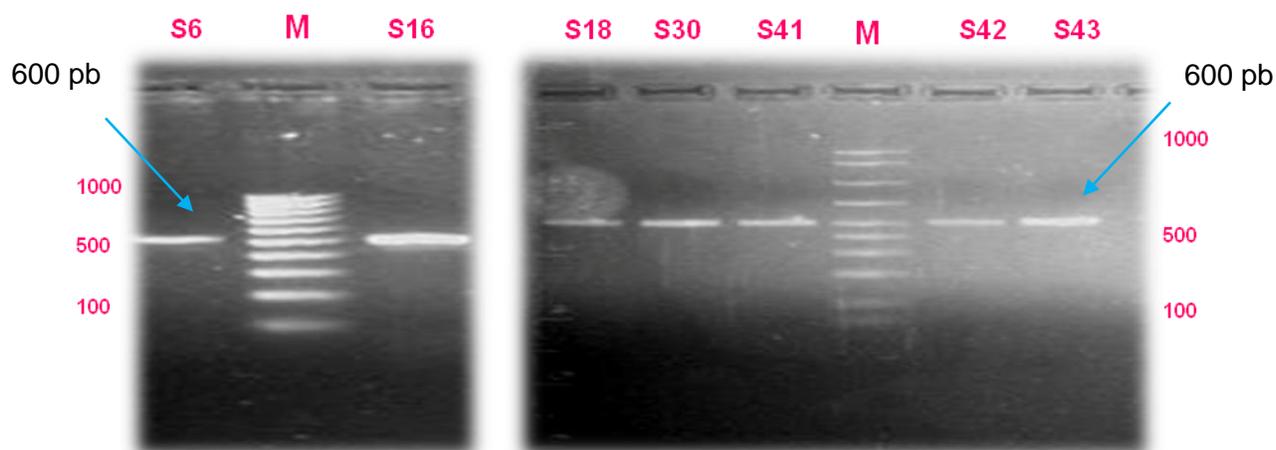


FIGURA 16. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados por PCR de las regiones ITS del ADN nuclear de las cepas de levadura aisladas de jugo de sorgo dulce.

Las secuenciación se realizó en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA), del Instituto de Biotecnología, UNAM, obteniendo secuencias que fueron comparadas con las de secuencias de referencia reportadas en el Genbank utilizando la base de datos NCBI, haciendo uso de la herramienta BLAST, se presentan en la Tabla 13 las homologías resultantes.

TABLA 13. Homologías de las cepas aisladas de jugo de sorgo dulce con especies reportadas en NCBI.

Cepa	Descripción	% Homología	No. Acceso (Genebank)
S6	<i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Issatchenkia orientalis</i>)	98	FJ231424
S16	<i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Issatchenkia orientalis</i>)	97	KC765129
S18	<i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Issatchenkia orientalis</i>)	98	KC765129
S30	<i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Issatchenkia orientalis</i>)	99	AB467300
S41	<i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Issatchenkia orientalis</i>)	99	EU315754
S42	<i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Issatchenkia orientalis</i>)	99	JQ083432
S43	<i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Issatchenkia orientalis</i>)	99	FJ231423

El análisis de las secuencias de la región ITS1-5.8S rADN-ITS2, se llevó a cabo haciendo uso de la herramienta BLAST de la página del NCBI para identificar las cepas de levaduras aisladas del jugo de sorgo. El análisis de las siete cepas reveló alrededor del 99% de similitud con la especie *Pichia kudriavzevii*. Se elaboró con esta información un árbol filogenético utilizando el método de Neighbour Joining y 1000 réplicas para obtener el valor de Bootstrapping. Este árbol se presenta en la Figura 17.

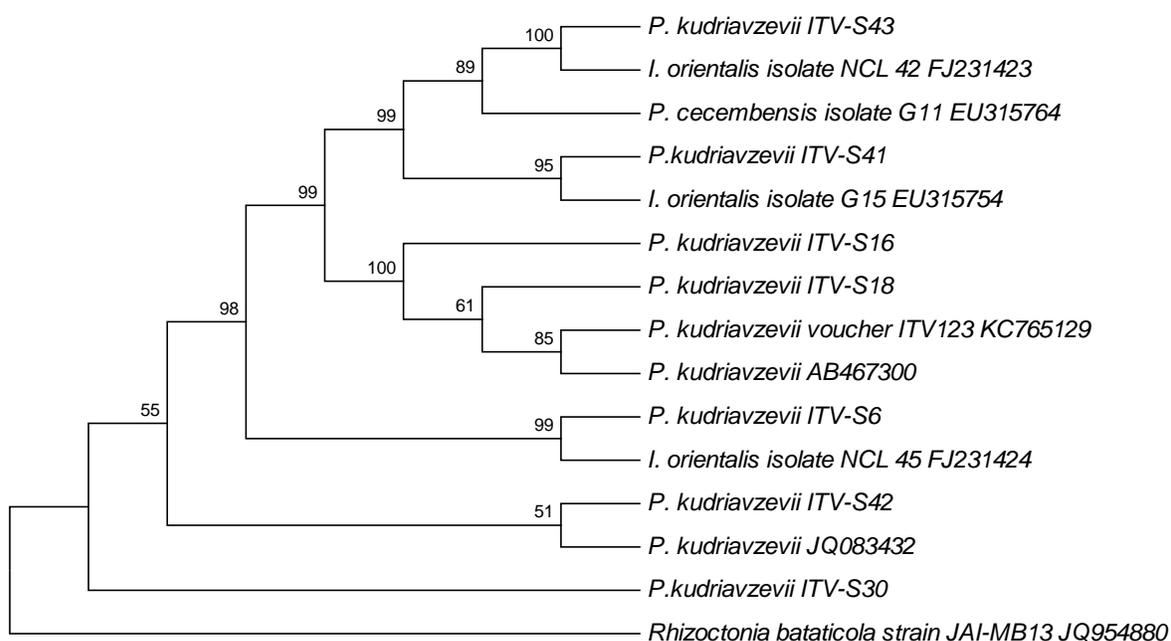


FIGURA 17. Árbol filogenético para las cepas seleccionadas.

Se muestra a la cepa ITV-S43 ubicada en un nodo vecino a la cepa de referencia *I. orientalis* isolate NCL 42 con un valor de bootstrap del 100% la cual fue aislada de la flora de diferentes variedades de uvas para la producción de vinos en India. Sin embargo esta misma cepa se separó de otra cepa de referencia *P.cecembis* isolate G11 en un nodo (89% Bootstrap).

La cepa seleccionada *P. kudriavzevii* ITV-S41 a su vez se separó de todas éstas en un nodo adyacente a las ya mencionadas con un valor de Bootstrap del 99%, las cepas ITV-S16 e ITV-S18 se vieron agrupadas en un nodo vecino a la cepa de referencia *P. kudriavzevii* ITV 123 aislada de la fermentación del cacao (valor de Bootstrap 100% y 61% respectivamente).

Se observa que la cepa ITV S6 mostró un valor de Bootstrap con la cepa de referencia *I. orientalis* isolate NCL 45 de 99%, sin embargo las cepas ITV-S42 e ITV-S30 se agruparon en nodos vecinos a todas las cepas ya mencionadas que a su vez presentaba un valor de Bootstrap de 56%, este árbol fue enraizado con la cepa *Rhizoctonia bataticola* JAI-MB13 lo que ayuda a identificar que las cepas seleccionadas solo se agruparon con las cepas de referencia del género *Pichia*.

Pichia kudriavzevii fue descrita por primera vez como *Issatchenkia orientalis* pero se ha clasificado como *P. kudriavzevii* en 1965, este tipo de levadura se puede encontrar en el suelo, frutas y en diversas bebidas fermentadas. Hasta ahora, se ha asociado principalmente con el deterioro de los alimentos para causar biofilms superficiales en productos de bajo pH (Kurtzman *et al.*, 2011).

Se conocen aislamientos de esta cepa de levadura a partir de una cerveza de sorgo molido en Costa de Marfil (N'guessan *et al.*, 2011). Chan *et.al.*, (2012) reportó que *P. kudriavzevii* es de gran interés en la industria biotecnológica ya que contiene algunas enzimas involucradas en procesos para la producción de bioetanol y fitasas que se utilizan como fertilizantes para aumentar la absorción de fósforo por las plantas.

6.9. Evaluación de los compuestos tóxicos presentes en los hidrolizados lignocelulósicos

Para la producción de etanol de segunda generación a partir de residuos lignocelulósicos, se emplea un pre-tratamiento con ácido débil para liberar los azúcares fermentables a partir de biomasa lignocelulósica. Sin embargo, este proceso genera compuestos inhibidores de la fermentación como el ácido acético, furfural (producto de la degradación de las pentosas) y 5-Hidroximetilfurfural (5-HMF) (producto de la oxidación de las hexosas) (Ortiz-Muñiz *et. al.*, 2014).

Se seleccionaron concentraciones de ácido acético, furfural y 5-HMF en base a concentraciones críticas de compuestos tóxicos para levaduras presentes en hidrolizados de bagazo de caña tradicional reportadas en la literatura.

En la Figura 18 se muestran los resultados obtenidos del efecto del ácido acético sobre la producción y productividad de etanol, y en la Figura 19 el efecto sobre la inhibición del crecimiento celular y el consumo de este ácido en las cuatro levaduras seleccionadas.

Con respecto a la producción máxima de etanol (Figura 18a) se observó que la producción de etanol era alrededor de 20 g/L en las cuatro cepas, no encontrándose diferencias significativas bajo las concentraciones evaluadas; sin embargo a la concentración de 24 g/L de ácido acético, la productividad (Figura 18b) se vio reducida aproximadamente en un 50%, puesto que, en las concentraciones de 0, 3, 7, 9 y 18 g/L osciló alrededor de 1.2 g/Lh en todas las cepas. Este comportamiento se debe quizá a que las cepas al pertenecer al mismo género y especie mostraron un comportamiento cinético similar.

Se evaluó el efecto del ácido acético en el crecimiento y la producción de etanol, observándose que conforme se elevan las concentraciones de ácido acético, el porcentaje de inhibición del crecimiento celular se incrementa, es decir que la viabilidad celular disminuye.

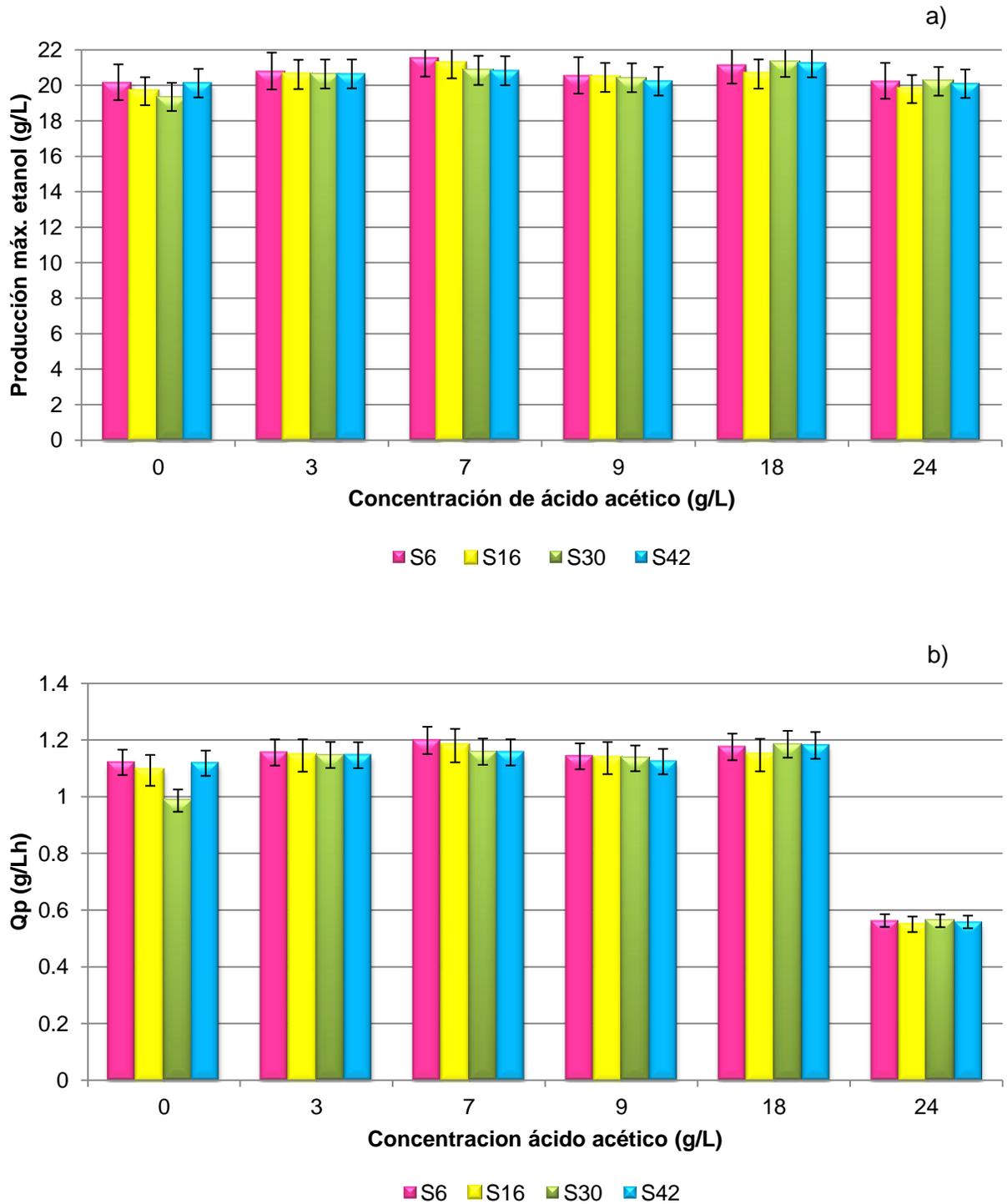


FIGURA 18. Efecto de diferentes concentraciones de ácido acético en el medio de cultivo sobre la producción de etanol (a) y productividad de etanol (b) en las cepas aisladas de jugo de sorgo dulce.

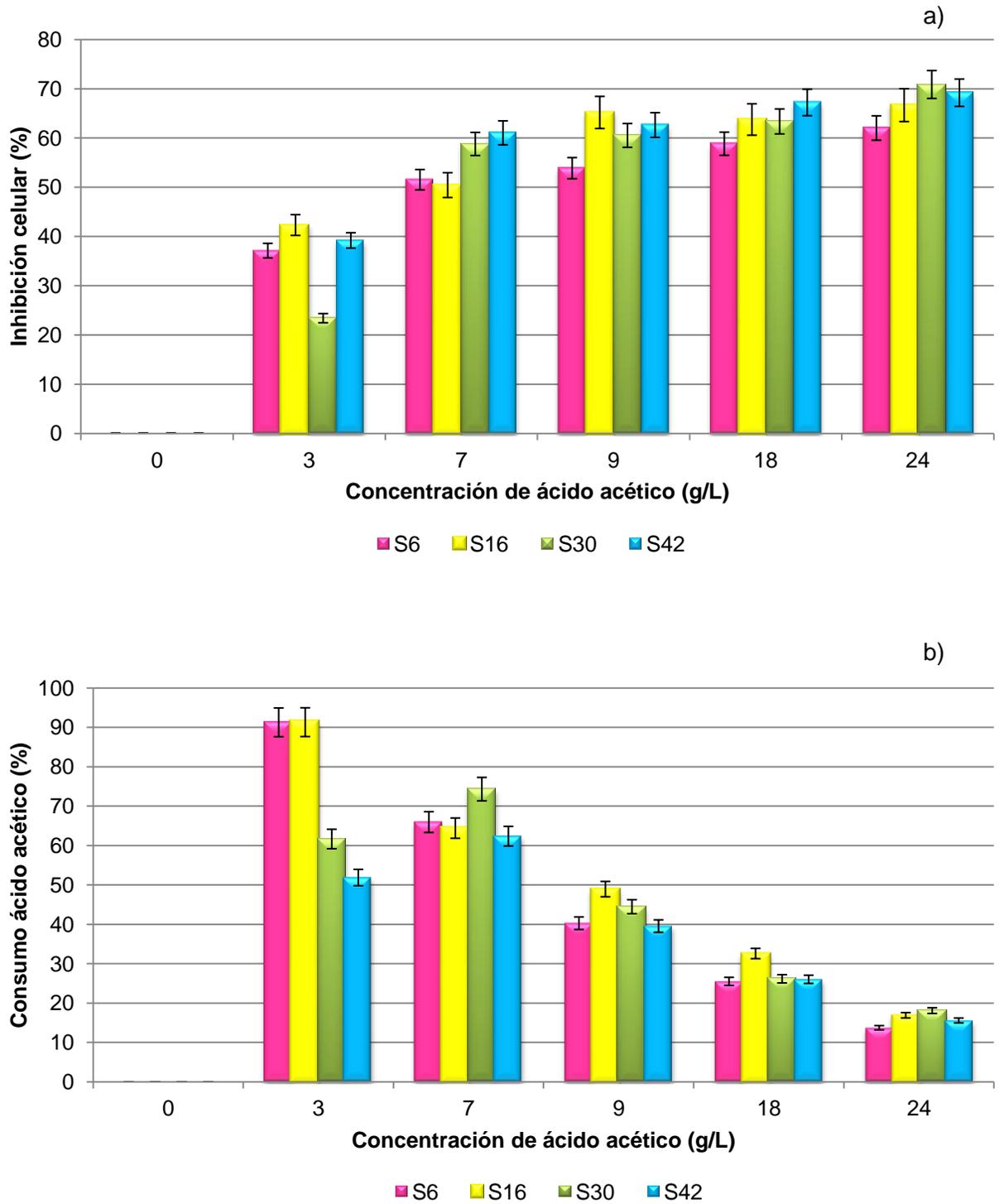


FIGURA 19. Efecto de diferentes concentraciones de ácido acético en el medio de cultivo sobre la inhibición celular (a) y el consumo de ácido (b) en las cepas aisladas de jugo de sorgo dulce.

En lo concerniente al efecto que tuvo este compuesto sobre la inhibición celular en las cepas seleccionadas (Figura 19a), a medida que se incrementó la concentración del ácido en el medio, la inhibición del crecimiento celular fue mayor y esta tendencia se manifestó en todas las cepas.

Este posible efecto inhibitorio se deba a lo propuesto por Smith *et al.* (1995), donde el ácido acético en su forma no disociada es transportado por difusión al interior de la célula, dentro de ella el ácido acético se disocia, esto a causa de que el pH se encuentra cerca de la neutralidad en el interior de la célula. La célula trata de mantener el equilibrio entre las especies dentro y fuera de ella, causando la desnaturalización de enzimas, gracias a la variación del pH intracelular.

En todas las cepas seleccionadas se observó un consumo del ácido acético (Figura 19b) del 90 al 20% dependiendo de las concentraciones iniciales de este ácido en el medio, este consumo disminuía conforme se incrementaban las concentraciones. Felipe *et al.* (1997) y Morita *et al.* (2000) observaron que el ácido acético puede ser utilizado por la levadura como un nutriente adicional para el crecimiento, esto puede explicar porque fue consumido parcialmente durante el proceso de fermentación. En cepas del género *S. cerevisiae* y *B. bruxellensis*, este ácido tuvo efecto inhibitorio sobre el crecimiento y su metabolismo a concentraciones entre 4.5 a 6 g/L (Phowchinda *et al.*, 1997); reportes de Ortiz-Muñiz *et al.* (2014) demuestran que las cepas autóctonas de *P. stipitis* y *S. cerevisiae* presentan efectos inhibitorios en el crecimiento celular con concentraciones de ácido acético de 4.8 y 8.46 g/L respectivamente. A diferencia de estas cepas, las cepas de levadura aisladas de jugo de sorgo dulce fueron capaces de utilizar este ácido como fuente alterna de carbono y producir etanol con concentraciones de ácido acético de 24 g/L, lo cual las da la pauta para la utilización de estas cepas en trabajos posteriores.

En la Figura 20, se muestra el efecto del Furfural y en la Figura 21 el efecto del 5-HMF sobre la producción y productividad del etanol así como la inhibición del crecimiento celular de estos compuestos sobre las cepas seleccionadas.

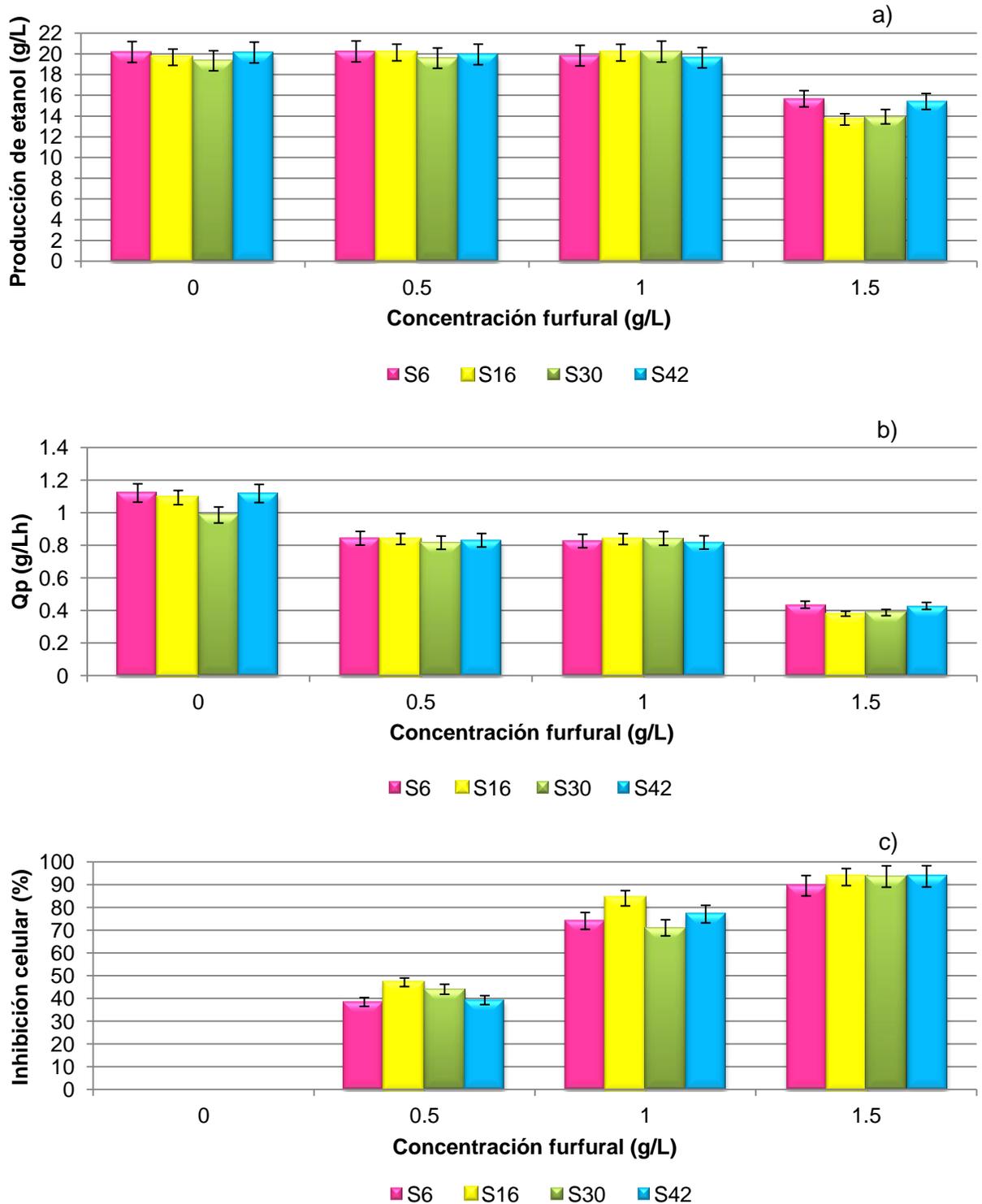


FIGURA 20. Efecto de diferentes concentraciones furfural sobre la producción de etanol (a), productividad (b) e inhibición del crecimiento celular (c) en las cepas aisladas de jugo de sorgo dulce.

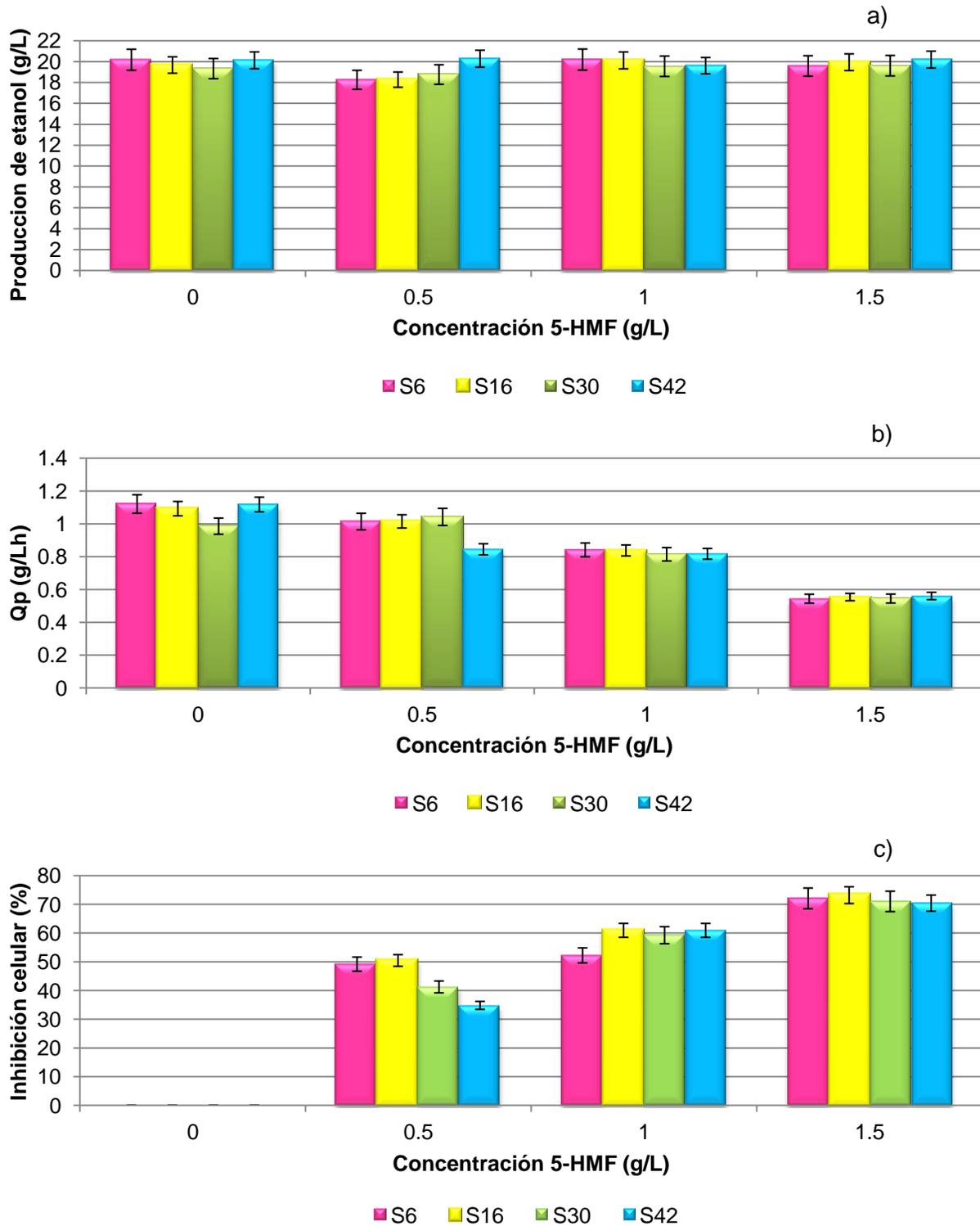


FIGURA 21. Efecto de diferentes concentraciones 5-HMF sobre la producción de etanol (a), productividad (b) e inhibición del crecimiento celular (c) en las cepas aisladas de jugo de sorgo dulce.

Se observó que, con respecto a la producción máxima de etanol en furfural no presentó cambios hasta la concentración de 1.0 g/L, sin embargo ésta se vio afectada con la concentración de 1.5 g/L, a diferencia del 5-HMF en donde las cepas presentaron similitud en cuanto a la producción de etanol, la cual se situaba aproximadamente en 20 g/L y esta no presentó variación al incrementarse la concentración inicial de 5-HMF.

La productividad de las cepas seleccionadas en relación con los dos compuestos, mantuvo la misma tendencia que para la producción de etanol, ya que se vio afectada sólo cuando las concentraciones iniciales en el medio se incrementaron. La productividad de etanol se redujó en aproximadamente 50% de la reportada para valores en ausencia de los compuestos tóxicos que se encontraba alrededor de 1.2 g/L.

En cuanto a la inhibición del crecimiento celular, se vio afectada en ambos compuestos. Se observa que a concentraciones de 1.5 g/L, la inhibición del crecimiento celular de las cuatro cepas seleccionadas se encontraba por arriba del 90% en el caso del furfural y alrededor del 70% para el 5-HMF. Este efecto inhibitorio se debe al mecanismo de inhibición del furfural en las enzimas centrales de la glicolisis y la represión de las enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico por el consumo de NADH provocando la muerte celular (Rangel, 2006). De manera similar con lo reportado por Delgenes *et. al.* (1996) quienes reportaron que las concentraciones inhibitorias para el furfural y el 5-HMF eran de 1.0 y 0.5 g/L respectivamente, las levaduras aisladas de jugo de sorgo dulce mostraron efecto inhibitorio para estos dos compuestos hasta la concentración de 1.0 g/L.

6.10. Producción de etanol en jugo de sorgo

Se evaluaron las cuatro cepas del género *Pichia kudriavzevii* en jugo de sorgo dulce para evaluar su capacidad fermentativa, utilizando el sustrato del cual fueron aisladas.

Se observa en la Figura 22 la producción de etanol, el consumo de azúcares totales y la viabilidad celular de las cuatro cepas seleccionadas en jugo de sorgo dulce.

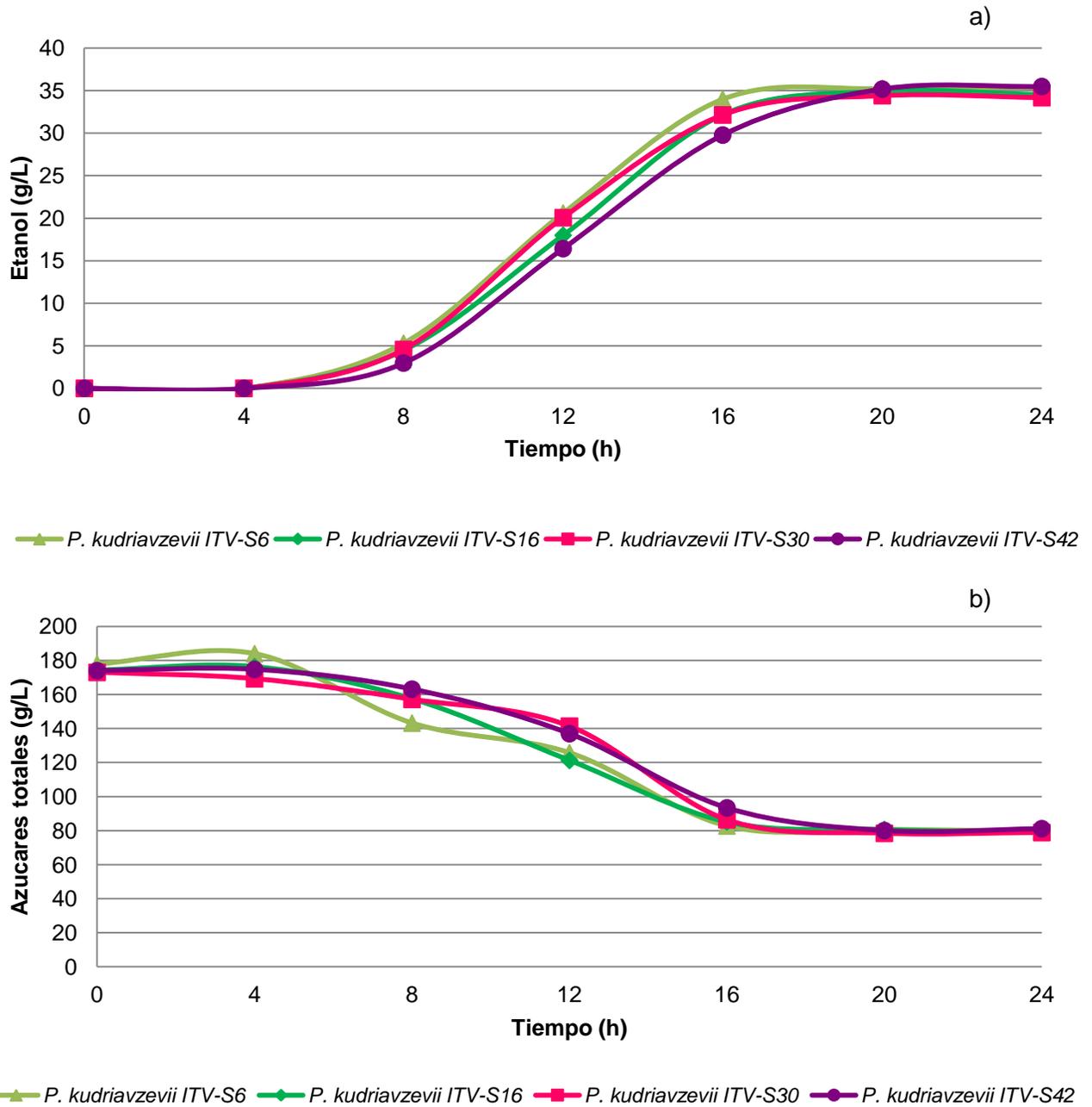


FIGURA 22. Producción de etanol (a), consumo de azúcares totales (b) y viabilidad celular (c) de las cuatro cepas seleccionadas en jugo de sorgo dulce.

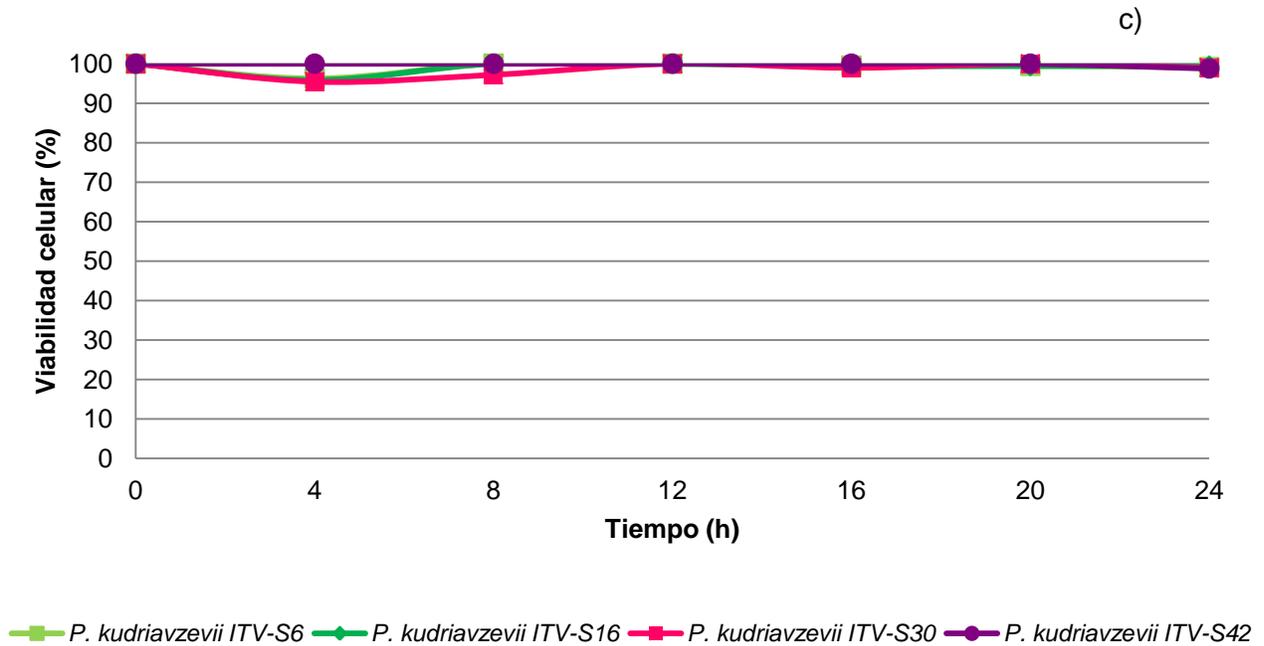


FIGURA 22. Continúa.

Las cuatro cepas seleccionadas presentaron un comportamiento cinético similar, ya que alcanzaron su máxima producción de etanol, de 35 g/L, a las 24 h, y el consumo de azúcares totales en ese mismo tiempo fue por arriba del 50% de la concentración inicial, que corresponde a 80 g/L aproximadamente.

La sensibilidad de etanol de las levaduras aisladas de jugo de sorgo dulce, puede deberse a que pertenecen al género *Pichia*, que según con lo reportado por Delgenes *et al.*, 1998, afirma que el principal paso limitante de la levadura *P. stipitis*, así como otras levaduras fermentadoras de pentosas, es su baja tolerancia a etanol, que es entre 30-35 g/L.

La viabilidad celular no se vio afectada a lo largo de la cinética; ésta mostró valores mayores del 90% de viabilidad, esto puede deberse a que las cepas al ser aisladas de este sustrato presentaron una mayor adaptación al medio de fermentación.

En la Tabla 14 se muestran los rendimientos y productividades de las cepas de *Pichia kudriavzevii* que fueron seleccionadas.

TABLA 14. Rendimientos y productividades de etanol de las cuatro cepas seleccionadas en jugo de sorgo dulce.

Cepa	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_p (g/Lh)
<i>Pichia kudriavzevii</i> ITV-S6	0.38	1.47
<i>Pichia kudriavzevii</i> ITV-S16	0.39	1.25
<i>Pichia kudriavzevii</i> ITV-S30	0.39	1.08
<i>Pichia kudriavzevii</i> ITV-S42	0.4	1.5

En cuanto a los rendimientos, no mostraron diferencias en ninguna de las cuatro cepas, todas ellas oscilaban alrededor de 0.4 g/g, sin embargo en relación a las productividades las cepas S6 y S42 presentaron valores de alrededor 1.5 g/Lh en comparación con las cepas S16 y S30 quienes obtuvieron valores 1.2 y 1.1 g/Lh, respectivamente.

7. CONCLUSIONES

- Se aislaron 60 cepas a partir de la fermentación espontánea de jugo de sorgo dulce; sólo siete cepas presentaron osmotolerancia a 200 g/L de glucosa, resistencia a etanol 6% v/v, termotolerancia a 40°C, tolerancia a compuestos tóxicos: ácido acético (18 g/L), 5-HMF (1 g/L) y furfural (1 g/L). Sólo las cepas S30 y S42 mostraron Actividad Killer.
- Las siete cepas seleccionadas pertenecen a la especie *Pichia kudriavzevii*.
- Las cuatro cepas de *Pichia kudriavzevii* probadas en jugo de sorgo dulce, alcanzaron la máxima producción de etanol (30g/L), según lo reportado para cepas de este género, y mantuvieron una viabilidad celular de más del 90% en toda la fermentación.

Como conclusión general, se seleccionaron las cepas *P. kudriavzevii* ITV-S30 y *P. kudriavzevii* ITV-S42. Las levaduras autóctonas aisladas de la fermentación espontánea del jugo de sorgo dulce pertenecientes al género *Pichia kudriavzevii*, mostraron osmotolerancia, resistencia a etanol, termotolerancia, tolerancia a compuestos tóxicos: ácido acético, 5-HMF, furfural, y presentando dos de ellas actividad Killer. Cabe destacar que no se ha reportado ninguna cepa del género *Pichia* que presente actividad Killer y resistencia a compuestos tóxicos, como lo es el ácido acético, furfural y 5-HMF, de manera conjunta, por lo que resulta de gran interés probar estas cepas para la producción de etanol tanto de primera como de segunda generación.

8. RECOMENDACIONES

- Caracterizar cinéticamente las cepas *P. kudriavzevii* ITV-S30 y *P. kudriavzevii* ITV-S42.
- Evaluar las cepas seleccionadas en diferentes sustratos tales como: xilosa, fructosa y sacarosa.
- Evaluar las cepas seleccionadas en hidrolizados de sorgo dulce, obtenidos por hidrólisis ácida, alcalina y/o enzimática para la producción de etanol de segunda generación.
- Complementar la caracterización molecular de la colección de levaduras, secuenciando los dominios D1 y D2 del gen ribosomal 26S.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar-Uscanga, M. G. 1998. Caractérisation cinétique et métabolique d' une souche de *Brettanomyces*. Tésis Doctoral. I. P. N. Toulouse, Francia.

Almodares, A., Hadi, M. R. y Ahmadpour, H. 2008. Sorghum Stem yield and soluble carbohydrates under different salinity levels. *Afr. J. Biotechnol.* Vol 22 (7): 4051-4055.

Almodares, A. y Hadi, M. R. 2009. Production of bioethanol from sweet sorghum: A review. *Afr. J. Biotechnol.* Vol 9: 77-780.

Almodares, A., Taheri, R., y Adeli, S. 2008. Stalk yield and carbohydrate composition of sweet sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] cultivars and lines at different growth stages. *J. Malays Appl. Biol.* Vol 37: 31-36.

Alvarez, X., Fundora N. e Izquierdo Y. 2007. Aislamiento e identificación de una cepa de levadura con efecto killer ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. ICIDCA. Vol 16 (1):44-47.

Ariyajarearnwong, P., Laopaiboon L., Jaisil P. y Laopaiboon P. 2001. Repeated-batch ethanol fermentation from sweet sorghum juice by free cells of *Saccharomyces cerevisiae* NP 01. *Afr. J. Biotechnol.* Vol 10 (63): 13909-13918.

Banat ,I. M., Nigam, P., Singh D., Marchant, R. y McHale, A. P. 1998. Ethanol production at elevated temperatures and ethanol concentrations: Part I - Yeasts in general. *World J. Microb. Biot.* Vol 14: 809-821.

Barata, A., González, S., Malfeito-Ferreira, M., Querol, A. y Loureiro, V. 2008. Sour rot-damaged grapes are sources of wine spoilage yeasts *FEMS Yeast Res.* Vol 8:1008–1017.

Barnett, J.A., Payne, R.W. y Yarrow, D. 2000. Yeasts: characteristics and identification, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge.

Beaven, M. J., Charpentier, C. y Rose, A. 1982. Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431 H. J. Gen. Microbiol. Vol 128:1447-1455.

Bevan, E. y Makower, M. 1963. The physiological basis of the killer character in yeast. In Proc XIth Int Congr Genetics, Pergamon Press, The Netherlands. Vol 1: 203.

Benitez, T., Del Castillo, L., Aguilera, A., Conde, J. y Cedra-Olmedo, E. 1983. Selection of wine yeast for grown and fermentation in the prescence of etanol and sucrose. Appl. Environ. Microbiol. Vol 45: 1429-1436.

Boudarel, M.J. 1984. Contribution á l'étude de la fermentation alcoolique á partir de jus de betteraves avec. *Saccharomyces cerevisiae*. Tésis Doctoral. Université de Dijon, Francia.

Brown, S.W. y Oliver, S.G. 1982. The effect of temperature on the ethanol tolerance of yeast *Saccharomyces uvarum*. Biotechnol Lett. Vol 4: 269-274.

Camargo, C. A. Ushima, A. H. Ribeiro, A. M. M., Souza, M. E. P. y Santos, N. F. 1990. Manual de recomendações: conservação de energia na indústria do açúcar e do álcool. Instituto de Pesquisas Tecnológicas. São Paulo. Brasil.

Carlile, M.J., Watkinson, S.C. and Gooday, G.W. 2001. The Fungi. 2^a ed. Academic Press, San Diego: 70

Carvajal-Barriga, E.J., Libkind, D., Briones, A.I., Úbeda-Iranzo, J., Portero, P., Roberts, I., James, S., Morais, P.B. y Rosa C.A. 2011. Yeasts Biodiversity and Its Significance: Case Studies in Natural and Human-Related Environments, Ex Situ Preservation, Applications and Challenges, Changing Diversity in Changing Environment, PhD. Oscar Grillo (Ed.).

Casey, G.P. y Ingledew, W.M. 1986. Ethanol tolerance in yeasts. Crit. Rev. Microbiol. Vol 13: .219-290.

Chan, G.F, Gan, H.M., Ling, H.L. y Rashid, N.A. 2012. Genome sequence of *Pichia kudriavzevii* M12, a potential producer of bioethanol and phytase. EC, Vol 11 (10).

Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T. y Sogo, J.M. 1995. Transcription in the yeast rRNA gene locus: distribution of the active gene copies and chromatin structure of their flanking regulatory sequences. *Mol Cell Biol.* Vol 15: 5294-5303.

D'Amore, T., Panchal, C. J., Russell, I. and Stewart, G. G. 1990. A study of ethanol tolerance in yeast. *Crit. Rev. Microbiol.* Vol 9: 287-304.

Deak, T. and Beuchat, L.R. 1996. Handbook of Food Spoilage Yeasts. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Degre, R. 1993. Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. En: Fleet GH (ed) *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood, Chur, Switzerland: 421–448.

Delgenes, J.P., Moletta, R. y Navarro, J. M. 1996. Effects of lignocelluloses degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida sheatae*. *Enzyme Microb. Technol.* Vol 19: 220-225.

Delgenes, J.P., Escare, M.C, Laplace, J.M., Moletta, R. y Navarro, J.M. 1998. Biological production of industrial chemicals, i.e. xylitol and ethanol, from lignocelluloses by controlled mixed culture systems. *Ind. Crop. Prod.* Vol 7: 101-111.

Felipe, M.G.A., Vitolo, M., Mancilha, I.M. y Silva, S.S. 1997. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* Vol 18: 251–254.

Gnansounou, E., Dauriat, A. y Wyman, C.E. 2005. Refining sweet sorghum to ethanol and sugar: economic trade-offs in the context of North China. *Bioresource Technol.* Vol 96 (9): 985-1002.

Gschaedler, M. A., Ramírez-Córdova, J., Díaz-Montaño, D., Herrera-López, H., Arellano-Plaza, M., Arrizon-Gaviño, J. y Pinal-Zuazo, L. 2004. Fermentación: etapa clave en la elaboración del tequila. *Ciencia y Tecnología del Tequila, Avances y Perspectivas*. CIATEJ. Guadalajara. México: 32–120.

Hamidmotlagh, R., Nahvi, I., Emtiazi, G. y Abedinifar, S. 2007. Mixed sugar fermentation by *Pichia stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae*, and an isolated xylose-fermenting *Kluyveromyces marxianus* and their cocultures. Afr. J. Biotechnol. Vol 6 (9): 1110-1114.

Hernández, M. T., Sais, T. y Sánchez, O. 1986. Microbiología de la Producción Azucarera. Producciones Microbianas Derivadas. Edición UCLV, Santa Clara, Cuba.

Hernandez, A., Martin, A., Cordoba M.G. y Benito, M.J. 2008. Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. Int. J. Food Microbiol. Vol 121:178–188.

Holzer, H. 1976. Catabolite inactivation in yeast. En: Biochem Sci, Vol 1: 178-181.

Ingledeu, W.M. 1995. The Biochemistry of the alcohol roduction. En The Alcohol Textbook (Eds.Lyons, T., Kelsall,D. y Murtagh,J.) Noottinghan University Press, 1995.

Ingram, L.O and Buttke, T.M. 1984. Efects of alcohols on microorganisms. Adv. Microb. Physiol. Vol 25: 256-300.

Jirku, V. 1991. The effect of covalent immobilization on ethanol-induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae*. Acta Biotechnol. Vol 11:77–80.

Jolly, N. P., Augustyn, O.P.H y Pretorius I.S. 2006. The Role and Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production. S. Afr. J. Enol. Vitic. Vol 27 (1).

Jones, R. P. y Greenfield, P. F. 1981. Batch ethanol production with dual organisms, Biotechnol. Lett. Vol 3: 225.

Keeley, J.E. y Rundel, P.W. 2003. Evolution of CAM and C4 carbon-concentrating mechanisms, Int. J. Plant. Sci. Vol 164 (3): 55-77.

Kurtzman, C.P. 1998. Yeast Systematics – En: Phenotype to Genotyipe. Food tecnol. Biotechnol. Vol 36 (4): 261-266.

Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. y Basehoar-Powers, E. 2008. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. *FEMS Yeast Res.* Vol 8: 939–954.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W. y Boekhout, T. 2011. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, Fifth edition. Vol 1

Laluce, C., Palmieri, M. C. y Lopes, de Cruz, R. C. 1991. Growth and fermentation characteristics of new selected strains of *Saccharomyces* at high temperatures and high cells densities. *Biotechnol. Bioeng.* Vol 37: 528-536.

Laopaiboon, L., Thanonkeo, P., Jaisil P. y Laopiboon, P. 2007. Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microb Biot.* Vol 23 (10): 1497-1501.

Larsson, S., Quintana-Sáinz, A., Reimann, A., Nilvebrant, N. O., y Jönsson, L. J. 2000. The influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 617-632.

Lee, C., Yamakawa, T. y Kodama, T. 1993. Rapid growth of thermotolerant yeast on palm oil. *World J. Microb. Biot.* Vol 9: 187-190.

Mamma, D., Koullas, D., Fountoukidis, G., Kekos, D., Macri, B.J. y Koukios, E. 1996. Bioethanol from sweet sorghum: simultaneous saccharification and fermentation of carbohydrates by a mixed microbial culture. *Process. Biochem.* Vol 31 (4): 377–381

Mathews, C. K. y Van Holde, K. E. 1998. *Bioquímica*. 2ª edición. Editorial Mc-Graw-Hill-Interamericana: 209-210.

Meléndez, L.M. y Herrera, N.P. 2011. *Saccharomyces cerevisiae*: rendimiento en distintas fuentes carbonadas. Tesis: Ingeniería Química, Facultad de Química e Ingeniería Química. UNMSM. Lima, Perú.

Montes-García, N., Salinas-García J.R. y González-Jiménez, A. 2010, Guía Técnica De Producción De Sorgo Dulce [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] En Tamaulipas, Instituto

Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Tamaulipas, México.

Morita, T.A., Silva, S.S. y Felipe, M.G.A. 2000. Effects of initial pH on biological synthesis of xylitol using xylose-rich hydrolysate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol 84–86: 751–759.

Morimura, S., Ling, Z. L. y Kida, K. 1997. Ethanol production by repeated-batch fermentation at high temperature in a molasses medium containing a high concentration of total sugar by a thermotolerant flocculating yeast with improved salt tolerance. *J. Ferment. Bioengineer.* Vol 83: 271-274.

Moulin, G., Boze, H. y Galz, P. 1984. Inhibition of alcoholic fermentation. *Biotechnol. Gen. Eng.Rev.* Vol 2: 365-382.

Nagodawithana, T.W., Whitt, J.T. y Cutaia, A.J. 1977. Study of the feedback effect of ethanol on selected enzymes of the glycolytic pathway. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* Vol 35: 179-183.

Navarro, J.M. y Durand, G. 1978. Fermentation alcoolique: influence de la temperature sur l'accumulation d'alcool dans les cellules de levure. *Ann Microbiol.* Vol 129: 215-224.

N'guessan, K.F, Brou, K., Jacques N., Casaregola, S. y Dje, K.M. 2011. Identification of yeasts during alcoholic fermentation of tchapalo, a traditional sorghum beer from Côte d'Ivoire, *Anton Leeuw. Int. J. G.* Vol 99 (4): 855-864.

Ortiz-Muñiz, B., Carvajal-Zarrabal, O., Torrestiana-Sánchez, B. y Aguilar-Uscanga, M.G. 2010. Kinetic study on ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 yeast isolated from sugar cane molasses. *J. Chem Tech. Biotechnol.* Vol 85: 1361-1367.

Ortiz-Zamora, O.C. 2006. Obtención de cepas autóctonas osmotolerantes, resistentes a altas concentraciones de etanol y con actividad killer. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz. México.

Ortiz-Zamora, O., Cortés-García, R., Ramírez-Lepe, M., Gómez-Rodríguez, J. y Aguilar-Uscanga, M.G. 2007. Isolation and Selection of ethanol-resistant and osmotolerant yeasts from regional agricultural sources in Mexico. *J. Food Process Eng.* Vol 32 (5): 775–786.

Oliva-Dominguez, J.M. 2003. Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.España.

Osho, A. 2005. Ethanol and sugar tolerance of wine yeasts isolated from fermenting cashew apple juice. *Afr. J. Biotechnol.* Vol 4 (7): 660-662.

Owen, P.W. 1991. Biotecnología de la fermentación. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España.

Panchal, C.J. and Stewart, G.G. 1980. The effect of osmotic pressure on the production and excretion of ethanol and glycerol in brewing yeast strains. *J. Inst. Brew.* Vol 86: 207–210.

Panchal, C.J. 1990. Yeast strain selection. Biotechnology and Bioprocessing Series. Marcel Dekker Inc.

Phowchinda, O., Delia-Dupuy, M.L. y Strehaiano, P. 1997. Alcoholic fermentation from sweet sorghum: some operating problems. 9th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, Bangkok, Thailand.

Piper, P. W. 1995. The heat-shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. . *FEMS Yeast Res.* Vol 134: 121-127.

Pina, C., Santos, C., Couto, J.A y Hogg, T. 2004. Ethanol tolerance of five non-Saccharomyces wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*—influence of different culture conditions. *Int. J. Food Microbiol.* Vol 21: 439–447

Pitt, J.I. 1974. Resistance of some food spoilage yeast to preservatives. *Food Technol. Aust.* Vol 6: 238–241

Pitt, J.I. y Hocking, A.D. 2009. Fungi and Food spoilage. 3rd. Ed. Springer Science.Business Media LLC.

Punja, Z.K. y Utkhede, R.S. 2003. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. Trends Biotechnol. Vol 21: 400–407

Querol, A. y Fleet, G. 2006. The yeast handbook volume 2. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Rangel, L.E. 2006. Efectos de los requerimientos nutricionales y de productos tóxicos presentes en hidrolizados de lignocelulósicos sobre la producción de xilitol por la capa IEC5-ITV. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz. México.

Ratnavathi, C.V., Chakravarthy, S.K., Komala, V.V., Chavan, U.D. y Patil, J.V. 2011. Sweet sorghum as feedstock for bio-fuel production: a review. Sugar Tech. Vol 13: 399-40.

Rodríguez-Herrera, R., Aguilar-González, C. N., Ayala-Labarrios, L. A., Rocha-Revilla, J.C., Padilla-García, V. y Espinosa-Hernández T. C. 2009. Detección de microorganismos mediante métodos moleculares. AQM. Universidad Autónoma de Coahuila. México.

Salcedo-Cárdenas, M.E. 2008. Aislamiento y Selección de Levaduras Fermentadoras de Melaza de Caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). Tesis Doctoral. Morelia. Michoacán. México.

Sambrook, J. y Russel, D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 408-2208.

Sánchez, O.J y Cardona C.A. 2005. Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. INCI.Vol 30 (11): 671-678.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) 2011, Bioetanol. Recuperado de <http://www.bioenergeticos.gob.mx/index.php/bioebioet.html>.

Segura, G., Luis E., Kirchmayr, Manuel R., Flores B., Ericka P., Gschaedler M.y Anne C. 2010. PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas. e-Gnosis. Vol 8: 1-12.

Serna-Saldivar, S. 2010. Cereal Grains: Properties, Processing, and Nutritional Attributes CRC Press. Food Preservation Technology.

Shimizu, K., Adachi, T., Kitano, K., Shimazaki, T., Totsuka, A., Hara, S. y Dittrich, H. H. 1985. Killer properties of wine yeast and caracterizacion of Killer wine yeast. J. Fermet. Technol. Vol 63: 421-429.

Smith, C.R., Jones, R.S., Snyder, R.E., Shultz, E. y Rasmussen, J.E. 1995. Acetic acid as a causative agent in producing stuck fermentations. Am. J. Enol. Vitic. Vol 46 (2):278-280.

Smith, C.W. y Frederiksen, R.A. 2000. Sorghum: Origin, history, technology, and production, John Wiley and Sons, New York.

Sohn, H. Y., Park, W., JIN, I. y Seu, J. H. 1994. The Fermentation Characteristics of Newly Selected Thermotolerant Yeasts at High Temperature. J. Microbiol. Biotechnology. Vol 4: 222-229.

Stevens, S. y Servaas-Hofmayr, J.H. 1993. Effects of ethanol, octanoic and decanoic acids on fermentation and the passive influx of protons through the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol 38: 656–663.

Strehaiano, P. 1984. Phénomènes d' inhibition et fermentation alcoolique, Tesis Doctoral. I. P. N. Toulouse, Francia.

Strehaiano, P., Ramon-Portugal, F. y Taillandier, P. 2006. Yeasts as Biocatalysts. En: The yeast handbook volume 2. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Cap.9.

Trindade, R.C., Resende, M.A., Barreto, E.G.S., Mendes, T.C., y Rosa, C.A. 1999. Identification of yeasts Isolated from processed and frozen cocoa (*Theobroma cacao*) pulp for wine production. Braz. arch. biol. technol. Vol 42 (3): 349-354.

Van Uden, N. 1984. Effects of alcohol on membrane transport in yeast. En Van Uden N. (ed.). Alcohol toxicity in yeast and bacterias, CRC Press, Boca Raton, Florida (1989): 135-146.

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

Walker, M. G. 1998. Yeast physiology and biotechnology. John Wiley and Sons. England.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322 En: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, (eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, y T. J. White) Academic Press, Inc., New York.

Wu, X., Staggenborg, S., Propheter, J.L., Rooney, W.L., Yu, J. y Wang, D. 2010. Features of sweet sorghum juice and their performance in ethanol fermentation, Ind Crop Pro, Vol 31 (1): 164-170.

You, K. M., Rosenfield, C. L. y Knipple, D.C. 2003. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. Appl. Environ. Microbiol. Vol 69 (3):1499-1503.

Zhang, C., Xie, G., Li, S., Ge, L. y He, T. 2010. The productive potentials of sweet sorghum ethanol in China, Appl. Energ., Vol. 87(7): 2360-2368.