

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y**

**ARTES DE CHIAPAS**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**T E S I S**

Caracterización fisiológica de  
*Kluyveromyces marxianus* (Van der  
Walt, 1971) asociadas a la bebida  
tradicional comiteco

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

**ANA LUCÍA LÓPEZ GURGUA**

Director(a)

Dra. Alma Gabriela Verdugo Valdez

**INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNICACH**

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Diciembre de 2021



**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS**  
**SECRETARÍA GENERAL**  
**DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN ESCOLAR**  
**AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN**

Lugar: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas  
Fecha: 16 de diciembre de 2021

C. Ana Lucía López Gurgúa

Pasante del Programa Educativo de: Licenciatura en Biología

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:

“Caracterización fisiológica de *Kluyveromyces marxianus* (Van der Walt, 1971)

asociadas a la bebida tradicional comiteco”

En la modalidad de: Tesis Profesional

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

**Revisores**

Mtra. María Esther Molina Ruiz

Mtro. Luis Galdino García Pérez

Dra. Alma Gabriela Verdugo Valdez

**Firmas:**

Ccp. Expediente

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas y al Instituto de Ciencias Biológicas, por permitirme el uso de sus instalaciones y la formación académica.

Al Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación de Chiapas, por el apoyo económico recibido para la culminación de esta tesis.

A El Colegio de la Frontera Sur, por permitirme hacer uso de sus laboratorios y proporcionarme reactivos para concluir con este trabajo.

Al Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas por posibilitarme el uso de sus equipos.

A la Dra. Alma Gabriela Verdugo Valdez, por compartirme sus conocimientos, tiempo, paciencia y apoyo absoluto brindados durante el proceso de esta tesis.

Al comité revisor, Mtra. Ma. Esther Molina Ruíz y el Mtro. Luis Galdino García Pérez, por brindarme su apoyo, tiempo y los valiosos consejos para pulir este trabajo.

Al Mtro. Noé Samuel León Martínez y a la Biol. Maricela García Bautista, por los consejos y permitirme hacer uso de sus laboratorios y reactivos.

A mi papá Miguel Ángel, por su apoyo incondicional en mi formación académica, quién buscó soluciones para que pudiera seguir realizando mis trabajos experimentales aún con las complicaciones. A mi mamá Lucía, por el ánimo y sonrisas que me impulsaban a seguir adelante.

A mis amigos quienes siempre me brindaron apoyo, consejos y compañía. A Marce por cuidarme como esa compañera que tanto necesitaba, a Omar por hacerme compañía cuando me quedaba sola en la ciudad, a Mary por la compañía y las divertidas charlas, a Javier que con una sonrisa sabía quitarme el estrés, a Ernesto por los consejos y la motivación que me empujaban a seguir.

A Dios, por todo.

Dedico esta tesis a mi hermana,  
Marcela.

# ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO .....	3
2.1 Generalidades del comiteco.....	3
2.1.2 Materias primas.....	3
2.2 Procesos fermentativos.....	8
2.2.1 Microorganismos en la fermentación.....	9
2.3 Generalidades de las levaduras.....	9
2.3.1 Generalidades de <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	11
2.4 Identificación y caracterización de levaduras.....	13
2.4.1 Métodos morfológicos para la identificación de levaduras ..	14
2.4.2 Métodos fisiológicos para la identificación de levaduras .....	15
2.4.3 Métodos moleculares para la identificación de levaduras ....	16
2.5 Cinética de crecimiento de levaduras .....	21
2.5.1 Parámetros cinéticos.....	21
III. ANTECEDENTES.....	23
IV. OBJETIVOS .....	26
V. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
5.1 Cepas de levadura.....	27
5.2 Reactivación de las cepas .....	27

<b>5.3 Caracterización molecular</b> .....	27
<b>5.3.1 Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción de la región ITS- 5.8S del ADNr (RFLP): amplificación</b> .....	27
<b>5.3.2 Digestión</b> .....	28
<b>5.4 Cinética de crecimiento</b> .....	28
<b>5.4.1 Desarrollo del inóculo</b> .....	28
<b>5.4.2 Curva de crecimiento</b> .....	29
<b>5.5 Caracterización fisiológica</b> .....	29
<b>5.5.1 Crecimiento a diferentes presiones osmóticas</b> .....	29
<b>5.5.2 Crecimiento a diferentes temperaturas</b> .....	29
<b>5.5.3 Formación de ascosporas</b> .....	30
<b>5.6 Diseño experimental y análisis estadístico</b> .....	30
<b>VI. RESULTADOS</b> .....	32
<b>6.1 Identificación molecular</b> .....	32
<b>6.2 Cinética de crecimiento</b> .....	34
<b>6.3 Caracterización fisiológica y observación de ascosporas</b> .....	36
<b>VII. DISCUSIÓN</b> .....	38
<b>7.1 Identificación molecular</b> .....	38
<b>7.2 Cinética de crecimiento</b> .....	39
<b>7.3 Caracterización fisiológica y observación de ascosporas</b> .....	40

<b>VIII. CONCLUSIONES</b> .....	43
<b>IX. REFERENCIAS DOCUMENTALES</b> .....	44

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Características y aplicaciones de los diferentes métodos moleculares .....	20
Cuadro 2. Longitud en pares de bases de la región ITS-5.8S amplificada por PCR y fragmentos obtenidos después de la digestión con las endonucleasas de restricción HhaI, HaeIII e HinfI, visualizadas en gel de agarosa al 3% en <i>K. marxianus</i> cepas 11 y 19.....	32
Cuadro 3. Parámetro cinético obtenido de las cepas 11 y 19 de <i>K. marxianus</i> .....	35
Cuadro 4. Respuesta a las pruebas de crecimiento a diferentes presiones osmóticas y temperaturas y tamaño de ascas y esporas de las cepas 11 y 19 de <i>K. marxianus</i> .....	36



# ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Patrón de bandas obtenido de <i>K. marxianus</i> cepas 11 y 19 de la amplificación por PCR-RFLP de la región ITS1-5.8S-ITS4 del ADNr. M; marcador de peso molecular de 100pb. Pozos 1-3; <i>K. marxianus</i> cepa 11, 4-6; <i>K. marxianus</i> cepa 19.....	33
Figura 2. Patrón de bandas obtenido de <i>K. marxianus</i> cepas 11 y 19, después de la digestión de la región amplificada ITS1-5.8S-ITS4 del ADNr, con las enzimas HhaI, HaeIII e HinfI, en gel de agarosa al 3%. M; marcador de peso molecular de 100pb. 11; <i>K. marxianus</i> cepa 11. 19, <i>K. marxianus</i> cepa 19.....	33
Figura 3. Ascosporas pertenecientes <i>K. marxianus</i> cepa 11 (objetivo 100x). .....	37
Figura 4. Ascosporas pertenecientes <i>K. marxianus</i> cepa 19 (objetivo 100x). .....	37

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Página
Gráfica 1. Cinética de crecimiento de <i>K. marxianus</i> cepa 11. ....	34
Gráfica 2. Cinética de crecimiento de <i>K. marxianus</i> cepa 19. ....	35

## RESUMEN

El comiteco es una bebida fermentada y destilada que se realiza de forma artesanal en la Meseta Comiteca Tojolabal de Chiapas. La fermentación del comiteco es un proceso espontáneo no controlado que aprovecha levaduras nativas, por tanto, es común que en este tipo de fermentación existan levaduras que no pertenezcan al género *Saccharomyces*, como *Kluyveromyces marxianus*, una de las especies con mayor presencia durante el proceso de fermentación del comiteco. El presente estudio tiene como propósito caracterizar fisiológicamente dos cepas de levadura (cepa 11 y 19) de la especie *K. marxianus* aisladas de la bebida tradicional comiteco, particularmente su crecimiento a diferentes presiones osmóticas, temperaturas, así como la formación de ascosporas. Las cepas estudiadas fueron analizadas mediante métodos morfológicos, fisiológicos, moleculares y cinéticos. Se evaluó el parámetro cinético de velocidad máxima donde las levaduras alcanzaron un valor de 0.2757 cel/ml·h<sup>-1</sup> y 0.2652 cel/ml·h<sup>-1</sup> para las cepas 11 y 19 respectivamente, de acuerdo al análisis estadístico puede decirse que no existen diferencias significativas. Los resultados demostraron que ambas cepas son termotolerantes a 30 °C, 37 °C y 42 °C y osmotolerantes a 50% y 60% p/v de glucosa. De acuerdo con la descripción de ascosporas se observó que las ascas de las cepas 11 y 19 mantenían formas elipsoidales con tamaños de 4.4098 µm y 4.4305 µm, respectivamente, conformándose con 1 a 2 ascosporas esféricas u ovaladas quienes a su vez medían 1.0935 µm para la cepa 11 y 1.1542 µm para la cepa 19, conforme a los análisis estadísticos puede inferirse que no existen diferencias significativas. Estos resultados indican que las cepas de *K. marxianus* 11 y 19 pueden considerarse elementos de estudio a futuro, debido a su posible potencial para aplicaciones biotecnológicas.

# I. INTRODUCCIÓN

El comiteco es una bebida fermentada y destilada que se elabora en la Meseta Comiteca Tojolabal de Chiapas. El proceso de producción del Comiteco es diferente a otros destilados porque es elaborado con azúcares de *Agave americana* o *Agave salmiana*, que no se obtienen al cocinar las piñas de *Agave* como el Tequila, además la fermentación del Comiteco es un proceso espontáneo no controlado que involucra levaduras nativas que utilizan el aguamiel del *Agave* como fuente de carbono y nitrógeno (Arana-Sánchez *et al.*, 2015). El aguamiel se recoge de una incisión realizada en el tallo de la planta de *Agave*, éste orificio se raspa para propiciar el brote de aguamiel; cabe señalar que en este proceso los *Agaves* no se desquiotan. Posteriormente, este jarabe se utiliza para preparar el mosto de fermentación mediante la adición de panela. Estas diferencias hacen que las bebidas destiladas tradicionales como el comiteco puedan tener atributos sensoriales diferentes del Tequila, Mezcal y otras bebidas destiladas (Lara-Hidalgo *et al.*, 2017; Valdivieso-Solís, 2019).

Cuando una fermentación es espontánea la probabilidad de que existan levaduras que no correspondan al género *Saccharomyces* es alta. Anteriormente, dichas levaduras se consideraban de importancia secundaria o de descomposición indeseables; hoy en día es ampliamente aceptado que las cepas seleccionadas a través de pruebas apropiadas pueden tener un impacto positivo en el proceso de fermentación (Padilla *et al.*, 2016).

La levadura *Kluyveromyces marxianus* posee características que son ventajosas para aplicaciones biotecnológicas, incluida la capacidad de asimilar azúcares clave; tasa de crecimiento rápido, con tiempos de generación típicos de aproximadamente 70 min; y termotolerancia, con la capacidad de crecer en temperaturas de hasta 52°C (Saini *et al.*, 2017). Aunque *K. marxianus* puede aislarse de diversas fuentes, es mejor conocido por su asociación con productos lácteos fermentados naturalmente, como el queso, los productos naturales asociados a esta levadura tienen una amplia diversidad de compuestos aromatizantes, y las levaduras pueden desempeñar un papel en la producción de

ésteres, cetonas, aldehídos y alcoholes particulares (Morrisey *et al.*, 2014). Valdivieso (2019) menciona que *Kluyveromyces marxianus* es una de las especies dominantes presente en el proceso de fermentación del comiteco y que esta levadura es responsable de la calidad sensorial final de esta bebida; sin embargo se carecen de estudios enfocados a la caracterización fisiológica de las cepas íntimamente relacionadas al comiteco, y se han encontrado variantes en la respuesta fisiológica de cepas de esta especie de levadura involucradas en distintos procesos fermentativos de otras bebidas (Lane *et al.*, 2011).

A pesar de la importancia del proceso y las características sensoriales del producto final, pocos trabajos han abordado la identificación y caracterización de las levaduras involucradas en el proceso de fermentación del Comiteco, aun conociendo que la diversidad de especies de levaduras desarrolladas durante la fermentación, su dinámica y frecuencia de aparición determinan las características y sabor de los productos (Valdivieso-Solís, 2019; Verdugo *et al.*, 2011; Suárez-Valles *et al.*, 2007). Por tanto, el presente estudio tiene como objetivo caracterizar fisiológicamente dos cepas de levadura de la especie *K. marxianus* aisladas de la bebida tradicional comiteco, particularmente su crecimiento bajo diferentes presiones osmóticas, diversas temperaturas y formación de ascosporas.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Generalidades del comiteco

El comiteco es una bebida fermentada y destilada elaborada en la Meseta Comiteca Tojolabal de Chiapas. El proceso de producción del comiteco es un proceso espontáneo no controlado que involucra levaduras nativas, se obtiene con azúcares de *Agave americana* o *Agave salmiana* que se utiliza para preparar el mosto de fermentación mediante la adición de panela, posteriormente se procede a la destilación del mosto fermentado para obtener el comiteco con sus atributos sensoriales particulares (Moreno-Terrazas *et al.*, 2017; Arana-Sánchez *et al.*, 2015; Lara-Hidalgo *et al.*, 2017; Valdivieso, 2019).

#### 2.1.2 Materias primas

El comiteco es elaborado con azúcares de *Agave americana* o *Agave salmiana* y *Saccharum officinarum*, recursos naturales con un elevado potencial e importancia económica para México (Valdivieso, 2019; Valenzuela, 1995).

##### 2.1.2.1 Descripción taxonómica y botánica de *Agave americana*

*A. americana* es una planta utilizada para la extracción de aguamiel y la elaboración de pulque. En Chiapas es la especie que se usa primordialmente para elaborar el licor comiteco. La variedad hortícola de *A. americana* es conocida como “maguey arroqueño” en Oaxaca y se emplea para la producción de mezcal. Es una especie nativa del sur de los Estados Unidos de América y México, ampliamente cultivada en todo el mundo. En Chiapas se ha observado en los municipios de Venustiano Carranza, Comitán de Domínguez y Las Rosas (Espinosa *et al.*, 2002; Reynoso-Santos *et al.*, 2012).

Descripción taxonómica (Tropicos, 2020a):

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Lilianae Takht.

Orden: Asparagales Link

Familia: Asparagaceae Juss.

Género: *Agave* L.

Especie: *Agave americana* L.

Hojas: 40-70 por roseta, 1.5-2.0 metros de largo, 15.0-25.0 centímetros de ancho, lanceoladas, rígidas, fibrosas, cóncavas, engrosadas hacia la base, ascendentes o reflejas, glaucas, lisas o ligeramente ásperas, margen recto o ligeramente ondulado a crenado dentado; dientes (0.5-)0.7-1.0 centímetros de largo, 0.6-1.2 centímetros de ancho, rectos o recurvados, parduzcos o grisáceos, distantes entre sí por 3.0-6.5 centímetros, espina terminal 3.5-4.0 centímetros de largo, 4.0-5.0 milímetros de diámetro, cónica, acanalada, grisácea, pruinosa (García Mendoza y Franco Martínez, 2018; Valdivieso, 2019, Missouri Botanical Garden Plant Finder, 2021a).

Inflorescencia: panícula laxa, (5.0-)8.0-9.0 metros de alto, contorno ovalado, fértil desde la mitad o el tercio superior, 20-35 de ramas primarias, de 1.0-1.2 metros de largo, ramas secundarias 1.0-1.5 metros de largo, terciarias 3.0 centímetros de largo; pedúnculo verde-glaucos; brácteas del pedúnculo 30.0-60.0 centímetros de largo y hasta 10.0 centímetros de ancho, triangulares, pronto secas, cactáceas, margen entero o con algunos dientecillos menores de 1.0 milímetro de largo, espina de 1.0-1.5 milímetros de largo, parda; pedicelos de 0.7-1.0 centímetros de largo (*ídem*).

Flores: de 7.0-10.0 centímetros de largo, hipocrateriformes a tubulares, verde-amarillentas; tépalos de 2.2-3.5 centímetros de largo, 3.0-5.0 milímetros de ancho, oblongos, erectos, gruesos, desiguales, los internos de 2.0-3.0 milímetros más cortos que los externos, fuertemente aquillados, con duplicados, ápice cuculado, cuello caliptra 5.0 milímetros de largo, acanalado; tubo del perigonio de 1.0-2.0 centímetros de largo, 1.5-2.0 centímetros de diámetro en la porción distal; estambres con filamentos de 7.0-9.0 centímetros de largo, insertos en la parte media del tubo, verde-amarillentos, anteras de 3.0-3.5 centímetros de largo, amarillas (*ídem*).

Cápsulas: de 4.0-5.5 centímetros de largo, 2.0-2.5 centímetros de diámetro, oblongas; semillas de 9.0-10.0 milímetros de largo, 7.0-8.0 milímetros de ancho, negras (*ídem*).

#### **2.1.2.2 Descripción taxonómica y botánica de *Agave salmiana***

*A. salmiana* es una especie endémica de México. Puede crecer como planta silvestre o como planta cultivada. En Chiapas se ha observado en los municipios de Venustiano Carranza y Comitán de Domínguez (Reynoso-Santos *et al.*, 2012).

Descripción taxonómica (Tropicos, 2020b):

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Lilianae Takht.

Orden: Asparagales Link

Familia: Asparagaceae Juss.

Género: *Agave* L.

Especie: *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck

Hojas: de 30-70 por roseta, (0.5-)1.0-2.2 metros de largo, 20.0-35.0 centímetros de ancho, lanceoladas, ampliamente lanceoladas u oblanceoladas, suculentas, erectas a recurvadas, cóncavas hacia la parte media, ápice acuminado, a veces con una curvatura sigmoidea, verde opaco, verde claro, verde-amarillento a verde-glaucos, en ocasiones el haz con tonos diferentes simulando franjas, margen repando o crenado, mamilas inconspicuas a prominentes hacia la parte media, dentado, dientes de 0.5-2.0 centímetros de largo, 1.0-2.0 centímetros de ancho, en ocasiones las bases son tan amplias que forman un margen córneo continuo, rectos o más o menos recurvados, pardo oscuros, grisáceos a negruzcos, distantes entre sí de 2.0-5.0 centímetros en la parte media de la hoja, espina terminal de 4.0-8.0(-12.0) centímetros de largo, 0.5-1.5 centímetros de ancho, robusta, angosta a ampliamente acanalada en el haz, en ocasiones decurrente de 12.0-17.0



centímetros, ocasionalmente aquillada en el envés (Gentry, 2004; García Mendoza y Franco Martínez, 2018, Valdivieso, 2019,).

Inflorescencias: panículas congestas, con 15-25 umbelas, contorno general piramidal, (3.0-)4.0-8.0 metros de alto, fértil en el tercio o el cuarto superior, ramas primarias hasta 1.0 metro de largo, también ramillas secundarias, terciarias y a veces cuaternarias; pedúnculo verduoso; brácteas de (18.0)25.0-45.0 centímetros de largo, (6.0)10.0-18.0 centímetros de ancho en la base, carnosas e imbricadas o coriáceas y separadas, deltoides, margen entero o con algunos dienteillos menores a 1.0 milímetro de largo, espina terminal de 0.5-3.0 centímetros de largo, parda a grisácea; pedicelos de 0.5-2.5 centímetros de largo (*ídem*).

Flores: de 6.0-9.0 centímetros de largo, infundibuliformes, amarillentas; tépalos de 2.0-3.0 centímetros de largo, 5.0-8.0 milímetros de ancho, oblongos, angostos hacia el ápice, margen involuto, ápice curvado hacia adentro en anthesis, gruesos, los externos ligeramente más largos que los internos, estos últimos aquillados, cuello de 5.0-10.0 milímetros de largo, tubo del perigonio de 1.0-2.0(-2.5) centímetros de largo, 1.3-2.0 centímetros de diámetro en la porción distal, sulcado; estambres con filamentos de 5.0-8.0 centímetros de largo, insertos a la mitad o el cuarto superior o en la boca del tubo, anteras de 2.0-3.5 centímetros de largo, 1.5-2.0 milímetros de ancho, amarillentas (*ídem*).

Cápsulas: de 6.0-7.0 centímetros de largo, 2.0-3.0 centímetros de ancho, oblongas, rostradas, leñosas; semillas de 7.0-9.0 milímetros de largo, 5.0-7.0 milímetros de ancho, negras (*ídem*).

### **2.1.2.3 Descripción taxonómica y botánica de *Saccharum officinarum***

Armida-Alcudia *et al.* (2011) y Aguilar (2010) mencionan que la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una de las principales actividades económicas en México, su cosecha se lleva a cabo en 665,000 ha que ocupan a 2.5 millones de personas por tanto se considera de importancia económica en el país. Fueron los españoles quienes introdujeron la caña de azúcar y tomaron así ventajas de las condiciones favorables que México ofrecía para el cultivo y la comercialización de

los productos de derivados de la caña de azúcar (melazas, azúcar, panela o piloncillo y aguardiente).

Descripción taxonómica (Tropicos, 2020c):

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Lilianae Takht.

Orden: Poales Small

Familia: Poaceae Barnhart

Género: *Saccharum* L.

Especie: *Saccharum officinarum* L.

Hojas: se distribuyen en posiciones alternas a lo largo del tallo, constituida por la lámina foliar y por la vaina, la unión de ambas se denomina lígula. Las vainas son glabras o pelosas, de forma tubular que envuelve al tallo y es ancha de la base y la lígula mide de 2.0-4.0 milímetros, la lámina va de 1.0-2.0 metros de largo y 2.0-6.0 de ancho, glabras y pendulosas, nervadura central en toda su longitud y paralela a ella nervaduras secundarias, pedúnculo densamente puberulento, eje glabro. El color de las hojas varía de verde-claro a oscuro (Valdivieso, 2019; Missouri Botanical Garden Plant Finder, 2021b).

Tallos: Tienen tallos cilíndricos a elípticos en su sección transversal, articulados, llamados ordinariamente cañas, en general con nudos macizos y entrenudos huecos y alargados, dulces y jugosos. Los tallos están formados por nudos separados por entrenudos, en los cuales se desarrollan las yemas y las hojas, el nudo está formado por el anillo de crecimiento, la banda de raíces, la cicatriz foliar y el anillo ceroso (*ídem*).

Inflorescencia: panícula sedosa en forma de espiga, consiste en un eje principal con articulaciones en las cuales se insertan espiguillas, una frente a la otra, con una o más flores sentadas o sésiles sobre un raquis articulado, a menudo

brevísimo, llamado raquilla y protegido por brácteas estériles denominadas glumas, que se insertan sobre la raquilla, una más abajo que la otra (*ídem*).

Flor: La flor es desnuda (carece de cáliz y corola), pero está acompañada generalmente por dos (raramente tres) pequeñas piezas escamosas traslúcidas, sobre filamentos delgados y más o menos largos. Los granos de polen son relativamente pequeños, con paredes muy tenues, livianos, monoporados y de polinización es anemófila. El gineceo está formado por un ovario globoso, piriforme o fusiforme, generalmente bicarpelar, unilocular, con dos estilos cortos y estigmas plumosos (*ídem*).

Fruto: Cariópse de forma ovalada de 0.5 milímetros de ancho y 1.5 milímetros de largo, fruto seco indehiscente, con una semilla cuya testa está soldada con el pericarpio formando una envoltura muy delgada. El embrión consta de la plántula unida a su cotiledón laminar, llamado escudete. El cotiledón es delgado, parenquimatoso (*ídem*).

## **2.2 Procesos fermentativos**

Los procesos fermentativos han sido utilizados y desarrollados por el hombre desde hace aproximadamente ocho mil años, a pesar de que no se conocía la existencia ni la influencia de los microorganismos de estos procesos. Una fermentación se define como un proceso que genera ATP mediante el cual las sustancias orgánicas (sustrato) sufren una serie de cambios químicos (reducciones y oxidaciones) que producen energía, actuando como dadores y aceptores de electrones. La fermentación puede producirse en ausencia de O<sub>2</sub> y es llevada a cabo por enzimas producidas por los microorganismos para tal finalidad (Hernández *et al.*, 2003; Berg *et al.*, 2007).

Chojnacka (2010) menciona que históricamente, los productos de fermentación eran principalmente productos alimenticios, pero en los últimos años se ha observado un mayor interés en la producción de productos químicos a granel o especiales (etanol, acetona, butanol, etanol, enzimas, aminoácidos, productos farmacéuticos), biocombustibles y aditivos alimentarios (modificadores del sabor).

La fermentación alcohólica es el proceso anaerobio mediante el cual se hidroliza el azúcar para formar anhídrido carbónico y alcohol etílico donde en primer lugar se libera dióxido de carbono del piruvato, que se convierte en el compuesto de dos carbonos acetaldehído; y posteriormente, es reducido por el NADH a etanol. Muchas bacterias y levaduras llevan a cabo la fermentación alcohólica, la más frecuente es realizada por las levaduras del género *Saccharomyces* (Godoy *et al.*, 2003; Campbell y Reece, 2007).

### **2.2.1 Microorganismos en la fermentación**

Entre los microorganismos presentes en la fermentación, las levaduras son indudablemente el grupo más importante ya que ha sido explotado para propósitos comerciales, sin embargo, existen otros microorganismos utilizados como hongos que son empleados en la producción de queso o medicamentos, como la penicilina. Bacterias ácido lácticas llevan a cabo fermentaciones principalmente para la producción de yogurt, queso, salchichas y encurtidos (Romano *et al.*, 2006; Yousef y Carlstrom, 2003).

Las levaduras han sido usadas como un recurso efectivo y de bajo costo para preservar la calidad y seguridad de alimentos. Asimismo, el enriquecimiento biológico de levaduras en las fermentaciones le agrega valor y mejora la calidad nutricional, aportan productos sensoriales como aroma y sabor, además, modifican la textura del sustrato. Pueden estar presentes naturalmente (fermentación espontánea) o agregados (fermentación inoculada) en la materia prima, descomponen los carbohidratos y proteínas complejos en elementos más fáciles de digerir (Romano *et al.*, 2006).

### **2.3 Generalidades de las levaduras**

Las levaduras son organismos eucariotas clasificados como hongos unicelulares no filamentosos con una forma esférica u oval típica. Las levaduras están ampliamente distribuidas en la naturaleza; juegan un rol importante en la industria, el ambiente, y la ciencia médica (Walker, 2009; Tortora *et al.*, 2007). Las levaduras que se utilizan en la actualidad para producir el vino, la cerveza, el whisky y el pan son casi siempre

cepas de *S. cerevisiae* y otras especies muy relacionadas con ella (Ingraham e Ingraham, 1998).

Se ha clasificado a las levaduras entre los ascomicetos y basidiomicetos, y pueden ser definidas como esos hongos cuyo desarrollo asexual resulta predominantemente por gemación o fisión, y que no forman sus estados sexuales dentro o sobre un cuerpo fructífero. Para las levaduras pertenecientes a los ascomicetos, esta distinción ha sido justificada por comparaciones moleculares (Kurtzman *et al.*, 2011a).

Las levaduras se encuentran en la mayoría de las frutas y flores, así como también en los exudados de las plantas. Pueden crecer como anaerobios facultativos, utilizando el oxígeno o un compuesto orgánico como aceptor final de electrones, este es un atributo valioso porque permite que estos hongos sobrevivan en diversos ambientes. Si tienen acceso al oxígeno las levaduras llevan a cabo la respiración aeróbica para metabolizar los hidratos de carbono a dióxido de carbono y agua; en ausencia de oxígeno fermentan los azúcares y producen etanol y dióxido de carbono (Tortora *et al.*, 2007; Ingraham e Ingraham, 1998).

La temperatura de crecimiento de la mayoría de las levaduras está comprendida entre 5 y 37 °C. El valor óptimo se sitúa hasta los 28 °C. Sin embargo, estas temperaturas no son rigurosamente las óptimas de crecimiento de las levaduras cuando se encuentran en sus ambientes naturales. De modo general las levaduras no son microorganismos termofílicos, sin embargo, la termodestrucción comienza desde los 52 °C, siendo las células más sensibles en la fase exponencial que en la estacionaria (Uribe, 2007). Otro requerimiento físico para el crecimiento de las levaduras se relaciona al pH del medio. Walker (1998) menciona que con respecto al pH, la mayoría de las levaduras crecen mejor entre un pH de 4.5 a 6.5, pero casi todas las especies son capaces de crecer, aunque en menor medida, en medios más ácidos o alcalinos (entre pH 3 o pH 8, respectivamente).

De acuerdo con ambos filos Ascomicota y Basidiomicota existen aproximadamente 2,000 especies de levaduras descritas hasta ahora. Está

estimado que constituyen del 1-1.5% de las especies de hongos descritas. Es importante no sólo apreciar la inmensa biodiversidad de levaduras no explotada sino también crear técnicas para caracterizarlas y conservarlas, especialmente aquellas con potencial biotecnológico, por tanto, es necesario el esfuerzo extensivo para comprender la diversidad de levaduras aún por describir (Satyanarayana y Kunze, 2017; Walker, 1998).

### **2.3.1 Generalidades de *Kluyveromyces marxianus***

La historia de la taxonomía de *Kluyveromyces* es caracterizada por una serie de descubrimientos interesantes empezando con la creación del género. Las especies del género *Kluyveromyces* son frecuentemente aisladas de bebidas fermentadas y productos lácteos, pero hasta ahora no se ha reportado su presencia en plantas. Tienen ventajas biotecnológicas por su amplia variedad de consumo de sustratos, alto rendimiento, tolerancia al etanol y también baja producción de ácido acético. Existen seis especies dentro del género y la especie *Kluyveromyces marxianus* está propuesta como la especie tipo conservada (especie que está asociada permanentemente con el género) debido al gran número de publicaciones sobre dicha especie pues ha despertado un interés particular, a causa de sus características beneficiosas que la hacen excepcionalmente adecuada para aplicaciones industriales (Pérez-Brito *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2008; Lachance, 2011; López *et al.*, 2014; Karim *et al.*, 2020).

#### **2.3.1.1 Metabolismo y fisiología de *Kluyveromyces marxianus***

La levadura de leche *K. marxianus* se describe como homotálica y hemiascomiceta, es de particular interés por sus rasgos que la hacen especialmente adecuada para su aplicación industrial; estos incluyen su tasa de crecimiento alta, termotolerancia, capacidad de asimilar una amplia gama de azúcares, secreción de enzimas líticas y la producción de etanol por fermentación. Está filogenéticamente relacionada con *S. cerevisiae*, y su especie hermana más conocida es *Kluyveromyces lactis* (Lane y Morrisey, 2010; Fonseca *et al.*, 2008)

Se clasifica como fermentativo facultativo y Crabtree negativo ya que no se observa producción de etanol después de agregar glucosa a las células, esto se debe a que lleva el gen necesario para la producción de etanol por fermentación, pero solo bajo ciertas condiciones adoptará el estilo de vida de la fermentación (Wardrop *et al.*, 2004; Lane y Morrissey, 2010; Fonseca *et al.*, 2008). Es una levadura aeróbica y su capacidad de generar energía mediante respiración y fermentación mixtas se describe como metabolismo respiro-fermentativo. Esta capacidad dual es común en las levaduras hemiascomicetas (Lane *et al.*, 2011)

Tiene una de las tasas de crecimiento más rápidas que cualquier microbio eucariota, además, esta levadura es capaz de crecer en lactosa como única fuente de carbono y energía, lo que presenta la posibilidad de utilizar el suero de queso como fuente barata de nutrientes para su cultivo. La capacidad de utilizar lactosa es conferida por dos genes, LAC12, que codifica una permeasa de lactosa requerida para la absorción de lactosa en la célula, y LAC4, que codifica una  $\beta$ -galactosidasa que hidroliza la lactosa a los monómeros glucosa y galactosa. (Groeneveld *et al.*, 2008; Heck *et al.*, 2004; Lane y Morrissey, 2010).

*K. marxianus* forma de una a cuatro ascosporas. Las esporas varían en forma desde esféricas a elipsoidales o reniformes. Los cultivos esporulantes parecen ser homotáticos. Las esporas se liberan del ascus poco después de la formación y tienden a aglutinarse. La esporulación ocurre después de 2-5 días entre 17-25 °C en agar con extracto de malta al 1% y agar con acetato de McClary (Lachance, 2011).

### **2.3.1.2 Aplicaciones biotecnológicas de *Kluyveromyces marxianus***

El interés por las aplicaciones biotecnológicas de *K. marxianus* incluyen principalmente la capacidad de utilizar una amplia gama de azúcares que incluyen lactosa e inulina, termotolerancia, secreción de enzimas líticas, la tasa de crecimiento más alta que otros eucariotas y la producción de etanol combustible por fermentación. Un aspecto muy importante en la ecología de *K. marxianus* es que ha sido aislada de una amplia variedad de hábitats naturales como los productos

lácteos tradicionales fermentados, el grano de kéfir, las aguas residuales de las industrias azucareras, las hojas de sisal y las plantas (Karim, 2020; Dekker *et al.*, 2021; Pengsong *et al.*, 2021).

Varias cepas pertenecientes a la especie han alcanzado el estatus de Qualified Presumption of Safety (QPS) y GRAS en la Unión Europea y Estados Unidos respectivamente por consiguiente, se ha utilizado para la producción de productos farmacéuticos, proteínas de calidad alimentaria y aromas como acetato de isoamilo (aroma afrutado) en fermentación líquida (Medeiros *et al.*, 2000; Fonseca *et al.*, 2008; Lane y Morrissey, 2010; Karim, 2020).

*K. marxianus* se ha utilizado como productor de inulinasa para convertir fructosa en inulina. Además, esta especie de levadura puede producir pectinasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucosidasa, poligalacturonasa y algunas otras enzimas (Aziz *et al.*, 2012; Homayouni-Rad *et al.*, 2020).

Es ideal para la producción de biomasa debido a su clasificación de Crabtree negativo, *K. marxianus* respira incluso en niveles altos de glucosa lo que la hace más efectiva para convertir rápidamente las fuentes de carbono disponibles en biomasa por lo que corresponde a medios de crecimiento industrial (Wardrop *et al.*, 2004).

## **2.4 Identificación y caracterización de levaduras**

Las especies de levaduras pueden ser identificadas y caracterizadas de acuerdo a varios criterios basados en morfología celular (división celular y formación de esporas), fisiológicamente (pruebas de fermentación), inmunología (inmunofluorescencia), y biología molecular (polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción del rDNA/rRNA, RFLP, polimorfismo del DNA aleatoriamente amplificado, RAPD, análisis de microsatélites) (Walker, 2009; Orberá, 2004).



### 2.4.1 Métodos morfológicos de identificación de levaduras

Los criterios tradicionalmente usados en la caracterización morfológica de levaduras pueden ser por su reproducción sexual o asexual, tamaño y forma celular o descripción de colonias en medio sólido (textura, color, superficie, elevación y margen) (Kurtzman *et al.*, 2011b; Guadalupe-Daqui *et al.*, 2021).

Las células de levaduras presentan formas variadas usualmente redondas, ovoides o cilíndricas. Poseen una membrana bastante gruesa. La mayoría tienen un interior incoloro que contiene vacuolas y gránulos refractivos. A menudo, se puede observar un pigmento rojo, café, gris o amarillo. La dimensión de las células de levaduras varía entre 1 a 4 o 5  $\mu\text{m}$  de ancho y de 1 a 5 o 9  $\mu\text{m}$  de largo. Hay una gran diferencia en las células de la misma especie. Las levaduras son muy polimórficas y son capaces de asumir diferentes formas, dependiendo del medio en que estén cultivadas, su edad y las condiciones físicas y químicas del ambiente. Es por esto que es difícil encontrar en la morfología de las levaduras la característica diferencial que permita una estrecha separación de variedades (Deak y Bauchat, 1996; Guilliermond, 2003).

La respuesta de la morfología de la colonia es un sistema prometedor para el estudio de procesos de desarrollo multicelulares simples porque implica la comunicación célula-célula, la diferenciación y especialización celular, además de la adhesión celular (Granek y Magwene, 2010). Para poder realizar una descripción completa de la colonia se pueden tomar en cuenta aspectos como: textura: mucoide, fluida o viscosa, butirosa, friable o membranosa; color: se registran todos los colores distintivos, como amarillo, naranja y rojo; superficie: brillante o sin brillo, lisa, rugosa, sectorizada, doblada, acanalada o hirsuta; elevación: si el crecimiento es plano, deprimido en el centro, elevado y con forma de cúpula, o cónico; margen: si el borde de la veta o colonia es entero, ondulado, lobulado, erizado o con flecos o pseudohifas (Kurtzman *et al.*, 2011b; Valdivieso, 2019).

## **2.4.2 Métodos fisiológicos de identificación de levaduras**

La caracterización fisiológica sigue siendo importante para la identificación de cepas de levaduras desconocidas. Las pruebas fisiológicas comúnmente usadas para identificación son: fermentación de siete u ocho carbohidratos, crecimiento en varias fuentes carbono y nitrógeno, crecimiento a diferentes temperaturas, crecimiento en medios con alto contenido de azúcar o cloruro de sodio y resistencia a antibióticos (Kurtzman *et al.*, 2011b; Ramos y Magalhães-Guedes, 2021).

### **2.4.2.1 Parámetros fisiológicos**

La prueba de fermentación de carbohidratos se califica por el tiempo que le tome a la levadura llenar el inserto con gas y la cantidad acumulada. La prueba de asimilación de compuestos de carbono es medida con respecto a la turbidez. Las pruebas de crecimiento a diferentes presiones osmóticas y temperaturas se determinan por la cantidad de crecimiento (Kurtzman *et al.*, 2011b, Endoh *et al.*, 2021).

### **2.4.2.2 Fermentación de carbohidratos**

Parece que no hay excepciones a la regla de que cuando una cepa de levadura fermenta un carbohidrato, también puede crecer en ella. Sin embargo, muchas levaduras crecen aeróbicamente en azúcares que no pueden fermentar. Por tanto, este método se basa en la capacidad de las levaduras de fermentar azúcares, según lo medido por la producción de dióxido de carbono. El medio basal debe estar libre de contaminantes con azúcares fermentables. La fermentación de D-glucosa, D-galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, rafinosa y  $\alpha$ -trehalose son generalmente utilizados para la identificación (Kurtzman *et al.*, 2011b).

### **2.4.2.3 Asimilación de compuestos de carbono**

Esta prueba determina la habilidad de la levadura de crecer aeróbicamente en un compuesto de carbono particular suministrando como la única fuente de energía. Para propósitos de identificación, el crecimiento en los siguientes compuestos son usualmente determinados: hexosas (D-glucosa, D-galactosa), pentosas (D-xilosa, D-ribosa), disacáridos (sacarosa, maltosa), trisacáridos (rafinosa, melezitosa),

polisacáridos (almidón solubles, inulina) (Kurtzman *et al.*, 2011b, Endoh *et al.*, 2021).

#### **2.4.2.4 Crecimiento a diferentes presiones osmóticas**

Cuando la levadura se expone al mosto, se somete a una presión osmótica. Las presiones osmóticas muy altas, como las que se encuentran en los mostos de alta densidad, pueden distorsionar el metabolismo de la levadura o disminuir la viabilidad de la levadura. Las levaduras responden a dicho choque hiperosmótico mediante la modificación de su pared celular y citoesqueleto y la síntesis y acumulación de compuestos compatibles, que ayudan a restablecer un equilibrio osmótico. Existen especies que han demostrado un crecimiento óptimo en un medio suplementado con D-glucosa al 50% (Pratt *et al.*, 2003; García *et al.*, 2021).

#### **2.4.2.5 Crecimiento a 37 °C y otras temperaturas**

La temperatura tiene un efecto significativo sobre el intercambio energético y funcional de las células y, por lo tanto, afecta la tasa de crecimiento específico de la levadura y su tiempo de generación. La mayoría de las levaduras tienen temperaturas óptimas que oscilan entre 30 y 37 °C, otras pueden crecer a temperaturas superiores a 40 °C (Costa *et al.*, 2014; Meledina *et al.*, 2021).

### **2.4.3 Métodos moleculares para la identificación de levaduras**

#### **2.4.3.1 Análisis de microsatélites**

Esta técnica se basa en el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y consiste en la amplificación de fragmentos con cebadores de oligonucleótidos específicos para secuencias simples repetitivas presentes en el DNA, denominadas microsatélites. Entre los más utilizados se encuentran (GTC)<sub>5</sub>, (GACA)<sub>4</sub>, Fago DNA M13 y la secuencia del M13 GAGGGTGGCGGTTCT. Esta técnica difiere del RAPD, en que la temperatura de hibridación del cebador es mayor (55 °C), en lugar de la de 37 °C, por lo que estos hibridan en zonas específicas del genoma, de ahí que la reproducibilidad es mayor (Orberá, 2004).

#### **2.4.3.2 Análisis de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)**

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) es una técnica molecular basada en la digestión por restricción de la región del espaciador transcrito interno (ITS) del ADNr que consta del gen de ARNr 5.8. Para la identificación de levaduras se han analizado los patrones de restricción generados a partir la amplificación de la región que abarcan los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) que flanquean el gen 5.8s ARNr. La amplificación de la región ITS ha permitido los análisis de restricción con enzimas de restricción (Hinfl, Cfol y HaeIII) las cuales arrojan un patrón de restricción específico para cada especie (Pham *et al.*, 2011; Verdugo, 2013; Allahyary, 2020).

#### **2.4.3.3 Polimorfismo del DNA aleatoriamente amplificado (RAPD)**

También conocida como polimorfismo de producto amplificado al azar, es una técnica que emplea marcadores moleculares para amplificación por PCR de secuencias cortas de ADN polimórfico usando un cebador de secuencia corta (10 a 12 pares de bases). Debido a la baja temperatura de hibridación (35-39° C) el cebador se une a sitios inespecíficos, distribuidos en regiones aleatorias en todo el genoma, permitiendo la amplificación de fragmentos polimórficos de DNA. Los productos amplificados se visualizan por electroforesis. Al ser una técnica basada en la PCR, necesita control sobre ciertos factores que pueden influir directamente en el desempeño de la técnica como los dNTPs, TaqDNA polimerasa, temperatura de hibridación, tiempo de extensión, ciclos y la integridad de la cadena molde. El uso de RAPD permite obtener las llamadas “huellas genómicas” que no son más que las diferencias de número y tamaño en los fragmentos del DNA amplificado, las cuales son específicas para cada especie e incluso se pueden observar diferencias menores entre diferentes cepas que pertenecen a la misma especie (Loureiro, 2000; Orberá, 2004; Angarita-Merchán *et al.*, 2017).

El polimorfismo del DNA aleatoriamente amplificado (RAPD) ha sido utilizada para la identificación y tipificación de levaduras aisladas de leche

fermentada y quesos. La técnica, es considerada rápida y fácil de realizar, podría ser una alternativa a los enfoques convencionales para la identificación de levaduras (Andrighetto *et al.*, 2000).

#### **2.4.3.4 PCR en tiempo real**

La PCR en tiempo real, también llamada PCR cuantitativa (QPCR por sus siglas en inglés) es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. Posee características importantes como alta especificidad, amplio rango de detección (de 1 a 10<sup>7</sup> equivalentes genómicos de la secuencia blanco) y rapidez en la visualización del producto ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior (Hierro *et al.*, 2006; Brechtbuehl *et al.*, 2001; Aguilera *et al.*, 2014). Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores para llevar a cabo la PCR a tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación (Verdugo, 2013).

Esta técnica se ha desarrollado para detectar y cuantificar rápidamente el número total de levaduras sin necesidad de cultivarlas en un medio de cultivo, por medio de cebadores universales para levaduras basados en los dominios D1/D2 del gel de ARNr 26S, secuencias disponibles para todas las especies de levaduras Ascomycotas conocidas (Kurtzman y Robnett, 1998; Hierro *et al.*, 2006).

#### **2.4.3.5 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)**

La DGGE es un tipo de electroforesis que permite la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño, pero con diferente secuencia de nucleótidos. Para ello, un gradiente lineal creciente de agentes químicos desnaturalizantes del ADN (una mezcla de urea y formamida) se incorporan a lo largo de un gel de poliacrilamida. Durante la electroforesis, se mantiene una temperatura constante de 50-65° C y los fragmentos de ADN de doble cadena migran por el gel hasta encontrar una determinada concentración de urea y formamida (concentración desnaturalizante)

a la cual las cadenas se separan localmente de tal manera que fragmentos con diferentes grados de desnaturalización, producirán bandas en diferentes posiciones en el gel (Fernández-Suárez y Le Borgne, 2014; Verdugo, 2013). Con esta técnica se han hecho estudios para analizar las especies de levaduras presentes en etapas sucesivas en la fermentación del vino o sobre la ecología de levaduras en las uvas de vino, entre otros (Boundy-Mills, 2006).

**Cuadro 1. Características y aplicaciones de los diferentes métodos moleculares**

<b>Tipo de método molecular</b>	<b>Características</b>	<b>Aplicación</b>
<b>Análisis de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)</b>	PCR estándar con paso posterior de digestión con enzimas de restricción (Angarita-Marchán <i>et al.</i> , 2017).	Detección de polimorfismos correspondientes a los fragmentos de diferentes tamaños, que se generan con el corte de cada endonucleasa (Angarita-Marchán <i>et al.</i> , 2017).
<b>Polimorfismo del DNA aleatoriamente amplificado (RAPD)</b>	Mediante la técnica PCR se amplifica el ADN genómico en presencia de un iniciador (10 -14pb) de secuencia arbitraria, posteriormente se evalúan varios iniciadores de los cuales solo algunos presentarán un polimorfismo moderado (Vásquez <i>et al.</i> , 2016).	Permite obtener las “huellas genómicas” que son las diferencias de número y tamaño en los fragmentos del ADN amplificado con diferentes perfiles moleculares (Vásquez <i>et al.</i> , 2016).
<b>PCR en tiempo real (QPCR)</b>	PCR estándar donde se utilizan tinciones o sondas con fluoróforos para la detección de los fragmentos amplificados; puede ser del tipo múltiple (Angarita-Marchán <i>et al.</i> , 2017).	Detección cualitativa de uno o varios segmentos de ADN. Cuantificación de ADN en la muestra (cargas) o expresión de genes (Angarita-Marchán <i>et al.</i> , 2017).
<b>Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)</b>	Tipo de electroforesis que permite la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño, pero con diferente secuencia de nucleótidos (Fernández-Suárez y Le Borgne, 2014).	Diseñada para detectar mutaciones puntuales ya que se pueden separar fragmentos de ADN cuyas secuencias de nucleótidos difieren en una sola base nitrogenada (Fernández-Suárez y Le Borgne, 2014).

## **2.5 Cinética de crecimiento de levaduras**

El crecimiento celular implica el incremento de su masa y tamaño físico controlando su ambiente físico, biológico y químico. Es cuantificado por el incremento de los componentes macromoleculares y químicos de la célula y el patrón de crecimiento de cada microorganismo es único (Sakthiselvan, 2019).

En condiciones controladas las levaduras en el proceso de fermentación pasan por diferentes etapas de crecimiento, estas se representan por una curva que describe el cambio de la población con respecto al tiempo de cultivo. Durante las primeras horas la población de levaduras no incrementa, es llamada fase de latencia y es necesaria para que la célula se adapte a las nuevas condiciones ambientales, la levadura comienza a metabolizar los azúcares y otros nutrientes. Una vez que se ha adaptado, comienza el crecimiento, esta etapa se llama fase de crecimiento exponencial, está altamente influenciada por la temperatura, concentración de amonio, aminoácidos entre otros nutrientes, y la presencia de oxígeno. Posteriormente, la levadura deja de crecer porque algunos nutrimentos son deficientes. Durante esta nueva fase, llamada fase semi-estacionaria, la población de levaduras permanece estable. Más tarde, la fase de disminución comienza y la población de levaduras decrece gradualmente hasta que desaparezcan, durante este periodo, las levaduras mueren por la falta de nutrientes o por la presencia de sustancias que inhiben su crecimiento o son tóxicas como el etanol (Zamora, 2009; Valdivieso, 2019).

### **2.5.1 Parámetros cinéticos**

Los parámetros cinéticos de crecimiento microbiano son las herramientas básicas para escalar los procesos biotecnológicos evaluados en de laboratorio, puesto que permiten predecir el desarrollo de la fermentación y evaluar los rendimientos y las productividades en los procesos (Zapata *et al.*, 2005).



La tasa de crecimiento se define como la velocidad (o tasa) de crecimiento en la fase logarítmica entre unidad de concentración de biomasa (Douglas *et al.*, 1995):

$$\mu = \frac{r1}{X}$$

Donde  $\mu$  es la tasa de crecimiento ( $t^{-1}$ ),  $r1$  es la fase logarítmica ( $t^{-1}$ ) y  $X$  concentración de biomasa (cel/ml).

Durante años se ha demostrado que las velocidades de crecimiento de microorganismos suspendidos libremente dependen de la concentración de los constituyentes del medio nutriente. La descripción algebraica de esta dependencia se expresa más comúnmente mediante la ecuación de Monod, que es una expresión empírica basada en la forma de la ecuación normalmente asociada con la cinética de enzimas:

$$\mu = \frac{\mu \text{ max. } S}{Ks + S}$$

Donde  $\mu$  es la velocidad de crecimiento específica ( $h^{-1}$ ),  $\mu \text{ max}$  es la velocidad de crecimiento específica máxima ( $h^{-1}$ ),  $Ks$  es un coeficiente del sistema y  $S$  es la concentración de sustrato en la solución acuosa (Atkinson, 1985).

### III. ANTECEDENTES

En México las bebidas fermentadas tradicionales han sido estudiadas ampliamente, algunos de estos estudios se enfocan en las levaduras asociadas al proceso de fermentación principalmente para entender la razón de sus sabores, aromas o compuestos volátiles característicos y finalmente poder aplicar los conocimientos obtenidos en herramientas biotecnológicas. La primera investigación para abordar el tema corresponde a Escalante-Minakata *et al.* (2008) identificaron las levaduras y bacterias en la fermentación del mezcal de *Agave salmiana*, donde encontraron once microorganismos diferentes de los cuales tres de ellos eran levaduras (*Candida lusitanae*, *Pichia fermentans* y *K. marxianus*) y las ocho restantes fueron bacterias, principalmente bacterias tipo ácido lácticas. A pesar de que la diversidad microbiana en mezcal es dominado por bacterias, los autores dilucidan que *P. fermentans* y *K. marxianus* podrían ser levaduras con alto potencial para la producción de algunos compuestos volátiles en mezcal, además, la presencia y concentración de compuestos volátiles son cruciales para la calidad de la bebida.

Verdugo *et al.* (2011) estudiaron las levaduras presentes en la fermentación del mezcal de San Luis Potosí procedente de *Agave salmiana*; identificaron 8 especies de levaduras utilizando métodos moleculares: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kluyveri*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Clavispora lusitanae*, *Torulaspota delbrueckii*, *Candida ethanolica* y *Saccharomyces exiguus*. Con el método PCR-DGGE detectaron tres especies pertenecientes a los géneros *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii*.

Santiago-Urbina *et al.* (2014) aislaron e identificaron las especies de levaduras asociadas a taberna, un vino de palma tradicional que se produce por fermentación espontánea de la savia de palma obtenida de *Acrocomia aculeata*. Nueve especies de levaduras fueron identificadas de tres árboles de palma (*S. cerevisiae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Candida intermedia*, *Kazachstania unispora*, *Kazachstania exigua*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia kudriavzevii* (*Issatchenkia orientalis*) y *P. kluyveri*). Las levaduras *H. guilliermondii* y *C. tropicalis* fueron las especies más comunes en las muestras de taberna. También

refieren que la frecuencia y distribución de las especies de levaduras fueron diferentes en las muestras de cada palma, lo que indicó que el inóculo en la savia de la palma puede depositarse aleatoriamente por diferentes vectores.

Los estudios publicados anteriormente sobre bebidas fermentadas sugieren que las levaduras que no pertenecen al género *Saccharomyces* juegan un papel importante en las etapas iniciales de fermentación y pueden aumentar la diversidad de aromas y sabores. Johnson (2012) describió los procesos actualmente usados por la industria para las levaduras pertenecientes a la división Ascomycota. Mencionó que estas especies son particularmente importantes en la producción de alimentos y etanol, proteínas unicelulares, la producción heteróloga de proteínas y enzimas, y como organismos modelo, fundamentales para la delineación de genes y su función en el metabolismo de mamíferos y humanos y procesos de enfermedades. En contraste con el rol de las levaduras correspondientes a la división Basidiomycota donde Johnson (2013) los abordó desde la perspectiva biotecnológica, señalando que estas levaduras son conocidas principalmente por la producción de enzimas utilizadas en síntesis farmacéutica y química; para la producción de ciertas clases de metabolitos primarios y secundarios, como terpenoides y carotenoides; para el catabolismo aeróbico de fuentes de carbono complejas y para la biorremediación de contaminantes ambientales y xenotoxicantes.

Varela (2016) realizó una revisión acerca del impacto de las levaduras no *Saccharomyces* en la composición volátil y perfil sensorial de cerveza, vino, licores y otras bebidas fermentadas; menciona que las interacciones entre *Saccharomyces* y no *Saccharomyces* pueden afectar el rendimiento de la fermentación y las propiedades sensoriales del producto resultante.

El interés de estudiar a *Kluyveromyces marxianus*, una levadura de grado alimenticio, ha ido en aumento debido a los rasgos ventajosos que posee, como la termotolerancia y el rápido crecimiento que la hacen atractiva para aplicaciones biotecnológicas. Pérez-Brito *et al.* (2007) utilizaron diferentes técnicas moleculares basadas en PCR para obtener una caracterización más rápida pero precisa de

cepas de *K. marxianus* aisladas de henequén (*Agave fourcroydes*) un agave de interés económico en la península de Yucatán.

Lane *et al.* (2011) examinaron la diversidad fenotípica y fisiológica en una selección de 13 cepas de *K. marxianus* para tratar de establecer el grado de variación dentro de la especie. Observaron una amplia variedad de respuestas al estrés térmico, osmótico y observaron estrés de la pared celular; algunas cepas mostraron resistencia al estrés múltiple.

Morrisey *et al.* (2014) hace una revisión sobre las aplicaciones industriales de la levadura *K. marxianus* para la producción biotecnológica de moléculas de aroma y aroma natural.

En 2017, Saini *et al.* demostraron que cepas de *K. marxianus* fueron más resistentes al estrés oxidativo y osmótico que *S. cerevisiae*. Asimismo, López-Alvarez *et al.* (2012) utilizaron cepas aisladas de *K. marxianus* para la fermentación a nivel industrial en la producción de tequila; probaron que la bebida destilada producida con *K. marxianus* muestra mayores rendimientos de etanol y mayores compuestos volátiles que los de la bebida producida con *S. cerevisiae*.

Lara-Hidalgo *et al.* (2017) estudiaron la fermentación del comiteco utilizando la levadura *K. marxianus* por fermentación de *Agave americana* y miel de panela. También determinaron los compuestos volátiles y propiedades sensoriales de la bebida destilada, encontraron 13 compuestos volátiles principales y 20 compuestos volátiles menores.

Valdivieso (2019) realiza su tesis de maestría acerca de las levaduras asociadas al comiteco donde identificó 8 especies de levaduras: *K. marxianus*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida pararugosa*, *G. silvícola*, *Wickerhamomyces anomalus*, *S. cerevisiae*, *Trichosporon asahii* y *Zygosaccharomyces bailii*.

## IV. OBJETIVOS

### General

Caracterizar fisiológicamente dos cepas de la levadura *Kluyveromyces marxianus* aisladas del Comiteco, bebida tradicional de Chiapas.

### Específicos

- Identificar las fases de la cinética de crecimiento poblacional de las cepas de *K. marxianus* aisladas de la fermentación de comiteco y comparar la velocidad máxima de crecimiento.
- Determinar las respuestas fisiológicas de cada cepa de *K. marxianus* en diferentes condiciones de crecimiento.
- Comparar el comportamiento fisiológico entre las cepas de *K. marxianus* para identificar su potencial biotecnológico.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Cepas de levadura

Se utilizó un total de dos cepas (cepas 11 y 19), todas pertenecientes a la especie *K. marxianus*, las cuales se aislaron de la bebida tradicional comiteco en muestreos realizados por Valdivieso (2019).

### 5.2 Reactivación de las cepas

Todas las cepas se reactivaron en caldo YPD (20 g/L extracto de levadura, 10 g/L de peptona de caseína, 10 g/L dextrosa), incubándose con agitación a temperatura ambiente durante seis horas, al cabo de las cuales se distribuyeron en tubos eppendorff con 50% de glicerol (500 µL de cultivo fresco más 500 µL de glicerol estéril) y se congelaron a -20 °C durante este estudio. Para cada prueba que se llevó a cabo, las cepas se recuperaron inoculando una alícuota en agar o caldo YPD, según sea el caso y se incubarán a 29 °C.

### 5.3 Caracterización molecular

#### 5.3.1 Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción de la región ITS- 5.8S del ADNr (RFLP): amplificación

Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de 25 µL por cada microtubo de 125 µL con una mezcla que contuvo 12.5 µL de Go Taq® Green MMix de Promega Corporation y 10.5 µL de agua destilada estéril, las regiones 5.8S se amplificaron con los cebadores universales ITS 1 (5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G- 3') con 1 µL e ITS 4 (5- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC- 3') con 1 µL. Para la toma del inóculo se picó una colonia fresca de cada cepa con la punta de un asa bacteriológica y se suspendió en cada tubo de reacción. El programa de PCR fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95° C por 25 minutos, seguido de 35 ciclos bajo las siguientes condiciones; desnaturalización a 94 °C durante un minuto, alineamiento a 55 °C por dos minutos y extensión a 72 °C por dos minutos. Por último; una extensión final a 72 °C durante 10 minutos y con la posibilidad de almacenar en el equipo por tiempo ilimitado a 4 °C. Las condiciones de reacción se

basaron en lo descrito por Esteve-Zarzoso *et al.* (1999) con modificaciones de Verdugo (2013).

Las muestras amplificadas se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (UltraPure TM, Invitrogen) al 1% durante 30 minutos a 80 Volts; en cada pozo se depositó 3  $\mu$ L de muestra amplificada. El gel se tiñó con Bromuro de Etidio (BrEt) al 1% durante 30 minutos; la visualización del mismo se efectuó en una cámara de luz UV.

### **5.3.2 Digestión**

Las muestras amplificadas fueron digeridas usando las enzimas de restricción HhaI, HaeIII y HinfI (de Promega Corporation); preparando para cada enzima una mezcla de reacción que contuvo 0.5  $\mu$ L de enzima, 0.2  $\mu$ L de albúmina de suero bovino acetilada, 2  $\mu$ L de buffer 10X y 16.3  $\mu$ L de agua libre de proteasas, por cada reacción. Se distribuyó 19  $\mu$ L de la mezcla anterior a cada microtubo de 125  $\mu$ L y se añadió 6  $\mu$ L del ADN amplificado. La digestión se llevó a cabo en un termociclador durante 2 horas a 37 °C. Los fragmentos de restricción fueron analizados mediante corrimiento en gel de agarosa al 3% por 2 horas a 100 Volts; en cada pozo se depositó 3  $\mu$ L de muestra digerida. Para la tinción y observación de los patrones de digestión se siguieron los pasos antes descritos para visualización de muestras amplificadas.

El corrimiento de las muestras se desempeñó con buffer TAE 1X. En la cuantificación de los pares de bases de los fragmentos amplificados como digeridos se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Scientific).

## **5.4 Cinética de crecimiento**

### **5.4.1 Desarrollo del inóculo**

En un matraz Erlenmeyer de 125 mL se colocaron 25 mL de caldo YPD (20 g/L extracto de levadura, 10 g/L de peptona de caseína y 10 g/L dextrosa), en el cual se depositó una asada de colonias de cada cepa cultivada en agar YPD, los matraces se mantuvieron en un agitador orbital a velocidad moderada durante toda la noche. Al día siguiente, se llevó a cabo un conteo observando al microscopio con

una cámara de Neubauer para determinar el volumen necesario para la obtención de  $1 \times 10^6$  cel/mL. Para obtener el volumen con el número de células deseadas se utilizó la siguiente fórmula:

$$C1V1 = C2V2$$

C1= concentración inicial de células en el medio.

C2= concentración de células por mililitro deseada en el medio.

V1= volumen inicial de crecimiento.

V2= volumen en el que se puso el inóculo para tener la concentración de células por mililitro deseada.

#### **5.4.2 Curva de crecimiento**

El volumen necesario del cultivo de cada una de las cepas para inocular  $1 \times 10^6$  cel/mL fue depositado en matraces Erlenmeyer de 125 mL que contenían 25 mL de caldo YPD, se realizaron tres repeticiones por cepa. Los matraces fueron colocados en el agitador orbital con un movimiento constante. Se hicieron conteos directos en una cámara de Neubauer cada 40 minutos con el objetivo 40X de un microscopio compuesto hasta que las cepas llegaron a su fase estacionaria (López-Arboleda *et al.*, 2010).

### **5.5 Caracterización fisiológica**

#### **5.5.1 Crecimiento a diferentes presiones osmóticas**

Se prepararon medios de caldo YPD al 50% y 60% de concentración de glucosa. En ambos casos se dispensaron en tubos y se esterilizaron a  $110^\circ \text{C}$  durante 10 minutos (Yarrow, 2010).

Se inocularon con 500  $\mu\text{L}$  de cada cepa. Después de 72 horas de incubación a  $29^\circ \text{C}$  y se registró con el signo + como crecimiento positivo y signo – como crecimiento negativo (Wickerham, 1951).

#### **5.5.2 Crecimiento a diferentes temperaturas**



En tubos con caldo YPD se inocularon con 500  $\mu$ L de cada cepa y se incubaron a 4, 29, 37, 42 y 45 °C durante 72 h (Yarrow, 2010; Martorell *et al.*, 2007). Los resultados se registraron de la misma manera que en la prueba para la capacidad de crecimiento a diferentes presiones osmóticas.

### **5.5.3 Formación de ascosporas**

Las cepas a examinar se llevaron a un crecimiento activo al cultivarlas en medio de cultivo agar acetato McClary a una temperatura de 29 °C (Yarrow, 2010). Los cultivos se examinaron bajo el microscopio después de 3 días, 1 semana y luego a intervalos semanales durante 6 semanas. Se realizaron tinciones simples, donde, primeramente, se preparó la fijación de la muestra por calor, posteriormente se añadieron las soluciones verde malaquita al 0.5% y fucsina básica al 0.05%, se calentó a vapor durante 1 minuto, se lavó a fondo en agua corriente y se dejó secar. Después del procedimiento de tinción las células se examinaron en un soporte de agua. Se describió si las esporas todavía estaban dentro del asca, se registró la forma y el número de esporas, junto con una descripción del tipo o tipos de asca, es decir, si la conjugación es isogamia o heterogamia (Yarrow, 2010; Wickerham, 1951).

### **5.6 Diseño experimental y análisis estadístico**

Para evaluar la cinética de crecimiento, se aplicó un diseño categórico de un solo factor completamente aleatorizado, con tres repeticiones. Para evaluar la variación de la variable de respuesta (velocidad máxima de crecimiento), con relación a los diferentes tipos de cepas (factor) se analizaron con una prueba paramétrica *t* de student; para ello se verificaron los supuestos de la prueba (normalidad y homocedasticidad) con una prueba de Shapiro Wilk, en el programa estadístico RStudio Team (2020).

Respecto a la prueba de esporulación, se aplicó también un diseño categórico de un solo factor completamente aleatorizado, con tres repeticiones. La estimación de la relación entre la variable de respuesta (tamaño en  $\mu$ m) y el factor se efectuó con una prueba no paramétrica Mann Whitney en el caso del tamaño de

las ascas y una prueba paramétrica  $t$  de student para el tamaño de las esporas; después de confirmar los supuestos de la prueba, con ayuda de una prueba de Kolmogorov Smirnov, en el programa estadístico RStudio Team (2020).

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Identificación molecular

Se llevó a cabo el análisis RFLP de la región ITS1-5.8S-ITS4 del ADNr a partir de las dos cepas de *K. marxianus*. En el Cuadro 2 se exponen los tamaños de los fragmentos de nucleótidos (pb) obtenidos de la región amplificada por PCR-RFLP, así como la región digerida con las endonucleasas de restricción HhaI, HaeIII e HinfI visualizada en gel de agarosa al 3%. En la Figura 1 se presentan los perfiles de bandas de PCR para cada cepa. En la Figura 2 se muestra el perfil de bandas de la digestión obtenidas para *K. marxianus* cepas 11 y 19.

Cuadro 2. Longitud en pares de bases de la región ITS-5.8S amplificada por PCR y fragmentos obtenidos después de la digestión con las endonucleasas de restricción HhaI, HaeIII e HinfI, visualizadas en gel de agarosa al 3% en *K. marxianus* cepas 11 y 19.

Cepa	Especie	Longitud de fragmentos de PCR (pb)	Longitud de fragmentos de restricción (pb)		
			HhaI	HaeIII	HinfI
11	<i>K. marxianus</i>	742.8	259, 131, 101	738, 567, 478, 393, 223, 149	217, 129, 44
19	<i>K. marxianus</i>	766.5	309, 235, 81	294	420

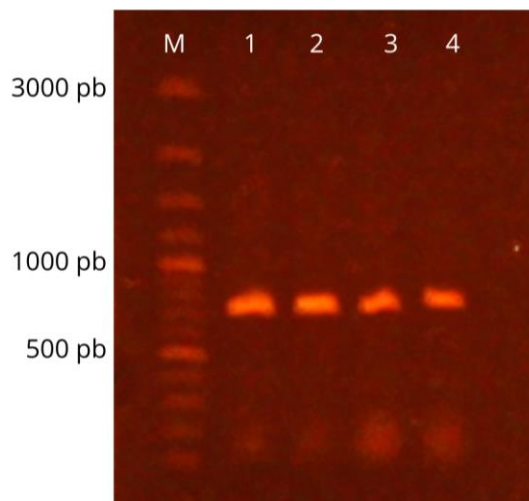


Figura 1. Patrón de bandas obtenido de *K. marxianus* cepas 11 y 19 de la amplificación por PCR-RFLP de la región ITS1-5.8S-ITS4 del ADNr. M; marcador de peso molecular de 100pb. Pozos 1 y 2; *K. marxianus* cepa 11, 3 y 4; *K. marxianus* cepa 19.

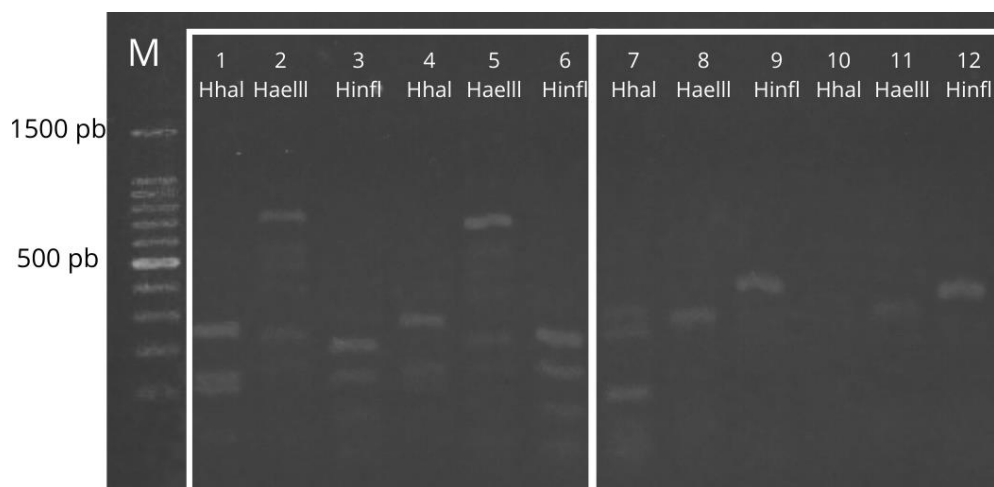
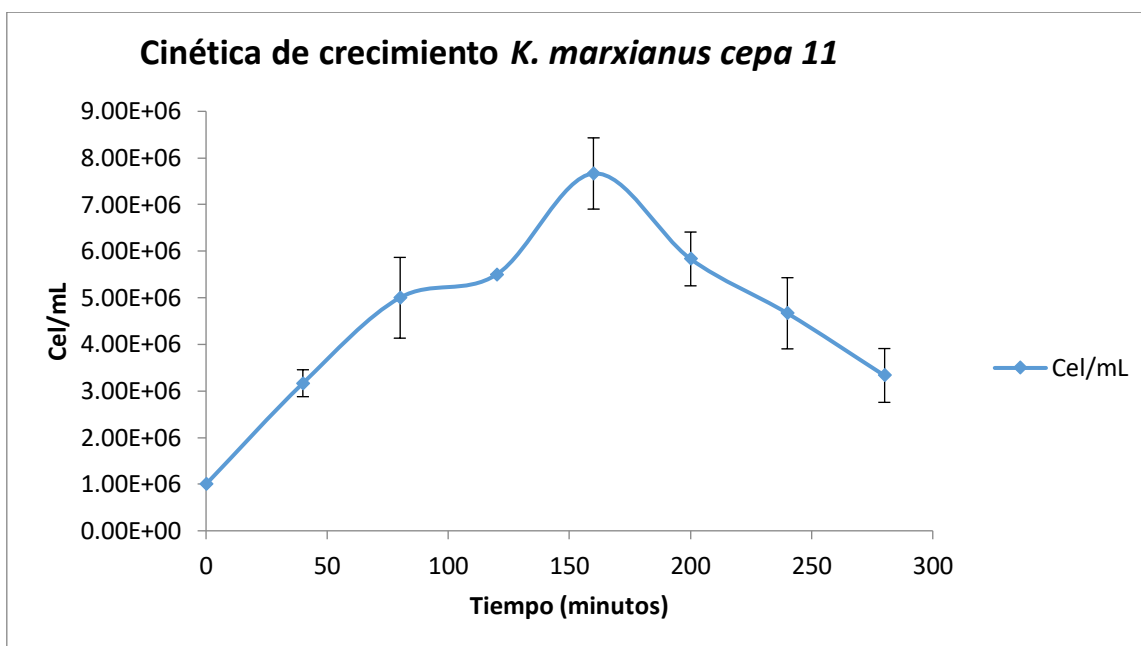


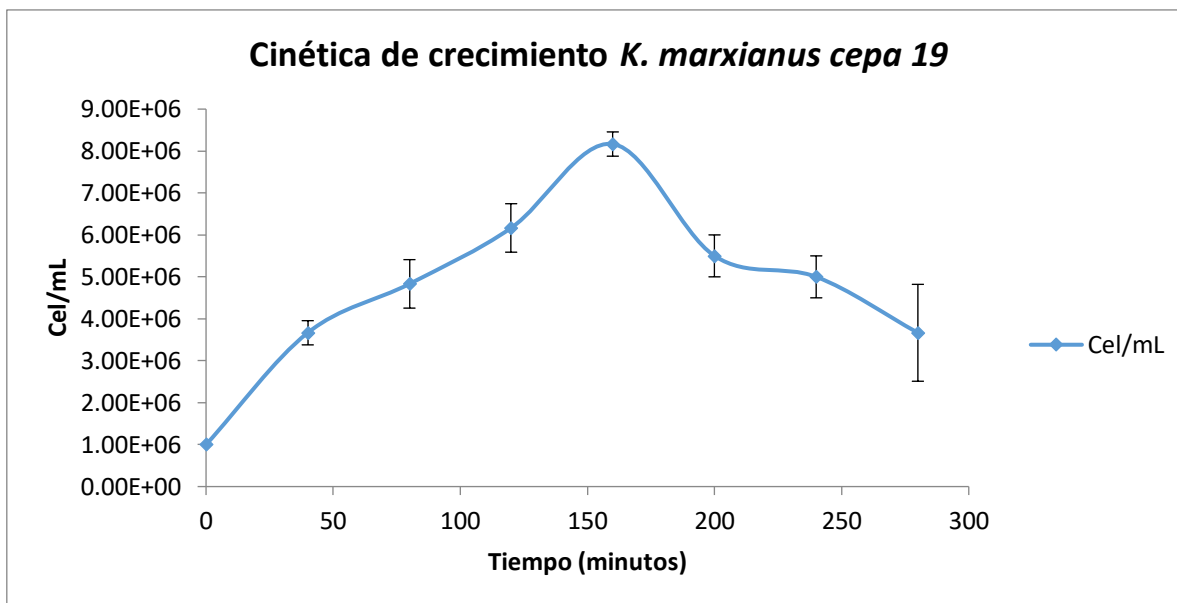
Figura 2. Patrón de bandas obtenido de *K. marxianus* cepas 11 y 19, después de la digestión de la región amplificada ITS1-5.8S-ITS4 del ADNr, con las enzimas HhaI, HaeIII e HinfI, en gel de agarosa al 3%. M; marcador de peso molecular de 100pb. Pozos 1-6; *K. marxianus* cepa 11 con duplicado. Pozos 7-12; *K. marxianus* cepa 19 con duplicado.

## 6.2 Cinética de crecimiento

De acuerdo con los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento se observó que *K. marxianus* Cepa 11 terminó la fase de adaptación y comenzó la fase exponencial aproximadamente a los 40 minutos, alcanzando el crecimiento máximo a las 2 horas con un total de  $7.67 \times 10^6$  cel/ml (Gráfica 1). Del mismo modo, *K. marxianus* Cepa 19 finalizó la fase de adaptación e inició la fase exponencial a los 40 minutos aproximadamente, llegando a su máximo crecimiento a las 2 horas consiguiendo una suma de  $8.17 \times 10^6$  cel/ml (Gráfica 2).



Gráfica 1. Cinética de crecimiento de *K. marxianus* cepa 11.



Gráfica 2. Cinética de crecimiento de *K. marxianus* cepa 19.

La velocidad máxima evaluada como parámetro cinético se detalla en el cuadro 3 describiendo el comportamiento de crecimiento de ambas cepas a lo largo del procedimiento. El valor promedio más alto de la velocidad máxima lo registró *K. marxianus* Cepa 11 con  $0.2757 \text{ cel/mL}\cdot\text{h}^{-1}$ , mientras que *K. marxianus* Cepa 19 alcanzó  $0.2652 \text{ cel/mL}\cdot\text{h}^{-1}$  de valor. De acuerdo a los análisis estadísticos se determinó que no existen diferencias significativas entre la velocidad máxima de las cepas ( $t=0.5394 \text{ p}<0.05$ ).

Cuadro 3. Parámetro cinético obtenido de las cepas 11 y 19 de *K. marxianus*.

Cepa	Especie	$\mu_{\text{max}}$ (cel/mL·h-1)
11	<i>K. marxianus</i>	0.2757
19	<i>K. marxianus</i>	0.2652

### 6.3 Caracterización fisiológica y observación de ascosporas

Las respuestas a las diferentes pruebas fisiológicas y la forma de las ascas de las cepas se encuentran condensadas en el Cuadro 4. Ambas cepas estudiadas crecieron de forma exitosa a 29 y 42 °C, *K. marxianus* cepa 11 creció a 37 °C mientras que *K. marxianus* cepa 19 presentó una respuesta negativa y ambas cepas no crecieron a 4 y 45 °C. Por otro lado, cuando se evaluó el efecto de la concentración de glucosa en el crecimiento, se pudo notar que las dos cepas tuvieron una respuesta positiva.

*K. marxianus* cepas 11 y 19 formaron mayormente ascas elipsoidales y ovaladas, y en menor cantidad ascas reniformes, lisas y cilíndricas (Figura 3, Figura 4) con un tamaño promedio de 4.4098  $\mu\text{m}$  y 4.4305  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Cuadro 4). Las ascas se conformaban de 1 a 2 ascosporas esféricas u ovaladas, donde la cepa 11 alcanzó un promedio en tamaño de 1.0935  $\mu\text{m}$  y la cepa 19 un valor de 1.1542  $\mu\text{m}$  (Cuadro 4). Conforme a los análisis estadísticos se determinó que no existen diferencias significativas entre el tamaño de ascas ( $W=355.5$   $p<0.05$ ) y el tamaño de las ascosporas de las cepas ( $t=-0.62072$   $p<0.05$ ).

Cuadro 4. Respuesta a las pruebas de crecimiento a diferentes presiones osmóticas y temperaturas y tamaño de ascas y esporas de las cepas 11 y 19 de *K. marxianus*.

Cepa	Tamaño de asca ( $\mu\text{m}$ )	Tamaño de ascosporas ( $\mu\text{m}$ )	Presión osmótica		Temperatura				
			50%	60%	4 °C	29 °C	37 °C	42 °C	45 °C
11	4.4098	1.0935	+	+	-	+	+	+	-
19	4.4305	1.1542	+	+	-	+	+	+	-

+, crecimiento, -; sin crecimiento.

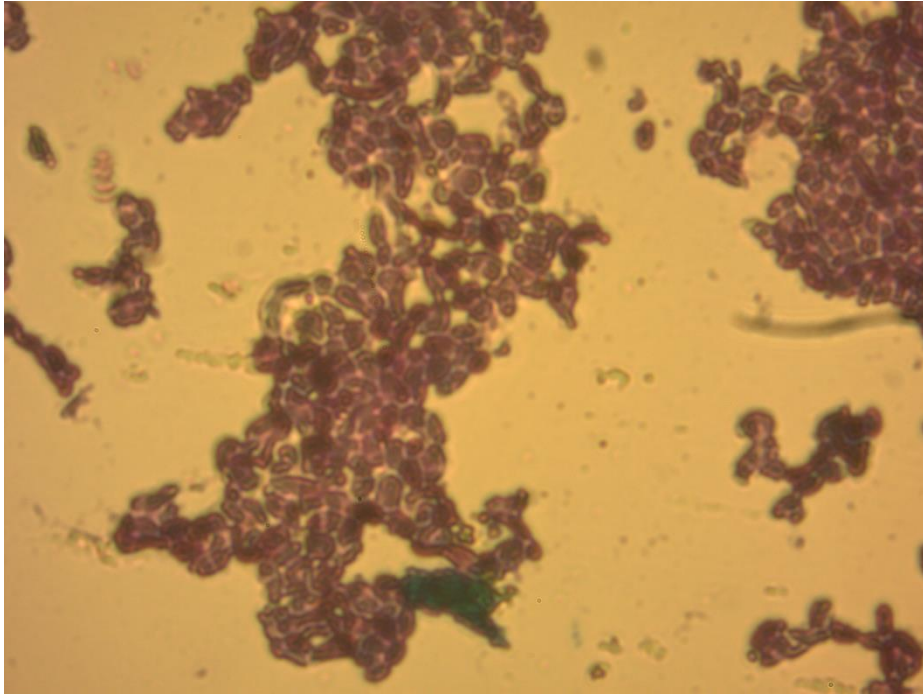


Figura 3. Ascosporas pertenecientes *K. marxianus* cepa 11 (objetivo 100x).

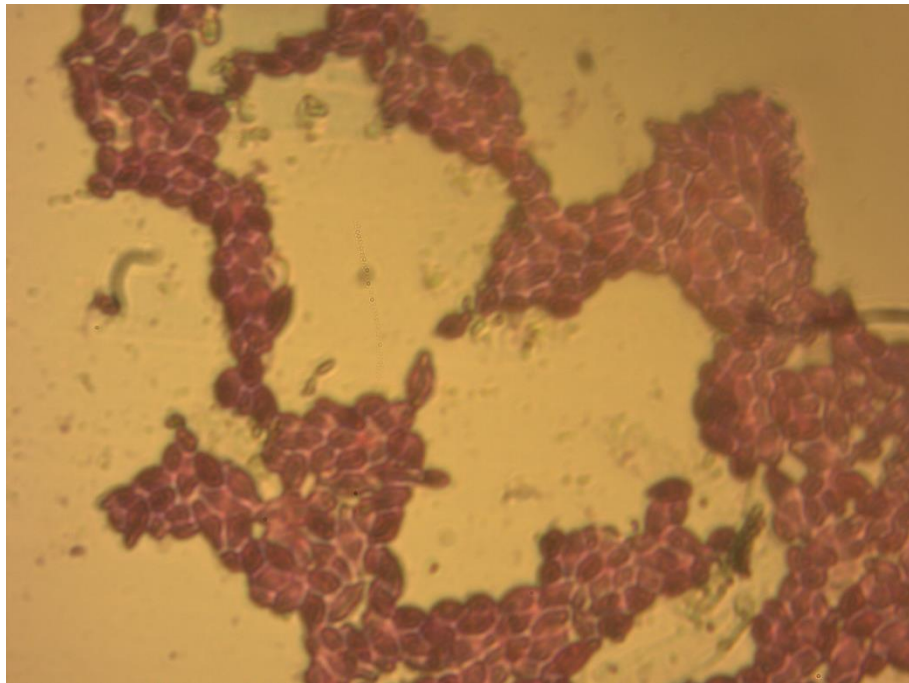


Figura 4. Ascosporas pertenecientes *K. marxianus* cepa 19 (objetivo 100x).



## VII. DISCUSIÓN

### 7.1 Identificación molecular

Las técnicas moleculares han demostrado ser una herramienta útil en los estudios de taxonomía, ya que pueden generar información de los individuos hasta el nivel de especie, existen técnicas moleculares rápidas y confiables como es el caso del análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) en la identificación de levaduras (Verdugo, 2013; Molina *et al.*, 2014).

Los productos de PCR de la región 5.8S-ITS de las cepas de *K. marxianus* 11 y 19 tuvieron un peso molecular de 742.8 y 766.5 pb respectivamente (Cuadro 2), análogo a lo reportado por Esteve-Zarzoso *et al.* (1999) quienes documentaron que *K. marxianus* tiene un peso molecular de 740 pb. Previo a este estudio, las cepas 11 y 19 fueron reconocidas como *K. marxianus* posterior a una prueba de identificación directa mediante Espectrofotometría de masas MALDI-TOF/MS realizada por Valdivieso (2019).

Respecto al tamaño de los fragmentos de restricción de las enzimas HhaI, HaeIII e HinfI adquiridos de la PCR, se observa que *K. marxianus* cepa 11 (Cuadro 2) es semejante a lo reportado por Esteve-Zarzoso *et al.* (1999) siendo para HhaI 259, 131 y 101 pb y para HinfI 217, 129 y 44 pb. El patrón de bandas de la cepa 19 fue distinto a lo descrito por Esteve-Zarzoso *et al.* (1999). Estos fragmentos polimórficos aparecen debido a que los organismos de diferentes especies, e incluso cepas, difieren en la distancia de los sitios de clivaje para cada enzima de restricción (Orberá, 2004). A pesar de que se argumenta que la región 5.8S-ITS es codificadora, conservada y muestra una baja variabilidad intraespecífica que no permite la delimitación entre cepas de una misma especie (Belloch, 1998; Orberá, 2004), otros autores arguyen haber encontrado que las enzimas de restricción de la región ITS parecen ser relativamente discriminativos, mostrando mayor heterogeneidad comparado con otros métodos, permitiendo así información intraespecífica más detallada (Baleiras *et al.*, 1996). Además, se ha destacado que *K. marxianus* muestra un rico polimorfismo genético intraespecífico y diferentes características fenotípicas incluso en cepas que tienen el mismo origen (Perpetuini

*et al.*, 2018; Tofalo *et al.*, 2014), por ello, es importante destacar y considerar que las cepas evaluadas provienen de un ambiente diferente al que la literatura ha reportado hasta ahora.

## 7.2 Cinética de crecimiento

El modelo cinético de crecimiento de levaduras es sustancialmente capaz de predecir la formación de productos, además los modelos matemáticos proporcionan una estrategia para resolver los problemas encontrados en el proceso de fermentación (Sakthiselvan *et al.*, 2019). Estos modelos son una herramienta eficaz para saber si la levadura estudiada es prospecta para aplicaciones biotecnológicas o industriales. Una de las características de *K. marxianus* es su rápida tasa de crecimiento en particular, ya que tiene una alta tasa de crecimiento específico (aproximadamente el doble que *Saccharomyces cerevisiae*) (Groeneveld *et al.*, 1994; Fonseca *et al.*, 2008; Lane y Morrissey, 2010). Los datos en las Gráficas 1 y 2 muestran el crecimiento de *K. marxianus* cepa 11 y cepa 19, e indican que la fase de latencia termina antes de los 40 minutos después de su inoculación, alcanzando su máximo crecimiento a las 2 horas, posterior a ese tiempo accedieron a la fase de declive. Diferente a lo reportado por Ariyanti y Hadiyanto (2013) quienes documentaron que la fase de latencia se produjo inmediatamente después de la inoculación y las células tardaron 2 horas en adaptarse a su nuevo entorno, tomando en cuenta que utilizaron suero de queso como medio de cultivo.

En el Cuadro 3 se puede observar que los valores para velocidad máxima fueron  $0.2757 \text{ h}^{-1}$  y  $0.2652 \text{ h}^{-1}$  en *K. marxianus* cepa 11 y cepa 19 respectivamente, los resultados que se obtuvieron se encuentran por debajo de la velocidad máxima de crecimiento consignada en la literatura, tal es el caso de Bellaver *et al.* (2004) quienes consiguieron un valor de  $0.44 \text{ h}^{-1}$  en cultivos con glucosa como única fuente de carbono, mientras que Fabre *et al.* (1995) reportaron un crecimiento máximo de  $0.5 \text{ h}^{-1}$  cultivando las levaduras en un medio semi-sintético enriquecido, por su parte, Groeneveld *et al.* (2008) registraron un valor de  $0.6 \text{ h}^{-1}$  aplicando un método de cultivo de auxostatos de pH en un medio mineral definido con todos los nutrientes (vitaminas esenciales y sales minerales con amonio como principal fuente de

nitrógeno) en exceso y con glucosa como único carbono y fuente de energía libre de Gibbs, sin embargo los autores buscaban probar que *K. marxianus* es capaz de crecer incluso más rápido de lo que ya lo hace. Finalmente, Goshima *et al.* (2013) usando medio de peptona dextrosa (YPD) alcanzaron un valor de  $0.761\text{h}^{-1}$ .

El tipo de cepa y los diferentes medios de cultivo donde se realizaron las pruebas son las causas por la que los resultados difieren (Ariyanti y Hadiyanto, 2013; Goshima *et al.*, 2013). Groeneveld *et al.* (2008) mencionan que *K. marxianus* puede crecer incluso más rápido en un medio mineral definido comparado con los datos que se obtuvieron en este estudio. Un aspecto importante sobre la fisiología de *K. marxianus* es el hecho de que se han informado parámetros de crecimiento significativamente diferentes (como  $\mu_{\text{max}}$ ) no solo para distintas cepas dentro de la especie, sino también para la misma cepa cuando se investigan en otros laboratorios. La divergencia observada no se debe a errores de medición sino a una diversidad fisiológica entre las cepas utilizadas en los estudios. Considerando que los valores citados son mucho más altos para la misma especie, es sugestivo contemplar que el hábitat de aislamiento, preservación y manipulación de la cepa juegan un papel importante en la fisiología de *K. marxianus* (Fonseca *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2008).

### **7.3 Caracterización fisiológica y observación de ascosporas**

La capacidad de adaptarse a condiciones ambientales adversas como la tolerancia a altas temperaturas y altas presiones osmóticas es un rasgo importante para las levaduras con aplicaciones biotecnológicas. Así, el aislamiento y caracterización de levaduras tolerantes a estos estresores son cruciales para el desarrollo de procesos de producción de bebidas fermentadas (Lane *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2014).

La habilidad de crecer a temperaturas elevadas es uno de los sellos distintivos de *K. marxianus* (Lane *et al.*, 2011) característica que fue evidente en este estudio, con ambas cepas capaces de crecer bien a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Cuadro 4). Sin embargo, a pesar de que Costa *et al.* (2014) reportan que *K. marxianus* tiene la habilidad de crecer en medio líquido a  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ , no fue evidente en el presente análisis pues las dos cepas mostraron una respuesta negativa al crecimiento a esta

temperatura, no obstante, los mismos autores mencionan que de acuerdo a la tasa de crecimiento que evaluaron, los valores a 30, 37 y 42 °C fueron similares pero a 45 °C decreció. La literatura ha informado que otras cepas de *K. marxianus* crecen rápidamente a temperaturas superiores a 40 °C (Fonseca, 2008; Costa *et al.*, 2014).

También, se evaluó el crecimiento a baja temperatura, Martorell *et al.* (2007) mencionan que es un factor importante en el deterioro de los alimentos refrigerados o congelados, en este caso su fermentación, de cualquier manera, no se observó crecimiento a 4 °C en las cepas examinadas.

*K. marxianus* se considera una levadura termotolerante lo cual es interesante desde un punto de vista industrial, entre las ventajas de usar levaduras termotolerantes, se pueden citar costos de enfriamiento reducidos en biorreactores, exención de unidades de refrigeración, mejores rendimientos de hidrólisis y riesgos reducidos de contaminación (Hasunuma y Kondo, 2012; Costa *et al.*, 2014; Rocha *et al.*, 2014).

Varios autores han propuesto definiciones de osmotolerancia; la mayoría se basan en la capacidad de crecer a una concentración de azúcar particular o actividad de agua ( $A_w$ ) (Jermini y Schmidt-Lorenz, 1987, Pratt *et al.*, 2003; Tofalo *et al.*, 2009; García *et al.*, 2021). Cuando la levadura se expone al mosto, se somete a una presión osmótica elevada. Las presiones osmóticas muy altas, como las que se encuentran en los mostos de alta densidad, pueden distorsionar el metabolismo de la levadura y viabilidad (Pratt *et al.*, 2003). Si bien la mayoría de las levaduras crecerán favorablemente en un 20% p/v de glucosa, solo un número limitado de especies de levaduras pueden crecer a una  $A_w$  baja causada por la presencia de altas concentraciones de azúcar (Tilbury (1980) citado por Martorell *et al.* (2007)). Sand (1973), Davenport (1975) y Tilbury (1980) citados por Martorell *et al.* (2007) propusieron que las levaduras osmotolerantes eran aquellas capaces de crecer al 50% y 60% p/p de glucosa. En este estudio, todas las cepas de *K. marxianus* mostraron osmotolerancia cuando fue probado el crecimiento a altas presiones osmóticas en los medios (Cuadro 4), acorde a lo publicado por Lane *et al.* (2011). Lara-Hidalgo *et al.* (2017) mencionan que *K. marxianus* aprovecha los nutrientes del

aguamiel de *Agave* fácilmente, además, al ser una levadura proveniente de una fermentación espontánea, ésta debe responder a diversos factores a causa de los cambios químicos que sufre el mosto durante todo el proceso (Valdivieso, 2019).

La caracterización morfológica es considerada una técnica complementaria para la identificación de levaduras que permitan tener un conocimiento más integral con respecto a los caracteres morfológicos, fisiológicos y genotípicos de las levaduras (Mendoza, 2005). Fonseca *et al.* (2008) destacan que debido a las diferencias en la morfología de las esporas y ascas de *K. marxianus* fue necesario reclasificar esta especie en un nuevo taxón. Las ascas observadas en este estudio obtuvieron un tamaño promedio de 4.4098  $\mu\text{m}$  y 4.4305  $\mu\text{m}$  para las cepas 11 y 19, por otra parte, las ascosporas mantenían formas esféricas u ovaladas con 1.0935  $\mu\text{m}$  y 1.1542  $\mu\text{m}$  de tamaño, respectivamente, en ambos casos no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño de ascas y el tamaño de las ascosporas de las cepas. Las ascas conservaban en su mayoría formas elipsoidales (Figura 3 y 4) conformadas con 1 a 2 ascosporas, conforme a Lachance (2011) las ascas de *K. marxianus* se forman de una a cuatro ascosporas y varían en forma de esféricas a elipsoidales y reniformes.

## VIII. CONCLUSIONES

- Las diferencias entre los fragmentos de restricción de las enzimas HhaI, HaeIII e HinfI pueden deberse a la diversidad intraespecífica de las cepas, pues *K. marxianus* es considerada una levadura con un rico polimorfismo genético intraespecífico.
- De acuerdo con el modelo cinético logrado, las cepas 11 y 19 mostraron un comportamiento similar. *K. marxianus* ha sido registrada como una levadura con rápida tasa de crecimiento, a pesar de que los valores obtenidos están por debajo de la documentación consultada.
- En este estudio se pudo comprobar que las cepas examinadas poseen características que son ventajosas para aplicaciones biotecnológicas refiriéndose a su crecimiento a altas temperaturas y elevadas presiones osmóticas, perteneciendo al grupo de levaduras termotolerantes y osmotolerantes.
- Las ascas de *K. marxianus* cepas 11 y 19 preservaron, en su mayoría, formas elipsoidales y ovaladas, con un tamaño promedio de 4.4098  $\mu\text{m}$  y 4.4305  $\mu\text{m}$ , respectivamente, comprendiéndose de 1 a 2 ascosporas esféricas u ovaladas, las cuales, lograron un tamaño promedio de 1.0935  $\mu\text{m}$  en la cepa 11 y 1.1542  $\mu\text{m}$  en la cepa 19, de acuerdo a los resultados se indicó que estadísticamente no hay diferencias entre el tamaño de ascas y el tamaño de las ascosporas de ambas cepas.

## IX. REFERENCIAS DOCUMENTALES

- Aguilar, N. 2010. La caña de azúcar y sus derivados en la Huasteca San Luís Potosí México. *Diálogos, Revista Electrónica de Historia*.1 (11): 81-110.
- Aguilera, P., Ruiz, M., Rocha, M. G., Pineda, B., Chánez, M. E. 2014. PCR en tiempo real. En: Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B. y Rocha, M. G. (Eds.). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. SEMARNAT-INECC. México, D.F. pp. 175-201.
- Ahearn, D. G., Roth, F. J., Fell, J. W. y Meyers, S. P. 1959. Use of shaken cultures in the assimilation test for yeast identification. *National Science Foundation*. 79 (3): 369- 371.
- Alcazar-Valle, M., Gschaedler, A., Gutierrez-Pulido, H., Arana-Sánchez, A. y Arellano-Plaza, M. 2019. Fermentative capabilities of native yeast strains grown on juices from different Agave species used for tequila and mezcal production. *Brazilian Journal of Microbiology*. 50 (2): 379-388.
- Allahyari, N. 2020. Molecular identification of wild non-*saccharomyces* yeasts from wine by pcr-rflp and strain differentiation by RAPD. Tesis de Maestría. The Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University. Ankara, Turquía.
- Andrighetto, C., Psomas, E., Tzanetakis, N., Suzzi, G. y Lombardi, A. 2000. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Letters in Applied Microbiology*. 30: 5–9.
- Angarita-Marchán, M., Torres-Caicedo, M. I. y Díaz-Torres, A. K. 2017. Técnicas de biología molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 16 (5): 796-807.
- Arana-Sánchez, A., Segura-García, L. E., Kirchmayr, M., Orozco-Ávila, I., Lugo-Cervantes, E. y Gschaedler-Mathis, A. 2015. Identification of predominant

- yeasts associated with artisan Mexican cocoa fermentations using culture-dependent and culture-independent approaches. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 31: 359-369.
- Ariyanti, D., Hadiyanto, H. 2013. Production from Whey by *Kluyveromyces marxianus* in batch fermentation system: kinetics parameters estimation. *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*. 7(3): 179 – 184.
- Armida-Alcudia, L., Ruiz-Rosado, O., Salgado-García, S. Gallardo, F., Nava-Tablada, M. E. y Juárez-López, J. F. 2011. Socioeconomic and technological factors in sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) agroecosystems production in Chontalpa, Tabasco. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 13: 261 – 269.
- Atkinson, B. 1985. Reactores bioquímicos. Editorial Reverté. España. pp. 83-84.
- Aziz, S., Memon, H. R., Shah, F. A., Rajoka, M. I. y Soomro, A. 2012. Ethanol production from molasses using an indigenous strain of thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* under controlled conditions. En: Uqaili, M. A. y Harijan, K. (Eds.). Energy, environment and sustainable development. Springer-Verlag/Wien. Nueva York, E.U.A. pp. 147.
- Baleiras, M. M., Eijmsa, B., Hofstra, H., Huisin't Veld, J. H. J., Van der Vossen, J. M. 1996. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(1): 41–46.
- Bellaver, L. H. Barbosa, N. M., Abrahao-Neto, J., Gombert, A. K. 2004. Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. *FEMS Yeast Research*. 4: 691–698.
- Belloch, C., Barrio, E., García, M. D., Querol, A. 1998. Inter- and Intraspecific Chromosome Pattern Variation in the Yeast Genus *Kluyveromyces*. *Yeast*. 14: 1341–1354.



- Berg, J. M., Stryer, L. y Tymoczko, J. L. 2007. Bioquímica. 6ª edición. Editorial Reverté. Barcelona, España. pp. 433.
- Boundy-Mills, K. 2006. Methods for investigating yeast biodiversity. En: Rosa, C. y Péter, G. (Eds.). Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Springer-Verlag. Alemania. pp. 67-100.
- Brechtbuehl, K., Whalley, S. A., Dusheiko, G. M. y Saunders, N. A. 2001. A rapid real-time quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus. *Journal of Virological Methods*. 93: 105-113.
- Campbell, N. y Reece, J. 2007. Biología. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. pp. 175-176.
- Chojnacka, K. 2010. Fermentation products. En: Pohorecki, R., Bridgwater, J., Molzahn, M., Gani, R. y Gallegos, C. (Eds.). Chemical engineering and chemical process technology - Volume V: Chemical engineering education and main products. EOLSS Publications. United Kingdom. pp. 189-218.
- Costa, D. A., de Souza, C. J. A., Costa, P. S. Rodríguez, M., dos Santos, A. F., Lopes, M. R., Gernier, H. L., Silveira, W. B., Fietto, L. G. 2014. Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98: 3829–3840.
- Davenport, R. R. 1975. The distribution of yeasts and yeast-like organisms in an English vineyard. Tesis de doctorado. University of Bristol. Reino Unido.
- Deak, T. y Bauchat, L. R. 1996. Handbook of food spoilage yeasts. CRC Press. E. U. A. pp. 2.
- Dekker, W. J. C., Ortiz-Merino, R. A., Kaljouww, A., Battjes, J., Wiering, F. W., Mooiman, C., de la Torre, P. y Pronk, J. T. 2021. Engineering the thermotolerant industrial yeast *Kluyveromyces marxianus* for anaerobic growth. *Metabolic Engineering*. 67: 347–364.

- Endoh, R., Horiyama, M. y Ohkuma, M. 2021. D-Fructose assimilation and fermentation by yeasts belonging to Saccharomycetes: rediscovery of universal phenotypes and elucidation of fructophilic behaviors in *Ambrosiozyma platypodis* and *Cyberlindnera americana*. *Microorganisms*. 9(4): 758.
- Escalante-Minekata, P., Blaschek, H. P., Barba, A. P., Santos, L. y De León-Rodríguez, A. 2008. Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of *Agave salmiana*. *Letters in Applied Microbiology*. 46: 626-630.
- Espinosa, P. H., Arredondo, C., Cano, M. A., Canseco, A. M. y Vázquez, F. 2002. La materia prima para producir el mezcal oaxaqueño. Catálogo de la diversidad de agaves. Folleto técnico No. 2. INIFAP-SAGARPA, Oaxaca, México.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. y Querol, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49: 329–337.
- Fabre, C. E., Duviau, V. J., Blanc, P. J., Goma, G. 1995. Identification of volatile flavour compounds obtained in culture of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology letters*. 17(2): 1207-1212.
- Fernández-Suárez, M. R. y Le Borgne, S. 2014. DGGE: electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante. En: Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B. y Rocha, M. G. (Eds.). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. SEMARNAT-INECC. México, D.F. pp. 149-174.
- Fonseca, G. G., Gombert, A. K., Heinzle, E., Wittmann, C. 2007. Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. *FEMS Yeast Res*. 7: 422–435.

- Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C. y Gombert, A. K. 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 79: 339-354.
- García Mendoza, A.J. y Franco Martínez I.S. 2018. Actualización de la información de las especies y subespecies de magueyes de Oaxaca, con énfasis en las especies mezcaleras. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. NE012. Ciudad de México.
- García, M., Crespo, J., Cabellos, J. M. y Arroyo, T. 2021. Growth of non-*Saccharomyces* native strains under different fermentative stress conditions. *Fermentation*. 7: 124.
- Gentry, H. S. 2004. Agaves of Continental North America. The University of Arizona Press. Tucson, Arizona.
- Godoy, A., Herrera, T. y Ulloa, M. 2003. Más allá del pulque y el tepache: las bebidas alcohólicas no destiladas indígenas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México, D.F. pp. 11-14.
- Goshima, T., Tsuji, M., Inoue, H., Yano, S., Hoshino, T., Matsushika, A. 2013. Bioethanol production from lignocellulosic biomass by a novel *Kluyveromyces marxianus* strain. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 77 (7): 1505–1510.
- Granek, J. A., y Magwene, P. M. 2010. Environmental and genetic determinants of colony morphology in yeast. *PLoS Genetics*. 1 (6): 1-12.
- Groeneveld, P., Stouthamer, A. H. y Westerhoff, H. V. 2008. Super life – how and why ‘cell selection’ leads to the fastest-growing eukaryote. *The FEBS Journal*. 276: 254–270.
- Groeneveld, P., Stouthamer, A.H., Van Verseveld, H.W. 1994. Energy metabolism and growth kinetics of *Kluyveromyces marxianus* in oxygen-dependent pH-

- auxostat culture. En: Gnaiger, E., Gellerich, F.N., Wyss, M. (Eds.). What Is Controlling Life?. Innsbruck University Press, Innsbruck, Austria. pp. 254–256.
- Guadalupe-Daqui, M., Chen, M., Thompson-Witrick, K. A., MacIntosh, A. J. Yeast morphology assessment through automated image analysis during fermentation. *Fermentation*. 7(2): 44-60.
- Guilliermond, A. 2003. Yeasts: culture, identification, and microbiology. Watchmaker Publishing. Boston, E. U. A. pp. 5-8, 166.
- Hasunuma, T., Kondo, A. 2012. Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains. *Process Biochemistry*. 47: 1287–1294.
- Heck, L., Barbosa, N. M., Abrahao-Neto, J. y Karoly, A. 2004. Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research*. 4: 691–698.
- Hernández, A., Alfaro, I. y Arrieta, R. 2003. Microbiología industrial. Editorial Universidad Estatal a Distancia. pp. 38-39.
- Hierro, N. H., Esteve-Zarzoso, B., González, A., Mas, A. y Guillamón, J. M. 2006. Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Applied and Environmental Microbiology*. 11 (72): 7148-7155.
- Homayouni-Rad, A., Azizi, A., Oroojzadeh, P. y Pourjafar, H. 2020. *Kluyveromyces marxianus* as a Probiotic Yeast: A Mini-review. *Current Nutrition & Food Science*. 16: 1163-1169.
- Ingraham, J. L. e Ingraham, C. A. 1998. Introducción a la Microbiología II. Editorial Reverté. Barcelona, España. pp. 735.

- Jermini, M., Schmidt-Lorenz, W. 1987. Growth of osmotolerant yeasts at different water activity values. *Journal of Food Protection*. 50(5): 404-410.
- Johnson, E. A. 2012. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts—the ascomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97: 503–517.
- Johnson, E. A. 2013. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts—the basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97 (17): 7563-7577.
- Karim, A., Gerliani, N. y Aïder, M. 2020. *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. *International Journal of Food Microbiology*. 333: 1-24.
- Kurtzman, C. P. y Robnett, C. J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73: 331–371.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W. y Boekhout, T. 2011a. Definition, classification and nomenclature of the Yeasts. En: Kurtzman, C. P., Fell, J. W. y Boekhout, T. (Eds.). *The Yeast. A Taxonomic Study*. 5ª edición. Elsevier. San Diego, E.U.A. pp. 3-8.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W. y Robert, V. 2011b. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. En: Kurtzman, C. P., Fell, J. W. y Boekhout, T. (Eds.). *The Yeast. A Taxonomic Study*. 5ª edición. Elsevier. San Diego, E.U.A. pp. 77-110.
- Lachance, M. A. 2011. *Kluyveromyces* van der Walt (1971). En: Kurtzman, C. P., Fell, J. W. y Boekhout, T. (Eds.). *The Yeast. A Taxonomic Study*. 5ª edición. Elsevier. San Diego, E.U.A. pp. 227-247.
- Lane, M. M. y Morrissey, J. P. 2010. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal biology reviews*. 24: 17–26.

- Lane, M. M., Burke, N., Karreman, R., Olfe, K. H., O'Byrne, C. P. y Morrissey, J. P. 2011. Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 100: 507–519.
- Lara-Hidalgo, C., Grajales-Lagunes, A., Ruiz-Cabrera, M. A., Ventura-Canseco, C.; Gutiérrez-Miceli, F. A., Ruiz-Valdiviezo, V. M. y Abud-Archila, M. 2017. *Agave americana* honey fermentation by *Kluyveromyces marxianus* strain for “Comiteco” production, a spirit from Mexican southeast. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 3 (16): 771-779.
- López-Alvarez, A., Díaz-Pérez, A. L., Sosa-Aguirre, C., Macías-Rodríguez, L. y Campos-García, J. 2012. Ethanol yield and volatile compound content in fermentation of agave must by *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 comparing with *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast used in tequila production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 5 (113): 614–618.
- López-Arboleda, A., Ramírez-Castrillón, M., Mambuscay-Mena, L. A. y Osorio-Cadavid, E. 2010. Diversidad de levaduras asociadas a chichas tradicionales de Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2 (12): 176–186.
- López, C. L., Beaufort, S., Brandam, C. y Taillandier, P. 2014. Interactions between *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in tequila must type médium fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 30 (8): 2223-2229.
- Loureiro, V. 2000. Spoilage yeasts in foods and beverages: characterisation and ecology for improved diagnosis and control. *Food Research International*. 33: 247-256.
- Martorell, P., Stratford, M., Steels, H., Fernández-Espinar, M. T. y Querol, A. 2007. Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *International Journal of Food Microbiology*. 114: 234–242.

- Medeiros, A. B., Pandey, A., Freitas, R. J., Christen, P. y Soccol, C. R. 2000. Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*. 6: 33–39.
- Meledina, T. V., Ivanova, V. A., Golovinskaiam, O. V. y Harba, R. 2021. Yeast. Morphology and physiology: Study guide. ITMO University. St. Petersburgo, Rusia.
- Mendoza, M. 2005. Importancia de la identificación de levaduras. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 25(1): 103-117.
- Missouri Botanical Garden Plant Finder. 2020a. *Agave americana*. <https://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?taxonid=275719>. Consultado el 10 de diciembre de 2021.
- Missouri Botanical Garden Plant Finder. 2020b. *Saccharum officinarum*. <https://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?taxonid=285293>. Consultado el 10 de diciembre de 2021.
- Molina, M. E., Orantes, C., Sánchez, M. S., Verdugo, A. G. 2014. Validación del método PCR-RFLP para la identificación de *Saccharomyces cerevisiae* (Fungi: Saccharomycetaceae). *LACANDONIA*. 8 (1): 7-12.
- Moreno-Terrazas, R., Escalante, A., Verdugo-Valdez, A., De la Rosa, M., Ortiz, R., Orantes-García, C., Palafox-González, L., Castro, A., Lappe-Oliveras, P. 2017. Bebidas refrescantes y alcohólicas de agave. En: Gschaedler, A. (Coord.). Panorama del aprovechamiento de los agaves en México. CONACyT-CIATEJ-AGARED. México, D. F. pp. 123-163.
- Morrisey, J. P., Etschmann, M. M., Schrader, J. y Billerbeck, G. M. 2014. Cell factory applications of the yeast *Kluyveromyces marxianus* for the biotechnological production of natural flavour and fragrance molecules. *Yeast*. 32: 3-16.

- Orberá, T. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*. 21: 15-19.
- Padilla, B., Gil, J. V. y Manzanares, P. 2016. Past and future of non-saccharomyces yeasts: from spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Frontiers in Microbiology*. 7: 1-20.
- Pengsong, L., Xianwei, T., Xiaofen, F., Yan, D. y Shizhong, L. 2021. Metabolomic analysis reveals *Kluyveromyces marxianus*'s stress responses during high-temperature ethanol fermentation. *Process Biochemistry*. 102: 386–392.
- Pérez-Brito, D., Tapia-Tussell, R., Quijano-Ramayo, A., Larqué-Saavedra, A., Lappe, P. 2007. Molecular characterization of *Kluyveromyces marxianus* strains isolated from *Agave fourcroydes* (Lem.) in Yucatan, Mexico. *Molecular Biotechnology*. 37: 181–186.
- Perpetuini, G., Tittarelli, F., Mattarelli, P., Modesto, M., Cilli, E., Suzzi, G., Tofalo, R. 2018. Intraspecies polymorphisms of *Kluyveromyces marxianus* strains from Yaghnob valley. *FEMS Microbiology Letters*. 365(6).
- Pham, T., Wimalasena, T., Box, W. G., Koivuranta, K., Storgårds, E., Smart, K. A. y Gibson, B. R. 2011. Evaluation of ITS pcr and RFLP for differentiation and identification of brewing yeast and brewery 'wild' yeast contaminants. *Journal of the Institute of Brewing*. 117(4): 556–568.
- Pierce, B. A. 2009. Genética: un enfoque conceptual. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. pp. 524.
- Pratt, P. L., Bryce, J. H., Stewart, G. G. 2003. The effects of osmotic pressure and ethanol on yeast viability and morphology. *Journal of the Intitute of Brewing*. 109 (3): 218-228.
- Ramos C. L. y Magalhães-Guedes K. T. 2021. Detection and quantification of yeast species in food samples for quality control. En: Magnani, M. (Ed.). Detection



and enumeration of bacteria, yeast, viruses, and protozoan in foods and freshwater. *Methods and Protocols in Food Science*. New York, E.U.A.

Reynoso-Santos, R., García-Mendoza, J., López-Báez, W., López-Luna, A. 2012. Identificación taxonómica de las especies de agave utilizadas para la elaboración del licor Comiteco en Chiapas. *AGRO PRODUCTIVIDAD*. 5 (4): 9-17.

Rocha, S. N., Abrahao-Neto, J., Gombert, A. K. 2011. Physiological diversity within the *kluyveromyces marxianus* species. *Antonie van Leeuwenhoek*. 100: 619–630.

Romano, P., Capece, A. y Jespersen, L. 2006. Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeasts. En: Querol, A. y Fleet, G. (Eds.). *Yeasts in Food and Beverages*. Springer Science & Business Media. Alemania. pp. 13-54.

Saini, P., Bnial, A. y Vij, S. 2017. Physiological response of *Kluyveromyces marxianus* during oxidative and osmotic stress. *Process Biochemistry*. 56: 21-29.

Sakthiselvan, P., Sudharsan-Meenambiga, S. y Madhumathi, R. 2019. Kinetic studies on cell growth. En: Vikas, B. (Ed.). *Cell growth*. IntechOpen. Chennai, India. pp. 1-9.

Sand, F. E. M. J. 1973. Recent investigations on the microbiology of fruit juice concentrates. En: Scientific–Technical Commission XIII (Ed.). *Technology of fruit juice concentrates, chemical composition of fruit juices*. International Federation of Fruit Juice Producers. Vienna. pp. 185–216.

Santiago-Urbina, J. A., Arias-García, J. A. y Ruiz-Terán, F. 2014. Yeast species associated with spontaneous fermentation of taberna, a traditional palm wine from the southeast of Mexico. *Annals of Microbiology*. 65: 287–296.

- Satyanarayana, T. y Kunze, G. 2017. Yeast diversity in human welfare. Springer. Singapur. pp. V.
- Suárez-Valles, B., Pando-Bedriñana, R., Fernández-Tascón, N., Querol-Simón, A. y Rodríguez-Madrera, R. 2007. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiology*. 24: 25-31.
- Tawas, M. 2019. Comportamiento cinético de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E. C. Hansen, aisladas de la bebida tradicional “Chicha de Chilacayote” (*Cucurbita ficifolia* Bouché). Tesis de Licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Chiapas, México.
- Tilbury, R. H. 1980. Xerotolerant yeasts at high sugar concentrations. En: Gould, G. W., Corry, J. E. L. (Eds.). *Microbial Growth and Survival in Extremes of Environment*. Society for Applied Bacteriology Technical Series. Vol. 15. Academic Press. London. pp. 103–128.
- Tofalo, R. Chavez-López, C., Di Fabio, F. Schirone, M., Feliz, G. E. Torriani, S., Paparella, A. y Suzzi, G. 2009. Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. *International Journal of Food Microbiology*. 130: 179–187.
- Tofalo, R., Fasoli, G., Schirone, M., Perpetuini, G., Pepe, A., Corsetti, A., Suzzi, G. 2014. The predominance, biodiversity and biotechnological properties of *Kluyveromyces marxianus* in the production of Pecorino di Farindola cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 187:41-49.
- Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. 2007. *Introducción a la Microbiología*. 9ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp. 346.
- Tropicos. 2020a. Agave americana L. <http://legacy.tropicos.org/Name/1200371>. Consultado el 15 de enero de 2020.

- Tropicos. 2020b. *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck. <http://legacy.tropicos.org/Name/1201998>. Consultado el 15 de enero de 2020.
- Tropicos. 2020c. *Saccharum officinarum* L. <http://legacy.tropicos.org/Name/25512479>. Consultado el 17 de enero de 2020.
- Uribe, L. A. 2007. Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Valdivieso, D. G. 2019. Dinámica de comunidades de levaduras asociadas al microambiente de producción de comiteco. Tesis de maestría. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Chiapas, México.
- Valenzuela, Z. A. G. 1995. La agroindustria del agave tequilero *Agave tequilana* Weber. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 55: 15-25.
- Varela, C. 2016. The impact of non-Saccharomyces yeasts in the production of alcoholic beverages. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100 (23): 9861-9874.
- Vçasquez, J. A., Castrillón, M. C. y Monsalve, Z. I. 2016. Actualización en caracterización molecular de levaduras de interés industrial. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 18(2): 129-139.
- Verdugo, A. G. 2013. Caracterización de las levaduras asociadas al proceso fermentativo del mezcal. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de México. México, D.F.
- Verdugo, A., Segura-García, L., Kirchmayr, M., Ramírez-Rodríguez, P., González-Esquinca, A., Coria, R. y Gschadler-Mathis, A. 2011. Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from *Agave salmiana*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 100: 497-506.

- Walker, G. M. 1998. Yeast physiology and biotechnology. John Wiley & Sons. Inglaterra. pp. 3, 148.
- Walker, G. M. 2009. Yeasts. En: Schaechter, M. (Eds.). Desk Encyclopedia of Microbiology. 2ª edición. Elsevier. San Diego, E.U.A. pp. 1174-1188.
- Wardrop, F. R., Liti, G., Cardinali, G. y Walker, G. M. 2004. Physiological responses of crabtree positive and crabtree negative yeasts to glucose upshifts in a chemostat. *Annals of Microbiology*. 54 (1): 103-114.
- Wickerham, L. J. 1951. Taxonomy of yeasts. Technical Bulletin of the U. S. Department of Agriculture. 1029: 1-55.
- Yarrow, D. 2010. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. En: Kurtzman, C. P. y J. W. Fell (Eds.). The Yeast. A Taxonomic Study. 4ª edición. Elsevier. San Diego, E.U.A.
- Yousef, A. y Carlstrom, C. 2003. Food Microbiology: A Laboratory Manual. John Wiley & Sons. E.U.A. pp. 42.
- Zamora, F. 2009. Biochemistry of alcoholic fermentation. En: Moreno-Arribas, M. y Polo, M. (Eds.). Wine Chemistry and Biochemistry. Springer Science Business. New York, EUA. pp. 3-26.
- Zapata, J. E., Hoyos, M., Quinchía, L. A. 2005. Parámetros cinéticos de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de un campo magnético variable de baja intensidad y alta frecuencia. *Vitae Revista de la Facultad de química farmacéutica*. 1(12): 39-44.