

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
PUEBLA.



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS.

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA.

Aislamiento de levaduras osmotolerantes a partir de miel de  
abeja de diferentes fuentes florales para su utilización en  
diversos procesos de fermentación.

Tesis para obtener el título de  
Licenciado en Químico Farmacobiólogo

Presenta:  
Victor Pardiñas Rios.

Director:  
Q.F.B. Ivan Francisco Hernández Cano.

Asesor:  
M.S.P. Claudy Lorena Villagrán Padilla.

Noviembre 2016.



**BUAP**

Puebla, Pue. a 11 de Febrero de 2016

**C. PARDIÑAS RIOS VICTOR  
PRESENTE**

Toda vez que se cuenta con la aprobación del Coordinador del Área de Microbiología,

QFB. IVAN FRANCISCO HERNANDEZ CANO, Director de Tesis,

MSP. CLAUDY LORENA VILLAGRAN PADILLA, Asesor,

se le comunica la autorización de su anteproyecto de tesis denominado:

**AISLAMIENTO DE LEVADURAS OSMOTOLERANTES A PARTIR DE MIEL DE  
ABEJA DE DIFERENTES FUENTES FLORALES PARA SU UTILIZACION EN  
DIVERSOS PROCESOS DE FERMENTACION**

Y con esta fecha se registra en los archivos de la Dirección de esta Facultad,  
para los fines legales a los que haya lugar

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

**M.C. JOSE DE GPE. QUIROZ OROPEZA  
DIRECTOR**





**BUAP**

Puebla, Pue. a 5 de Abril de 2016

**MSP. MARIA DE LA CRUZ MENESES SANCHEZ**

**MC. PATRICIA GPE. SUAREZ ALBORES**

**M.E.C. ANA BERTHA ESCOBEDO LOPEZ**

Con toda atención comunico a Uds. que se les propone como integrantes de la Comisión Revisora de Tesis que presenta el (la) Pasante de la Carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO

**PARDIÑAS RIOS VICTOR**

cuyo título es :

**AISLAMIENTO DE LEVADURAS OSMOTOLERANTES A PARTIR DE MIEL DE ABEJA DE DIFERENTES FUENTES FLORALES PARA SU UTILIZACION EN DIVERSOS PROCESOS DE FERMENTACION**

Realizada en el Area de Microbiología;

asimismo, les ruego que a la brevedad posible emitan el dictamen correspondiente.

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

**M.C. JOSE DE GPE. QUIROZ OROPEZA**

**DIRECTOR**



C.c.p. Archivo

Facultad  
de Ciencias  
Químicas

Av. San Claudio y 18 Sur,  
Edificio 105-H, Col. San Manuel,  
Ciudad Universitaria,  
Puebla, Pue. C.P. 72540

01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06



**MTRO. OMAR GERARDO AGUIRRE IBARRA**  
**DIRECCION DE ADMINISTRACION ESCOLAR**  
**PRESENTE**

En relacion al oficio de fecha 27 de Octubre de 2016, signado por el Coordinador del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas, me permito comunicar a Ud. el nombre de los Catedráticos que integran el Jurado de Examen Profesional de la Carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO que sustentará:

**PARDIÑAS RIOS VICTOR**

**JURADO**

MSP. MARIA DE LA CRUZ MENESES SANCHEZ  
MC. PATRICIA GPE. SUAREZ ALBORES  
M.E.C. ANA BERTHA ESCOBEDO LOPEZ

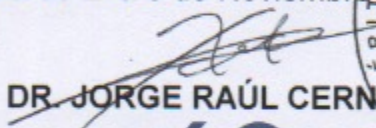
Examen que se realizará el día 18 de Noviembre de 2016, a las 12:00 horas en  
EL SALON DE USOS MULTIPLES

Esperando una respuesta favorable al presente, le reitero mi atenta y distinguida consideracion

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

H. Puebla de Z. a 3 de Noviembre de dos mil dieciseis

  
**DR. JORGE RAÚL CERNÁ CORTEZ**

**DIRECTOR**

**100**  
**AÑOS DE**  
**AUTONOMÍA**  
**UNIVERSITARIA**



C.c.p. Archivo

## **AGRADECIMIENTOS**

*Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa (Mahatma Gandhi)*

A mis padres por haberme brindado la oportunidad de estudiar la carrera en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por su enorme esfuerzo, dedicación y entera confianza.

A mis Directores de Tesis, personas que gentilmente asumieron las responsabilidades de mi acción.

Y por último a mis amigos, compañeros y a todas aquellas personas que directa o indirectamente contribuyeron al logro de una de mis metas.

## Índice.

1. Resumen.	3
2. Introducción.	4
3. Marco teórico.	
3.1. Presión Osmótica.	5
3.1.1. Osmotolerancia en Levaduras.	5
3.2. Levaduras.	6
3.2.1. Generalidades.	6
3.2.2. Estructura.	6
3.2.3. Metabolismo.	7
3.3. Fermentación.	7
3.3.1. Tipos de fermentación.	8
3.3.2. Uso en la industria.	9
3.4. Miel de abeja.	9
3.4.1. Tipos de miel.	10
3.4.2. Composición de la miel.	10
3.4.3. Microorganismos nativos de la miel.	11
4. Marco de referencia.	12
5. Planteamiento del problema.	14
6. Justificación.	15
7. Objetivos.	16
7.1. Objetivo general.	
7.2. Objetivos particulares.	
8. Diseño de la investigación.	17
9. Materiales y metodología.	18
9.1. Muestra.	18
9.2. Procesamiento de la muestra.	18
9.3. Aislamiento de levaduras.	18
9.4. Prueba de osmotolerancia.	18
9.5. Prueba de capacidad metabólica.	19

9.6. Cuantificación de la capacidad metabólica.	19
9.7. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).	19
9.8. Identificación.	20
9.9. Diagrama general de trabajo.	21
10. Resultados y discusión.	22
10.1. Muestras y aislamiento de levaduras nativas de la miel.	22
10.2. Prueba de osmotolerancia.	24
10.3. Prueba de capacidad metabólica.	25
10.4. Cuantificación de la capacidad metabólica por HPLC.	26
10.5. Identificación por CHROMagar.	28
11. Conclusiones.	31
12. Bibliografía.	32
13. ANEXOS.	34
Anexo I. Aislamiento de microorganismos de miel.	34
Anexo II. Crecimiento en medio para osmotolerancia.	34
Anexo III. Medio YFM al 10% de azúcares.	35
Anexo IV. Prueba de actividad metabólica.	35
Anexo V. Prueba de actividad metabólica en YNB.	35
Anexo VI. Coloración en CHROMagar Candida.	36
Anexo VII. Cromatograma de azúcares en HPLC.	36
Anexo VIII. Tabla de colores en CHROMagar Candida reportados.	37

## 1. Resumen.

La fermentación es un proceso biológico, en el cual se lleva a cabo la transformación de determinados azúcares como glucosa, fructosa, etc., dando como resultado un alcohol a modo de etanol y CO<sub>2</sub>, brindando de esta manera determinada capacidad metabólica al microorganismo dependiendo también del carbohidrato que transforme. Algunas levaduras presentan actividad osmotolerante provenientes de medios hipertónicos y poseen cierta actividad característica frente a algunos carbohidratos, lo que permite su uso dentro de procesos de transformación de residuos ricos en azúcares y elevadas concentraciones de sustratos. Por lo tanto, en el presente trabajo se realizó el aislamiento de 29 cepas de levaduras provenientes de distintos tipos de miel de abeja, a los cuales se les realizó la determinación de su actividad osmotolerante usando el medio YMA a 40% y 60% de azúcares, dando como resultado la selección de 20 de ellas. A las seleccionadas se determinó cualitativamente la actividad metabólica utilizando el medio YFM al 10% de azúcares en donde dicha capacidad se observó a través de la producción de gas y cambio en el color del medio. Se cuantificó el consumo de los carbohidratos a través de cromatografía líquida (HPLC) y se seleccionaron 7 cepas con la mejor actividad metabólica. Para su identificación se sembró por estría cruzada en CHROMagar Candida. Se reportó la presencia de 4 cepas del género *Saccharomyces*, 2 del género *Candida*, y 1 del género *Kluyveromyces*.

## **2. Introducción.**

El término fermentación se utiliza tradicionalmente en microbiología industrial para describir los procesos de transformación empleando microorganismos con propósitos industriales. La fermentación etílica, también conocida como fermentación alcohólica, o del etanol, es un proceso de tipo biológico, en el cual se lleva a cabo una fermentación en ausencia de oxígeno. Esta se debe a la capacidad metabólica de ciertos microorganismos, los cuales se encargan de transformar azúcares, como la glucosa, la fructosa, etc., dando como resultado un alcohol a modo de etanol, CO<sub>2</sub> y ATP, moléculas que son utilizadas por los propios microorganismos para la generación de energía.

La mayor parte de las levaduras aisladas comúnmente crecen mejor en medios que disponen de gran cantidad de agua. Algunas levaduras son osmotolerantes y soportan una actividad de agua del orden de 0.65, valor al que ningún otro microorganismo puede desarrollarse.

La miel es aquella sustancia dulce natural producida por las abejas a partir del néctar de las flores o de secreciones de otras partes vivas de la planta, que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias. La composición, el aspecto, el sabor, el color, entre otras características, varían mucho dependiendo de las flores que provienen, de su origen, de la región y de su madurez. Debido a su alto contenido en azúcares, la miel es un producto que posee una flora nativa compuesta por levaduras, hongos y algunas bacterias, las cuales poseen una alta tolerancia a presiones osmóticas elevadas y que en cierto modo, su presencia puede ser considerada como una fuente de contaminación y deterioro para la miel como para los productos derivados.

Por todo lo anterior, el objetivo general de este trabajo es la obtención, caracterización e identificación de levaduras osmotolerantes aisladas de miel de distintas fuentes florales que posean tolerancia a altas concentraciones de azúcares y que pudiesen ser usadas dentro de distintos procesos fermentativos útiles a la industria para la eliminación de residuos y/o transformación en compuestos orgánicos de interés.

### **3. Marco teórico.**

#### **3.1 Presión osmótica.**

Desde el punto de vista fisicoquímico, la presión osmótica puede definirse como la presión que se debe aplicar a una solución para detener el flujo neto de disolvente a través de una membrana semipermeable.<sup>23</sup>

Los microorganismos osmotolerantes poseen un efecto de adaptación a la presión osmótica extracelular manteniendo elevada su concentración interna de solutos, esto lo realizan bombeando iones del exterior celular al interior, sintetizando y/o concentrando distintos solutos (azúcares, polialcoholes y aminoácidos). Las cantidades máximas que un microorganismo puede acumular de dichos solutos está determinada por la especie y género.

La utilización de elevadas concentraciones tanto de sal como de azúcar para la conservación de distintos alimentos se basa en los efectos de la presión osmótica. Las altas concentraciones de estas sustancias crean un ambiente hipertónico que propicia la migración del agua del interior de las células microbianas. Este principio se utiliza en la conservación de alimentos a nivel industrial.

Como regla básica, los hongos filamentosos y las levaduras son más capaces que las bacterias para desarrollarse en ambientes con baja humedad o alta presión osmótica.<sup>20</sup>

##### **3.1.1 Osmotolerancia en levaduras.**

Las levaduras osmotolerantes se encuentran entre los grupos de microorganismos con menor frecuencia de estudio, pero constituyen un modelo de investigación del metabolismo de azúcares, tanto que así mismo representan fuentes muy apropiadas de subproductos con gran importancia e impacto en la industria.<sup>16, 21</sup>

Debido a que este tipo de levaduras son contaminantes de productos de la industria alimentaria, ha surgido un gran interés en investigar y comprender los mecanismos que les

permiten proliferar en ambientes tan extremos; así como, conocer aquellas aplicaciones que pudieran tener dentro de la industria.

Actualmente, el uso de las levaduras abarca áreas diferentes a las de las fermentaciones tradicionales para uso alimentario. Con el desarrollo de nuevas técnicas moleculares, es posible manipular genéticamente a las levaduras para producir una gran variedad de productos, tales como enzimas comerciales, agentes biofarmacéuticos, enzimas para biología molecular, productos químicos, etc.<sup>16</sup>

### **3.2 Levaduras.**

Las levaduras están agrupadas en unas 350 especies y clasificadas a su vez en 39 géneros, lo que muestra que dentro de los hongos son un pequeño grupo. Son bastante heterogéneas en su morfología y fisiología, la forma habitual en que se encuentran es unicelular.<sup>8</sup>

#### **3.2.1 Generalidades.**

Las células de levaduras son relativamente grandes si se les compara con una bacteria común. Su tamaño varía entre 1-5  $\mu\text{m}$  de largo y 5-30  $\mu\text{m}$  de ancho, aunque la mayoría oscila entre 3 y 8  $\mu\text{m}$  de diámetro.<sup>8</sup> Bajo buenas condiciones nutricionales, puede dividirse cada 90 minutos por brotación.<sup>15</sup>

Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, localizadas en suelos, en la superficie de las frutas, en néctar de flores, y en ambientes acuáticos. La mayoría son saprófitas y proliferan en materia orgánica en descomposición, de estas, aquellas que poseen características fermentativas llevan a cabo la fermentación alcohólica de azúcares, característica que ha sido aprovechada por el hombre desde tiempos muy remotos.<sup>8</sup>

#### **3.2.2 Estructura.**

La levadura es un hongo de una sola célula eucarionte, con un genoma de cromosomas lineales individuales contenidos en un núcleo y con organelos citoplasmáticos, como el

retículo citoplasmático, el aparato de Golgi, mitocondrias, peroxisomas, y unas vacuolas análogas a los lisosomas.<sup>15</sup>

Una levadura típica presenta forma ovoide aunque también las hay alargadas, esféricas, en forma de pera o limón e incluso triangulares. Cada especie tiene su propia forma característica, pero en un cultivo puro se puede observar que existe cierta variación en el tamaño y la forma de las células, dicha variación se puede deber a la edad del cultivo y del medio donde se encuentren.<sup>8</sup>

### **3.2.3 Metabolismo.**

Las levaduras son organismos heterótrofos, por lo tanto requieren de carbono orgánico para obtener energía y para síntesis de sus componentes celulares. Dichos requerimientos pueden variar considerablemente entre las distintas especies. Los azúcares constituyen el mejor alimento energético de las levaduras. Muchas pueden catabolizar la glucosa ya sea en forma aerobia (respiración) o anaerobia (fermentación). Bajo condiciones aerobias, pueden oxidar completamente la glucosa hasta dióxido de carbono y agua, produciendo productos como ácidos orgánicos y otros compuestos intermediarios.<sup>8</sup>

Estas pueden obtener el nitrógeno que necesitan para la síntesis de proteínas tanto de sustancias orgánicas como inorgánicas. El catión amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) es especialmente asimilable, en un medio que contenga nitrógeno mineral, por lo que los aminoácidos no son indispensables para las levaduras, lo que puede garantizar un buen desarrollo en una fermentación alcohólica.<sup>8, 1</sup>

### **3.3 Fermentación.**

La fermentación se puede definir como un proceso natural que genera energía a partir de azúcares u otras moléculas orgánicas, como aminoácidos, ácidos orgánicos, purinas y pirimidinas y que permite la formación de compuestos orgánicos de interés.<sup>20</sup>

En la glucólisis hay consumo de glucosa, síntesis neta de dos ATP y formación de productos de fermentación. Para el organismo, el producto importante es el ATP, que se usa

en múltiples reacciones que requieren energía, y los otros productos de fermentación son solo productos de desecho. Sin embargo, estos últimos no son considerados como tales por los destiladores, cerveceros, productores de derivados lácteos o panaderos.

La fermentación ocurre anaeróbicamente, en ausencia de aceptores de electrones externos y se libera sólo una pequeña cantidad de energía, sintetizándose en consecuencia unas pocas moléculas de ATP. En cambio, si está presente el  $O_2$  o cualquier otro aceptor terminal, la generación de los productos de la fermentación es innecesaria y la glucosa puede oxidarse por completo hasta  $CO_2$ . Cuando esto ocurre, es posible obtener un rendimiento más alto de ATP. El proceso por el que un compuesto se oxida usando  $O_2$  como aceptor terminal de electrones se llama respiración aerobia.<sup>13</sup>

Los microorganismos poseen la capacidad de fermentar diversos sustratos, los productos finales dependen del tipo de microorganismo, sustrato y del tipo de enzimas.<sup>20</sup>

### **3.3.1 Tipos de fermentación.**

Hay muchos tipos de fermentaciones que difieren en los productos finales que se forman a partir del piruvato. Dos tipos comunes son la fermentación alcohólica y la fermentación ácido láctica.<sup>4</sup>

La fermentación alcohólica o del alcohol comienza con la glucólisis de una molécula de glucosa para la obtención de dos moléculas de ácido pirúvico y dos moléculas de ATP. Durante el paso siguiente las dos moléculas de ácido pirúvico se convierten en dos moléculas de acetaldehído y dos moléculas de  $CO_2$ . Posteriormente las moléculas de acetaldehído son reducidas por dos moléculas de NADH para formar dos moléculas de etanol.<sup>20</sup>

Durante la fermentación ácido láctica, el piruvato se reduce directamente por acción del NADH para formar dos moléculas de ácido láctico como producto final sin liberación de  $CO_2$ . Dado que este es el producto final de la reacción, este compuesto no experimenta una oxidación ulterior y la mayor parte de la energía producida por la reacción permanece

almacenada en el ácido láctico. Por lo tanto este tipo de fermentación solo genera una escasa cantidad de energía.<sup>4,20</sup>

### **3.3.2 Uso en la industria.**

Clásicamente se ha considerado que las levaduras son los microorganismos más vinculados al progreso y bienestar del ser humano. Se ha dicho que la levadura es la “planta” más antigua que ha sido cultivada. Se sabe que la fabricación del pan y la cerveza ya se practicaban en Tebas durante la XI dinastía, 2000 A.C., tales procesos se han venido desarrollando ininterrumpidamente hasta nuestros días. *Saccharomyces cerevisiae* y algunas otras especies han sido microorganismos muy utilizados tanto en microbiología industrial (bebidas fermentadas, pan y ocasionalmente glicerina y grasa) como en todo el desarrollo de la bioquímica.<sup>11</sup>

Tradicionalmente han sido utilizadas en la industria para la producción de alcohol y de dióxido de carbono. Así tenemos que las principales industrias en las que se involucran son la cervecera, la producción de vino, la destilería y la panadería.

Las levaduras han tomado cada vez mayor importancia en otro tipo de industrias donde se aprovecha la capacidad que tienen para producir, a partir de desechos industriales, una gran cantidad de sustancias útiles en la nutrición humana y animal. En las fermentaciones naturales y en la elaboración de productos en los que se utilizan procesos de fermentación controlados por el hombre se puede encontrar una gran diversidad de levaduras. Sin embargo, las especies que se cultivan comercialmente pertenecen a tres géneros: *Saccharomyces*, *Candida* y *Kluyveromyces*.<sup>8</sup>

### **3.4 Miel de Abeja.**

Conforme lo establecido por la norma NMX-F-036-981 para miel de abeja, se define por miel de abeja: la sustancia dulce producida por las abejas a partir del néctar de las flores o de exudaciones de otras partes vivas de las plantas o presentes en ellas, que dichas abejas recogen, transforman y almacenan después en sus panales; de los cuales se extrae el producto sin adición ninguna.

La miel es un alimento con importantes cualidades nutricionales, posee acción bactericida y puede utilizarse como agente terapéutico frente a infecciones y algunos desequilibrios nutricionales del organismo. Bajo el punto de vista de la seguridad alimentaria, es considerado un alimento seguro dada su baja actividad de agua, bajo pH (3.2-4.6) y presencia de sustancias antimicrobianas.<sup>7</sup>

Se trata de un producto biológico que se modifica con el tiempo, cuya composición química varía, dentro de ciertos límites, en función de su origen floral, de factores edáficos y climáticos, del material libado, así como del procedimiento utilizado en su extracción y comercialización.<sup>18</sup>

#### **3.4.1 Tipos de miel.**

Se conocen distintos tipos de miel, que se diferencian por una serie de cualidades que dependen principalmente de su origen floral, geográfico o tecnológico. Por esas cualidades, dependientes de las fuentes que suministran el néctar a las abejas se conoce la miel monofloral, extraída de una especie de planta melífera; la polifloral extraída del néctar de plantas melíferas diferentes y las mieles de mielada, recogidas a partir de plantas con nectarios extraflorales y exudaciones de las plantas.<sup>3</sup>

Por el procedimiento que se ha aplicado para su extracción y elaboración se conoce la miel en panal y la centrifugada. Existe la miel clara, semi-clara y oscura, muchas otras no solo se diferencian por su color fundamental, sino que también por sus propiedades físicas y químicas.<sup>2</sup>

#### **3.4.2 Composición de la miel.**

La composición química de la miel depende del origen floral, de factores edáficos y climáticos, de la raza de la abeja, del estado de la colonia y de los métodos de recolección.<sup>18</sup>

Dentro de la composición media de la miel de abeja en casi todos los tipos se encuentra compuesta en un 20% de agua, 78% de azúcares y solo un 2% de constituyentes menores como vitaminas y algunos minerales.<sup>22</sup>

Algunos azúcares proceden del néctar o del mielato y otros derivan de la acción de las enzimas segregadas por las abejas. Con el envejecimiento, el perfil de azúcares sufre modificaciones, en general los polisacáridos se incrementan y los monosacáridos disminuyen. Se cree que esta condensación de monosacáridos ocurre tanto por una acción enzimática como por la acción de ácidos debido al pH de la miel y el proceso podría conducir a azúcares que no se encuentran normalmente en la naturaleza.<sup>2</sup>

### **3.4.3 Microorganismos nativos de la miel.**

Como producto de origen natural la miel presenta una flora microbiana propia, al igual que el resto de los productos alimentarios, pero con un comportamiento microbiológico característico. La flora microbiana se puede dividir en dos grupos, que en principio reúnen a los microorganismos propios de las mieles y en segunda instancia a los microorganismos secundarios ocasionales o accidentales. En este orden, en la miel se encuentran bacterias del género *Bacillus*, que se presentan en estado esporulado, aunque en mieles recientes se pueden encontrar formas vegetativas. Estos microorganismos, no tiene acción negativa sobre la miel y no son peligrosos para la salud humana. Bajo algunas circunstancias pueden encontrarse algunos patógenos para las abejas, como *Bacillus larvae*.

Las levaduras, del tipo osmófilo, pertenecientes al género *Saccharomyces*, son responsables de la fermentación de la miel, cuando las condiciones de humedad lo permiten. Dentro de este género las especies más frecuentes son *Saccharomyces bisporus* variedad *mellis*, *Saccharomyces rouxii* y *Saccharomyces bailii* variedad *osmophilus*. También se pueden encontrar levaduras banales; esta flora propia de la miel es introducida por la abeja en la colmena, con el néctar, polen o mielato, o por las mismas abejas durante las operaciones de limpieza, al vehicularlos sobre o dentro de su organismo.<sup>19</sup>

#### 4. Marco de Referencia.

Park et al en 1996 realizaron la caracterización metabólica a un total de 1752 cepas de levaduras osmotolerantes que aislaron de miel de abeja y polen procedente de Brasil. La caracterización consistió en evaluar la capacidad de transformación de sacarosa en otros azúcares de importancia a través de un sistema de fermentación utilizando un medio que se encontraba al 20% de sacarosa. La caracterización mostró que del total de cepas evaluadas, 34 levaduras osmotolerantes fueron productoras de polioles y 6 produjeron eritritol en muy buenas cantidades. Por otro lado, 52 levaduras poseían la capacidad de producir grandes cantidades de fructooligosacáridos, el estudio concluyó en la demostración de la gran capacidad de transformación de sacarosa por las cepas de levaduras osmotolerantes hasta la obtención de productos de alto valor industrial y alimenticio.

En el año 2013, Lacerda et al, evaluó la capacidad de tolerancia al estrés y el comportamiento fermentativo de 66 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* nativa. Las condiciones de estrés a las que fue sometida fueron temperatura, osmolaridad, sulfito y tolerancia al etanol. El comportamiento fermentativo se evaluó utilizando jugo de caña de azúcar y cuantificados mediante HPLC. Solo 18 cepas presentaron características tolerantes a las diferentes condiciones de estrés (42°C, 0.04% Sulfito, 1 Mol/L NaCl y 12% de etanol) y en respecto a su comportamiento fermentativo, solo 4 cepas reportaron valores elevados en producción de etanol, glicerol y ácido acético comparándola con una cepa de levadura tradicional empleada actualmente en la industria del bioetanol.

Fadel et al, en 2013 realizó la cuantificación en la producción de etanol de alto nivel proveniente de una fermentación en que utilizó una nueva cepa osmotolerante de *Saccharomyces cerevisiae* en melasa de caña de azúcar, todo en escala industrial. La fermentación se llevó acabo en un fermentador de 300 litros y se dejó por un tiempo máximo de 20 horas para dar el tiempo suficiente a que se transformara la mayor cantidad de azúcares en etanol. Reportaron una producción de etanol del 9.8% v/v con una eficiencia de fermentación del 88.1% y concluyendo que podría mejorarse para alcanzar un mejor rendimiento.

Loza-Valerdi et al, en 2014 trabajó con una colección de 398 levaduras aisladas de distintos sustratos con altas concentraciones de azúcar (zumos de frutas, jarabes industriales y miel) en los que encontró 34 cepas osmotolerantes (sustratos: glucosa y cloruro de sodio). Posteriormente se realizó una fermentación con la intención de determinar la capacidad metabólica, producción de etanol y otros subproductos. Se observó que 10 de las cepas evaluadas presentaron una producción elevada de etanol y formación de ácidos orgánicos de interés.

## **5. Planteamiento del Problema.**

Las levaduras se encuentran entre los seres vivos más antiguamente utilizados por el hombre. Actualmente siguen siendo una de las fuentes de riqueza más importante, que se refleja en la producción mundial de más de un millón de toneladas de biomasa de levadura cada año, sólo como resultado de su empleo en producción de alimentos y bebidas.

Dentro de los organismos con tolerancia a altas concentraciones de azúcares se encuentran un gran número de levaduras y un grupo muy reducido de bacterias y hongos. Muchos de los hongos son los principales causantes de la descomposición de alimentos ricos en azúcares y la principal fuente de contaminación de alimentos enlatados como mermeladas. Las levaduras que poseen capacidades metabólicas importantes son utilizadas dentro de procesos fermentativos que permitan la obtención de compuestos orgánicos de importancia alimenticia como etanol en vinos y otras bebidas.

Dentro de la industria azucarera, uno de los principales problemas a los que se enfrenta es al uso de residuos de procesos de cristalización de miel (melasa), el cual al ser un material aun rico en azúcares puede tener distintos usos finales; como suplemento alimenticio para animales, edulcorante culinario, para la obtención de distintos alcoholes, etc., pero todos estos productos dependen en cierta medida del costo de dichos procesos.

Por todo esto, se plantea la siguiente pregunta científica: ¿Podrán ser utilizadas las levaduras como fuente natural para la eliminación de dicho residuo y transformarlo en un compuesto útil para la industria de la miel y que al mismo tiempo sea de bajo costo?.

## **6. Justificación.**

La habilidad de algunas levaduras para soportar altas presiones osmóticas es fundamental para la supervivencia en los hábitats naturales y es un rasgo esencial en muchos procesos biotecnológicos.

La variación en la osmolaridad es un fenómeno constante que ocurre en casi todos los pasos de la producción de biomasa de levadura para aplicaciones posteriores en los que las células tienen que crecer y actuar óptimamente bajo condiciones hostiles.

Esta situación impulsa al desarrollo del presente trabajo y se propone el aislamiento de levaduras nativas de mieles que posean una gran tolerancia a concentraciones altas de azúcares y determinadas capacidades metabólicas que posibiliten el uso de dichos microorganismos dentro de procesos fermentativos que permitan la obtención de compuestos orgánicos de importancia industrial, así como la eliminación de posibles residuos de un proceso de producción, disminuyendo costos e incrementando rendimientos.

## **7. Objetivo General.**

Aislar levaduras nativas de miel de abeja de distintas fuentes florales que presenten capacidad osmotolerante para su utilización dentro de distintos procesos de fermentación.

### **Objetivos particulares.**

- Conformar una colección de aislamientos de levaduras provenientes de 20 mieles de diferentes orígenes florales procedentes de los municipios de Puebla y Atlixco.
- Seleccionar aislamientos nativos de levaduras por su tolerancia a crecer en altas concentraciones de azúcar
- Evaluar la capacidad metabólica de cepas de levaduras seleccionadas por su capacidad osmotolerante en 4 diferentes carbohidratos.
- Identificar a las levaduras que presenten mayor capacidad metabólica de carbohidratos y tolerancia a altas concentraciones de azúcares.

## **8. Diseño de la Investigación.**

- I. Tipo de estudio:
  - a. Descriptivo.
  - b. Experimental.
  - c. Prospectivo.
  - d. Transversal.
  - e. Comparativo.
- II. Universo del Estudio:
  - a. Cepas de levaduras aisladas de mieles de distintas floraciones.
- III. Tamaño de Muestra:
  - a. 10 muestras de Miel de distinta floración obtenidas en mercados populares e ingenios mieleros de la ciudad de Puebla.
  - b. 10 muestras de Miel de distinta floración obtenidas en mercados populares e ingenios mieleros en el municipio de Atlixco, estado de Puebla.
- IV. Criterios de Inclusión:
  - a. Todo aislamiento de levaduras obtenidas de miel de abeja que posea tolerancia a altas concentraciones de azúcares.
- V. Criterios de exclusión.
  - a. Todo aislamiento de levaduras obtenidas de miel de abeja que no posea tolerancia a altas concentraciones de azúcares.
  - b. Todo aislamiento de hongos o bacterias obtenidas de miel de abeja que se encuentre como flora nativa.
- VI. Recursos Humanos:
  - a. Victor Pardiñas Rios.
  - b. M.S.P. Claudy Lorena Villagrán Padilla.
  - c. Q.F.B. Ivan Francisco Hernández Cano.

## **9. Materiales y Método.**

### **9.1 Muestra.**

Se trabajó con 20 muestras diferentes de miel de abeja las cuales fueron obtenidas de los mercados locales e ingenios mieleros de la ciudad de Puebla y así como los pertenecientes al municipio de Atlixco, Puebla. Se buscó la mayor cantidad de variedad floral para hacer más comparativo el estudio.

### **9.2 Procesamiento de la muestra.**

Se inocularon 4 gr de muestra en el medio Yeast Mold Broth© modificado al 10% de azúcares, el cual contiene peptona de caseína (3 gr/L), extracto de levadura (5 gr/L) y sacarosa 25 (gr/L) y glucosa 75 (gr/L). Se dejó en incubación por un tiempo máximo de 5 días a 30°C en agitación (100 rpm).

### **9.3 Aislamiento de levaduras.**

Para el aislamiento de levaduras de miel de abeja se utilizó el medio de crecimiento Yeast Mold Agar© modificado al 10% y 40% de azúcares; para la concentración de 10% se colocó sacarosa 25 (gr/L) y glucosa 75 (gr/L) y para la concentración a 40% se agregó sacarosa 100 gr/L y glucosa 300 gr/L.

Se tomó 1 mL de la muestra procesada y se sembró en los medios antes mencionados mediante barrido en placa. Se incubó por un tiempo máximo de 3 días a 30°C. El criterio de selección de levaduras se realizó mediante la observación macroscópica de las colonias obtenidas de la siembra, a las colonias de interés, se les realizó tinción de gram para descartar bacterias. Las colonias que se identificaron como levaduras, se resembraron en el medio en que fueron aisladas para su purificación.

### **9.4 Prueba de osmotolerancia.**

Para la realización de la prueba de osmotolerancia se utilizó nuevamente el medio Yeast Mold Agar© modificado al 10%, 40% y 60%. Se inoculó por el método de estría cruzada, se incubó a 30°C por 3 días para observar crecimiento y formación de colonias. Se realizó la prueba de osmotolerancia a las levaduras que crecieron en 10% ya que las que crecieron en 40% se les consideró osmotolerantes automáticamente.

Se considerará como levadura osmotolerante a aquel microorganismo capaz de desarrollarse a concentraciones mayores a 40%.

### **9.5 Prueba de capacidad metabólica.**

Para la determinación de la capacidad metabólica de las cepas osmotolerantes se utilizó un medio que nos permitió determinar de manera cualitativa la actividad de fermentación. El medio que se utilizó es el Yeast Fermentation Medium© modificado con la siguiente composición: peptona de caseína (7.5 gr/L), extracto de levadura (4.5 gr/L), azul de bromotimol 1.6% (1mL) y carbohidratos (20 gr/L). Los azúcares a evaluar fueron glucosa, sacarosa, fructosa y lactosa a una concentración del 10% (100 gr/L). Ya inoculados los medios, se incubaron a 30°C por 72 hr.

### **9.6 Cuantificación de la capacidad metabólica.**

Ya seleccionadas las cepas con actividad fermentativa de manera cualitativa, se procedió a la cuantificación de dicha actividad. Para eso, se utilizó un medio restrictivo que nos garantizó que el crecimiento y metabolismo de la cepa se realiza únicamente por la transformación de los azúcares en el medio y no por alguna otra fuente posible de nutrientes, por lo que se utilizó el medio Yeast Nitrogen Base© utilizando como azúcares a glucosa, sacarosa, fructosa y lactosa a una concentración del 10% (100 gr/L) Se incubó a 30°C por un tiempo de 72 hrs sin agitación.

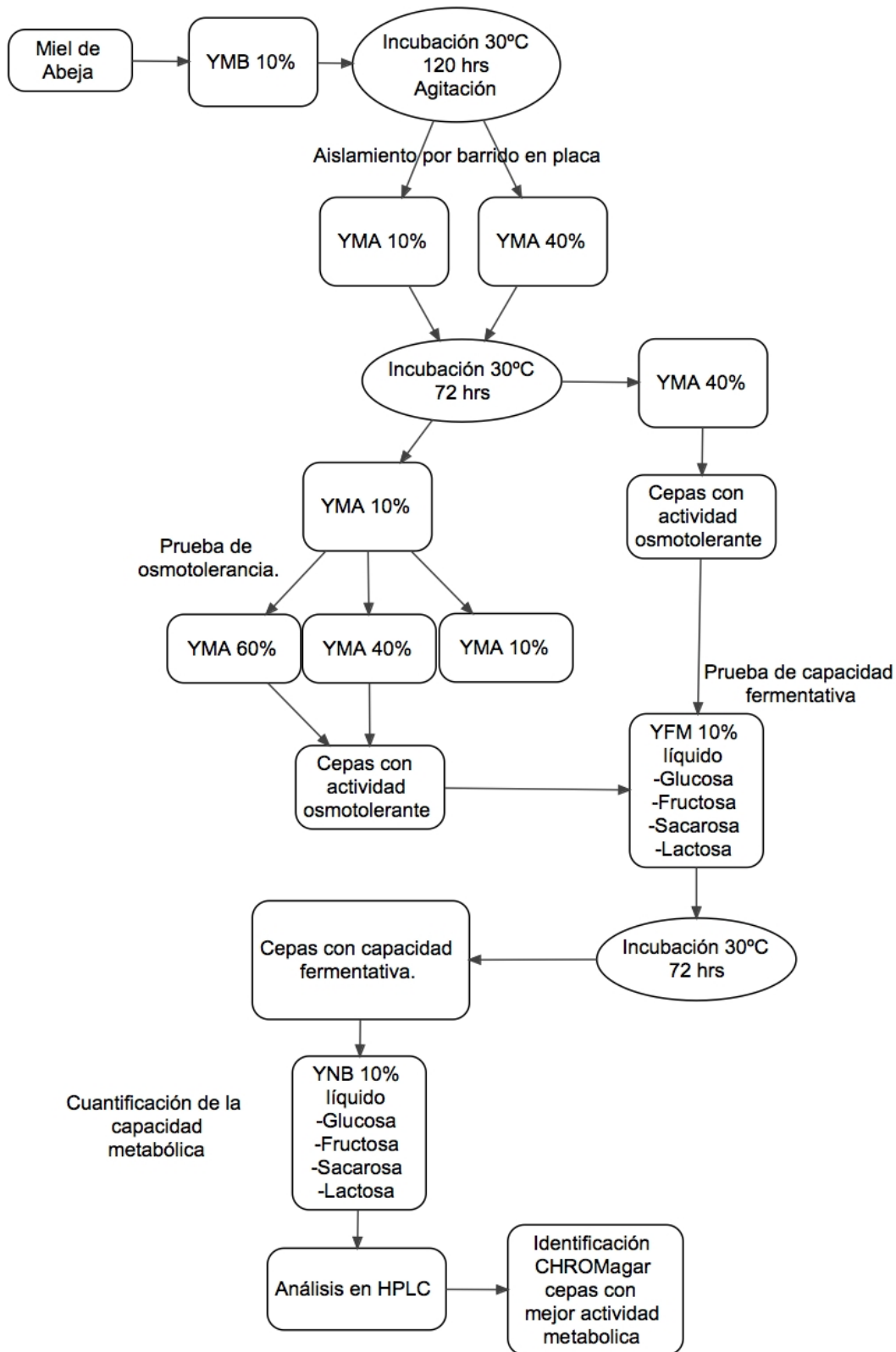
### **9.7 Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).**

Se realizó la cuantificación de consumo de carbohidratos por las cepas de levaduras con ayuda de un cromatógrafo HPLC de la marca Agilent y utilizando un detector de índice de refracción. Se utilizó como fase estacionaria una columna para cuantificación de carbohidratos Hiplax-Pb de la marca Agilent, las condiciones para el corrimiento cromatográfico fueron: como fase móvil agua grado HPLC, el flujo de la bomba a 0.6 mL/min, la temperatura de análisis para la columna en 70°C y con un tiempo de inyección de 23 min.

### **9.8 Identificación.**

Se realizó la identificación solo a las cepas que presentaron tolerancia a concentraciones altas de azúcar y que tuvieron la mejor actividad metabólica utilizando CHROMagar Medium© por sembrado por estría cruzada. Se diferenció a los distintos tipos de cepas por el color que presentaron en el medio en comparación con la tabla puesta en el trabajo de Góralaska K. (2011) la cual se muestra en el Anexo VIII.

9.9 Diagrama general de trabajo.



## 10. Resultados y discusión.

### 10.1 Muestras y aislamiento de levaduras nativas de la miel.

Se obtuvo un total de 20 muestras de diferentes fuentes florales recolectadas en los municipios de Puebla y Atlixco, se etiquetaron, se asignó un código a cada una de ellas y se anexó una breve descripción de sus características físicas como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Listado de muestras recolectadas en los municipios de Atlixco y Puebla.

Mieles	Recolección	Origen	Tipo de miel	Cantidad	Códigos	Observaciones
Miel multiflora	Mpio Atlixco	Mercado	Multiflora	3 frascos	MM1, MM2, MM3	Miel líquida homogénea, transparente y espesa.
Miel azahar	Mpio Atlixco	Ingenio	Flor de azahar	2 frascos	MA1, MA2	Miel líquida-cristalizada fina y fluida
Miel mezquite	Mpio. Atlixco	Ingenio	Flor de mezquite	2 frascos	ME1, ME2	Miel líquida homogénea, oscura y espesa.
Miel de café	Mpio. Atlixco	Mercado	Flor de café	1 frasco	MC	Miel líquida-cristalizada oscura y espesa.
Miel mantequilla	Mpio. Atlixco	Ingenio	Multiflora	1 frasco	MMT1	Miel cristalizada clara, cristales muy finos, dura
Miel cocoite	Mpio. Atlixco	Ingenio	Flor cacahuananche	1 frasco	MCC	Miel líquida homogénea, oscura y espesa.
Miel campanilla	Mpio. Puebla	Ingenio	Flor campanilla	2 frascos	MCA1, MCA2	Miel líquida homogénea, transparente y espesa.
Miel multiflora	Mpio. Puebla	Mercado	Multiflora	3 frascos	MM4, MM5, MM6	Miel líquida-cristalizada, transparente y espesa.
Miel naranja	Mpio. Puebla	Mercado	Flor de naranja	3 frascos	MN1, MN2, MN3	Miel líquida turbia, oscura y fluida.
Miel de cacao y café	Mpio. Puebla	Ingenio	Flor de café con cacao	1 frasco	MCF	Miel líquida turbia, oscura y fluida.
Miel mantequilla	Mpio. Puebla	Ingenio	Multiflora	1 frasco	MMT2	Miel cristalizada clara, cristales muy finos, dura

Tabla 2. Aislamiento de microorganismos en las muestras recolectadas. Donde ✓ indica positivo al crecimiento del microorganismo indicado y ✗ que no hubo crecimiento.

	Mieles	Concentración	Levaduras	Hongos	Cepa
Atlixco	MM1	YMA 10%	✓	✗	1
		YMA 40%	✓	✗	1
	MM2	YMA 10%	✗	✓	-
		YMA 40%	✓	✗	1
	MM3	YMA 10%	✓	✗	1
		YMA 40%	✓	✗	1
	MA1	YMA 10%	✓	✗	2
		YMA 40%	✗	✗	-
	MA2	YMA 10%	✗	✗	-
		YMA 40%	✗	✗	-
	ME1	YMA 10%	✓	✗	1
		YMA 40%	✗	✗	-
	ME2	YMA 10%	✗	✓	-
		YMA 40%	✓	✗	1
	MC	YMA 10%	✓	✗	1
		YMA 40%	✓	✗	1
	MMT1	YMA 10%	✓	✗	1
		YMA 40%	✗	✗	-
	MCC	YMA 10%	✗	✓	-
		YMA 40%	✗	✓	-
Puebla	MCA1	YMA 10%	✗	✓	-
		YMA 40%	✓	✗	2
	MCA2	YMA 10%	✗	✓	-
		YMA 40%	✗	✗	-
	MM4	YMA 10%	✗	✗	-
		YMA 40%	✓	✗	2
	MM5	YMA 10%	✓	✗	1
		YMA 40%	✗	✓	-
	MM6	YMA 10%	✓	✗	1
		YMA 40%	✓	✗	1
	MN1	YMA 10%	✓	✗	2
		YMA 40%	✗	✓	-
	MN2	YMA 10%	✓	✗	2
		YMA 40%	✗	✓	-
	MN3	YMA 10%	✓	✗	1
		YMA 40%	✓	✗	2
	MCF	YMA 10%	✓	✗	2
		YMA 40%	✗	✗	-
	MMT2	YMA 10%	✓	✗	1
		YMA 40%	✗	✗	-
				Total	29

Se aislaron 29 cepas de levaduras provenientes de las muestras de miel (Tabla 2), se observó también la presencia de hongos filamentosos y la ausencia de bacterias (Anexo I). Esto concuerda con lo señalado por Tortora et al. (2007) quien menciona que las bacterias

no son capaces de adaptarse en ambientes con elevada presión osmótica ni baja humedad, características presentadas en la miel.

### 10.2 Prueba de osmotolerancia.

Una vez que se obtuvo el aislamiento de las levaduras, se seleccionaron aquellas que crecieron en el medio a una concentración de 10% de azúcares (17 levaduras) y se procedió a realizar la prueba de osmotolerancia. Por otra parte, aquellas que crecieron en el medio a 40% de azúcares (12 levaduras) fueron consideradas como osmotolerantes, esto de acuerdo a lo descrito por Rosa y Péter (2006) en donde describe a las levaduras osmotolerantes capaces de soportar concentraciones de azúcar superiores al 20%.

Tabla 3. Prueba de osmotolerancia a levaduras aisladas del medio a 10% de azúcares. Las cruces (X) indican el crecimiento de las levaduras en el medio.

	Miel	Aislada de:	10%	40%	60%
Atlixco	MM1	YMA 10%	XXX	-	-
	MM3	YMA 10%	XXX	X	-
	MA1 - A	YMA 10%	XXX	XXX	-
	MA1 - B	YMA 10%	XX	-	-
	ME1	YMA 10%	XXX	-	-
	MC1	YMA 10%	XXX	XX	X
	MMT1	YMA 10%	XXX	X	X
Puebla	MM5	YMA 10%	XX	-	-
	MM6	YMA 10%	XXX	-	-
	MN1 - A	YMA 10%	XX	XXX	XXX
	MN1 - B	YMA 10%	XXX	-	-
	MN2 - A	YMA 10%	XXX	XXX	-
	MN2 - B	YMA 10%	XXX	XX	X
	MN3	YMA 10%	XX	-	-
	MCF - A	YMA 10%	XX	-	-
	MCF - B	YMA 10%	XXX	XXX	X
	MMT2	YMA 10%	XXX	-	-

Después de realizar la prueba a las 17 cepas anteriores (Anexo II), 8 presentaron capacidad osmotolerante, de éstas MM3, MA1-A y MN2-A mostraron crecimiento en el medio a 40% de azúcares y MC, MMT1, MN1-A, MN2-B, MCF-B mostraron crecimiento a 40% y a 60%. Por lo que se obtuvo un total de 20 cepas osmotolerantes; como se muestra en la Tabla 3.

Debido a que las mieles están compuestas por una elevada cantidad de azúcares, se genera un ambiente hipertónico que provoca que la mayoría de los microorganismos no sean capaces de desarrollarse en ellas, sin embargo algunos como las levaduras que observamos en esta prueba, poseen la capacidad de adaptación al mantener elevada la concentración interna de sus solutos, impidiendo la migración del agua interior al espacio extracelular y como menciona Tortora et al. (2007), dicha capacidad de acumulación de solutos esta determinada por la especie y género del microorganismo.

### 10.3 Prueba de capacidad metabólica.

Se analizó la capacidad metabólica de las levaduras osmotolerantes ante diferentes fuentes de carbono. El medio que se utilizó permitió determinar de forma cualitativa la actividad fermentativa de las levaduras a través de la producción de gas y el vire del indicador en el medio (Anexo III). Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Prueba de capacidad metabólica utilizando el medio YFM en donde se evaluó la producción de gas y el vire de color del medio. Para la medición de producción de gas se utilizó escala de cruces, reportando como mucho (+++), regular (++) , poco (+) y nada (-).

Miel	Aislada de:	Glucosa		Sacarosa		Fructosa		Lactosa	
		Prod. Gas	Vire de color	Prod. Gas	Vire de color	Prod. Gas	Vire de color	Prod. Gas	Vire de color
MM1	YMA 40%	+++	✓	-	✗	-	✗	-	✗
MM2	YMA 40%	+++	✓	++	✓	++	✓	-	✗
MM3	YMA 40%	+++	✓	++	✓	+	✓	-	✗
ME2	YMA 40%	+++	✓	-	✗	-	✗	-	✗
MC1	YMA 40%	+++	✓	+	✓	+++	✓	-	✗
MCA1 - A	YMA 40%	+++	✓	++	✓	+++	✓	-	✗
MCA1 - B	YMA 40%	+++	✓	+	✓	++	✓	-	✗
MM4 - A	YMA 40%	+	✓	+	✓	+	✓	++	✓
MM4 - B	YMA 40%	+	✓	-	✗	+	✓	-	✗
MM6	YMA 40%	+	✓	-	✗	++	✓	-	✗
MN3 - A	YMA 40%	+	✓	+	✓	+	✓	+++	✓
MN3 - B	YMA 40%	++	✓	+	✓	+++	✓	-	✗
MM3	YMA 10%	+	✓	-	✗	-	✗	-	✗
MA1 - A	YMA 10%	+++	✓	+	✓	+	✓	+	✓
MC2	YMA 10%	+	✓	-	✗	+	✓	-	✗
MMT1	YMA 10%	++	✓	+++	✓	+++	✓	-	✗
MN1 - A	YMA 10%	+	✓	-	✗	-	✗	-	✗
MN2 - A	YMA 10%	+	✓	++	✓	-	✗	-	✗
MN2 - B	YMA 10%	++	✓	++	✓	+	✓	-	✗
MCF - B	YMA 10%	+++	✓	++	✓	++	✓	-	✗

Los resultados obtenidos de la prueba de capacidad metabólica muestran en primer lugar que todas las levaduras seleccionadas son capaces de utilizar a la glucosa como fuente de carbono, sin embargo, se observa una variabilidad en el consumo de los carbohidratos restantes (Anexo IV). Con base a los resultados, se realizó una clasificación de las cepas capaces de metabolizar todos los azúcares y las que solo metabolizaron a la glucosa, sacarosa y fructosa debido a que son los azúcares que componen principalmente la miel.

Las levaduras seleccionadas fueron un total de 12 y fueron las siguientes: MM4-A, MN3-A, MA1-A que fermentaron los 4 azúcares y MM2, MM3, MC1, MCA1-A, MCA1-B, MN3-B, MMT1, MN2-B, MCF-B que metabolizaron solo los 3 azúcares que componen a las mieles en general.

Los resultados de la Tabla 4 muestran una similitud con el trabajo realizado por Loza-Valerdi et al, (2014), en donde de un amplio número de cepas evaluadas se seleccionaron solo las que presentaron la mejor capacidad metabólica, reduciendo drásticamente el número de levaduras seleccionadas, sin embargo en su trabajo también se reportó y cuantificó a los metabolitos producidos después de la fermentación de azúcares, en donde se reporta que una cierta cantidad de levaduras presentaron una elevada producción de etanol y la presencia de diferentes ácidos orgánicos.

#### **10.4 Cuantificación de la capacidad metabólica por HPLC.**

Como segundo paso para la evaluación de la capacidad metabólica de las levaduras, se determinó cuantitativamente dicha capacidad a través del uso de cromatografía líquida de alta eficacia y el medio YNB (Anexo V y VII), se muestran los resultados en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5. Concentración de azúcares (mg/mL) después de fermentación de cada levadura seleccionada obtenidos por HPLC.

<b>Miel</b>	<b>Aislada de:</b>	<b>Glucosa</b>	<b>Sacarosa</b>	<b>Fructosa</b>	<b>Lactosa</b>
<b>MM2</b>	YMB 40%	8.567	34.562	41.459	108.54
<b>MM3</b>	YMB 40%	12.846	41.467	69.421	108.52
<b>MC</b>	YMB 40%	9.456	62.75	13.536	109.34
<b>MCA1 - A</b>	YMB 40%	7.53	22.785	9.426	107.45
<b>MCA1 - B</b>	YMB 40%	10.459	71.467	48.654	108.34
<b>MM4 - A</b>	YMB 40%	68.539	64.529	58.452	12.677
<b>MN3 - A</b>	YMB 40%	63.349	71.562	61.635	15.568
<b>MN3 - B</b>	YMB 40%	33.452	62.764	19.653	108.98
<b>MA1 - A</b>	YMB 10%	8.215	79.212	84.243	82.154
<b>MMT1</b>	YMB 10%	41.411	0	2.133	109.12
<b>MN2 - B</b>	YMB 10%	30.1243	35.431	81.124	108.78
<b>MCF - B</b>	YMB 10%	0	28.213	32.534	109.21
	<b>Control</b>	<b>103.34</b>	<b>100.77</b>	<b>105.67</b>	<b>109.45</b>

Tabla 6. Porcentaje de consumo de azúcares por levaduras seleccionadas.

<b>Miel</b>	<b>Aislada de:</b>	<b>Glucosa</b>	<b>Sacarosa</b>	<b>Fructosa</b>	<b>Lactosa</b>
<b>MM2</b>	YMB 40%	92%	66%	61%	1%
<b>MM3</b>	YMB 40%	88%	59%	34%	1%
<b>MC</b>	YMB 40%	91%	38%	87%	0%
<b>MCA1 - A</b>	YMB 40%	93%	77%	91%	2%
<b>MCA1 - B</b>	YMB 40%	90%	29%	54%	1%
<b>MM4 - A</b>	YMB 40%	34%	36%	45%	88%
<b>MN3 - A</b>	YMB 40%	39%	29%	42%	86%
<b>MN3 - B</b>	YMB 40%	68%	38%	81%	0%
<b>MA1 - A</b>	YMB 10%	92%	21%	20%	25%
<b>MMT1</b>	YMB 10%	60%	100%	98%	0%
<b>MN2 - B</b>	YMB 10%	71%	65%	23%	1%
<b>MCF - B</b>	YMB 10%	100%	72%	69%	0%

Como podemos observar en la tabla 5, los resultados obtenidos del análisis cromatográfico por HPLC para cada uno de los medios en donde se evaluó la capacidad que tienen las cepas seleccionadas para metabolizar distintos carbohidratos. Los resultados se reportan en mg/mL de azúcares residuales al término de la fermentación lo que nos da una idea de que tanto es capaz una cepa de consumir dicho sustrato para su desarrollo.

En segundo lugar, tenemos en la tabla 6 el porcentaje de consumo de los distintos azúcares que presenta cada una de las cepas en relación a la cantidad inicial reportada en la tabla 5, lo que permite seleccionar de manera mas precisa a aquellas cepas que tuvieran la mejor capacidad metabólica frente a los azúcares evaluados.

Así pues se toma en consideración a las cepas que presentan los consumos más altos de carbohidratos y que sean capaces de metabolizar los 4 azúcares. Se observa que solo 3 cepas seleccionadas presentaron consumo en los 4 sustratos utilizados para la evaluación, dichos valores no son cercanos al 100%, sin embargo, se toman en consideración por su capacidad de transformar distintos sustratos. Se seleccionó por tanto a las cepas MM4-A y MN3-A.

De las levaduras evaluadas restantes se seleccionó a MM2, MC1, MCA1-A, MMT1 y MCF-B considerando que éstas presentaron los porcentajes de consumo mas altos solo en tres azúcares y que bajo el mismo criterio de selección de la prueba anterior, son los más representativos dado que se encuentran en la composición de la miel de abeja y cumplen con la finalidad del estudio.

### **10.5 Identificación por CHROMagar.**

Al concluir las pruebas metabólicas y de osmotolerancia, se pudo seleccionar de una cantidad inicial de 29 cepas aisladas de mieles solo a 7 de ellas que presentaron los rendimientos mas altos en consumo de azúcares y capacidad osmotolerante. Se procedió a realizar la identificación de las cepas utilizando CHROMagar Medium© por estría cruzada y comparando el color que produjo la cepa en el medio con los colores reportados en tablas por Góralaska K., (2011) las cuales se presentan en el Anexo VIII. Los resultados fueron los siguientes (ver Tabla 7):

Tabla 7. Identificación de cepas seleccionadas y morfología macroscópica.

Miel	Código	Origen	Morfología	Identificación
Miel multifloral	MM2	Atlixco	Convexa, borde redondeado, circular, cremosa, brillante, pequeña, color lila.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Miel de café	MC	Atlixco	Convexa, borde redondeado, circular, cremosa, brillante, pequeña, color crema.	<i>Saccharomyces bayanus</i>
Miel campanilla	MCA1 - A	Puebla	Plana, borde ondulado, irregular, cremosa, opaca, mediana, rosa claro.	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
Miel multifloral	MM4 - A	Puebla	Convexa, borde redondeado, circular, cremosa, brillante, pequeña, color café claro.	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>
Miel de naranja	MN3 - A	Puebla	Convexa, borde redondeado, circular, cremosa, opaca, pequeña, color rosa.	<i>Candida glabrata</i>
Miel mantequilla	MMT1	Atlixco	Convexa, borde redondeado, circular, cremosa, brillante, pequeña, color lila.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Miel cacao y café	MCF - B	Puebla	Convexa, borde redondeado, circular, cremosa, opaca, pequeña, color verde menta.	<i>Candida albicans</i>

De la tabla anterior, se reporta que de las 7 cepas de levaduras que fueron seleccionadas, después de la identificación por CHROMagar, 4 de ellas son del género *Saccharomyces*, 2 del género *Candida*, y solo una fue reportada como *Kluyveromyces*. Su morfología macroscópica se tomó de la misma placa de CHROMagar (Anexo VI).

Esto concuerda con lo descrito por Salamanca et al (2001) quien menciona que dentro de los principales microorganismos que podemos encontrar en la miel, las levaduras del género *Saccharomyces* son los más frecuentes y que así mismo poseen una capacidad osmotolerante bastante amplia, tanto que algunas especies son capaces incluso de fermentar la misma miel cuando tiene las condiciones adecuadas de humedad.

Las levaduras como *Kluyveromyces* y *Candida* se encuentran la mayoría de las veces dentro de los microorganismos poco frecuentes, los cuales podrían ser introducidos a la miel directamente por el néctar, polen o incluso por la misma abeja durante el proceso de polinización.

La identificación por CHROMagar es una herramienta, útil, sencilla y económica (en comparación a una identificación por DNA genómico) sin embargo, se recomienda la identificación genética de las levaduras para corroborar el género y especie descritos.

## 11. Conclusiones.

Se aislaron 29 levaduras de las 20 muestras de miel con diferente floración, demostrando que dichos microorganismos son los mas frecuentes como flora nativa en la miel de abeja.

El 68% de las levaduras presentaron tolerancia osmófila al 40% de azúcares; de estas solo 5 soportaron ambiente hipertónico a 60% y el resto (32%) no presentó tolerancia,

Se evaluó la capacidad metabólica de las levaduras osmotolerantes observando que 12 de las cepas metabolizaron los 4 carbohidratos utilizados, posteriormente se determinó por HPLC aquellas que presentaron mayor actividad, resultando 7 favorables al estudio.

La identificación de las 7 levaduras con mayor capacidad metabólica por medio de la utilización de CHROMagar *Candida* arrojó 4 cepas del género *Saccharomyces*, 2 del género *Candida* y 1 del género *Kluyveromyces*.

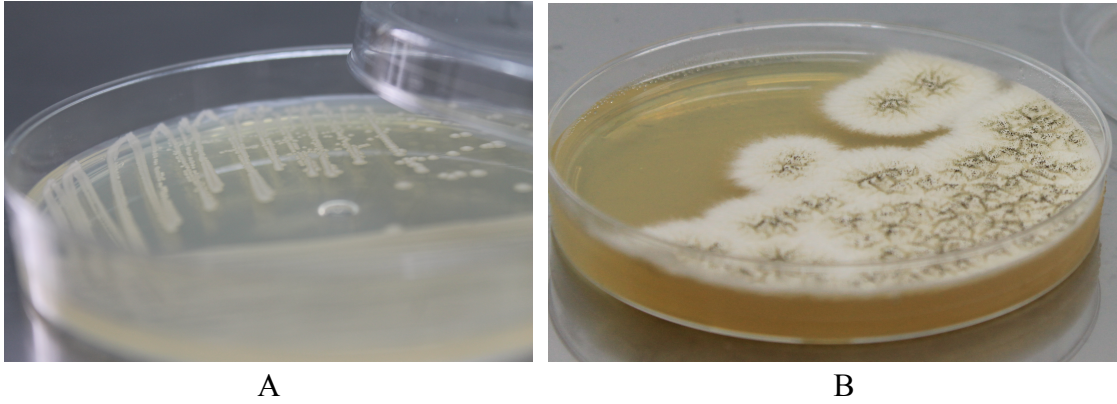
Las levaduras seleccionadas en este estudio son potencialmente útiles dentro de una industria mielera, porque debido a que poseen una alta actividad osmotolerante, pueden ser utilizadas dentro de la fermentación de residuos industriales ricos en azúcares para la producción de alcohol u otro posibles metabolitos de interés, al mismo tiempo poseen una actividad metabólica elevada, lo que permite la degradación de los azúcares residuales en un corto tiempo, reduciendo de esta manera los costos y rendimientos de los procesos.

## 12. Bibliografía.

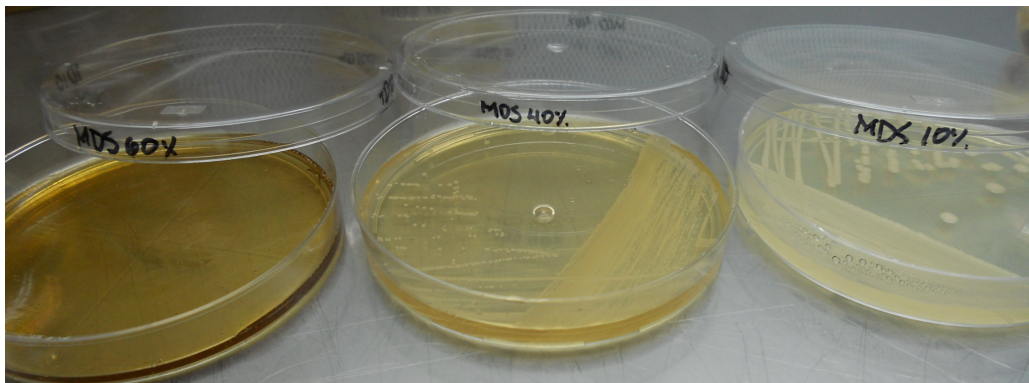
1. Blouin J., Guimberteau G. (2002). Maduración y Madurez de la Uva. España: Mundi-Prensa.
2. Bogdanov S., Bieri K., Gremaud G.,(2004). Produits apicoles: 23<sup>a</sup> Miel. Berne: ed. MSDA
3. Bogdanov S., Gallmann P., Stangaciu S., Cherbulliez Th. (2006). Produits apicoles et santé. AlpForum, 41. Pp3-50
4. Campbell N.A., Reece J.B. (2005). Biología (7<sup>a</sup> Ed.). Argentina: Ed. Panamericana.
5. Dirección general de normas, NMX-F-036-981. <[www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-036-1981.PDF](http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-036-1981.PDF)>
6. Fadel M, Keera A.A., Mouafi F.E., Kahii T. (2013). High Level Ethanol from Sugar Cane Molasses by a New Thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* Strain in Industrial Scale. Biotechnol Res Int. 2013; p 253-286
7. Fattori S. (2004). La miel: propiedades, composición y análisis físico-químico. Apimondia.
8. Garcia-Cortéz V. (2004). Introducción a la Microbiología (2<sup>a</sup> Ed). Costa Rica: EUNED.
9. Góralaska K., (2011). Characteristics of growth of yeasts and yeast-like fungi on chromogenic medium CHROMagar® Candida. Wiadomoœci Parazytologiczne, 57(3), 143-149
10. Lacerda C., Ferreira W., Luiza A., Ribeiro D., Araújo E.C., Freitas R. (2013). Evaluation of stress tolerance and fermentative behavior of indigenous *Saccharomyces cerevisiae*. Braz J Microbiol. 44(3): pp 935–944.
11. Loza-Valerdi E.M. (2006) Evaluación de levaduras osmotolerantes para su aplicación en alimentos de procesamiento mínimo, utilizando aguamiel. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional.
12. Loza-Valerdi E.M., Torres-Rios S.J., Cercado-Jaramillo J:C. (2014). Evaluación de la producción de etanol por levadura osmotolerantes aisladas de miel, jarabes de caña, melaza y otros sustratos alto contenido de azúcar. En Charles D. Scott. (Presidente). Simposio en Biotecnología para químicos y combustibles. Clearwater Beach, FL.
13. Madigan M., Martinko J., Parker J. (2009). Brock Biología de los Microorganismos. (12<sup>a</sup> Ed) España: Ed. Pearson Educación.

14. Park YK, Koo MH, Oliveira IM. (1996) Biochemical characteristics of osmophilic yeasts isolated from pollens and honey. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 60 (11), 1872-1873.
15. Passager E. (2009). *Genética Texto y Atlas (3ra Ed)*. Alemania: Ed Médica Panamericana,
16. Plascencia-Espinosa, M. (2003). Análisis de las invertasas de levaduras osmotolerantes y sus aplicaciones en biotecnología.. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional.
17. Rosa C. & Péter G. (2006). *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts (1th Ed)*. Germany: Ed. Springer. P 380
18. Sáinz C., Gómez C. (2000). *Mieles españolas*. Madrid: Ediciones Mundi"Prensa.
19. Salamanca G., Henao C.A., Moreno G., Luna A. (2001). Características microbiológicas de las mieles tropicales de *Apis mellifera*. <[http://www.beekeeping.com/articulos/salamanca/caracteristicas\\_microbiologicas\\_mieles.htm](http://www.beekeeping.com/articulos/salamanca/caracteristicas_microbiologicas_mieles.htm)> (17 marzo 2001)
20. Tortora G., Funke B., Case C. (2007) *Introducción a la Microbiología (9th Ed)*. Argentina: Ed. Med. Panamericana
21. Trejo-Estrada, S. (2003). Producción de azúcar líquido y jarabes industriales a partir de maíz y caña de azúcar. Informe interno CICATA-IPN Puebla.
22. Vaissière B., Reeb C., Ratia G., Le Conte Y., Fert G. Domerego R., Barbancon J.M. (2006). *Le traité Rustica de l'apiculture*. Paris: ed. Rustica
23. Voet D., Voet J.G, Pratt C.W., (2013). *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level (4th Ed.)* USA: Wiley. P 30

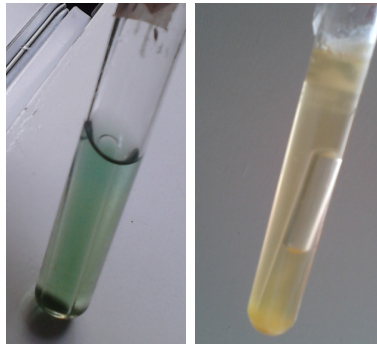
## ANEXOS.



Anexo I. Aislamiento de microorganismos de miel. A) levadura aislada de una muestra de miel en medio YMB al 10% de azúcares. B) hongo aislado de la misma muestra de miel en medio YMB al 40% de azúcares.



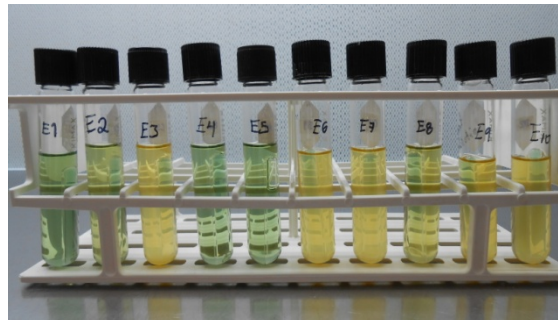
Anexo II . Crecimiento en medio para osmotolerancia. Se observa el crecimiento de una cepa de levadura solo hasta el medio a 40% de azúcares, las colonias se observan mas pequeñas y con cambio de color comparándolas con el medio al 10% de azúcares.



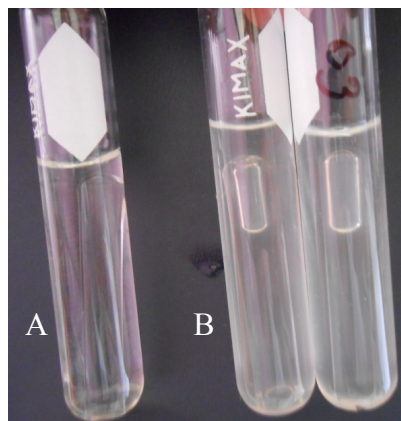
A

B

Anexo III. Medio YFM al 10% de azúcares. A) medio antes de la inoculación de la cepa, su tonalidad es verde y se observa la campana Durham llena con el medio. B) medio después de la inoculación, se observa la producción de gas y el vire de color a amarillo, lo que es indicador de fermentación por parte de la cepa evaluada.



Anexo IV. Prueba de actividad metabólica. Se observa la diferencia entre cada una de la cepas conforme a su actividad metabólica frente a un carbohidrato. Los indicadores de fermentación fueron el vire de color y la producción de gas.



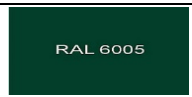



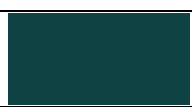



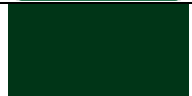
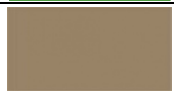








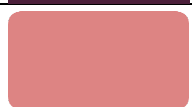


A

B

Anexo V. Prueba de actividad metabólica en YNB. A) medio YNB al 10% de azúcares sin inocular, se observa transparente y sin gas en campana Durham. B) medio YNB 10% de azúcares donde se observa presencia de gas y turbidez, se toma esta prueba como positiva y se procede a su análisis directo en HPLC para cuantificación de azúcares residuales.



Especie	Escala RAL	Color	Especie	Escala RAL	Color
<i>Candida albicans</i> (Robin) Berkhout	RAL 6002		<i>Kluyveromyces marxianus</i> (E.C.Hansen) van der Walt	RAL 3015	
	RAL 6005			RAL 4007	
	RAL 6033		<i>Kluyveromyces yarrowi</i> van der Walt,	RAL 6011 con 6005	
<i>Candida albicans</i> (Jones & Martin) Diddens & Lodder	RAL 6004		<i>Saccharomyces bayanus</i> Saccardo	RAL 4007 con 9001	
	RAL 6029			RAL 6018	
<i>Candida catenulata</i> (Diddens)	RAL 6009		<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> E.C.Hansen	RAL 1019	
<i>Candida datila</i> (Kluyver) S.A Meyer	RAL 6024		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Meyen ex E.C. Hansen	RAL 4007	
<i>Candida dubliniensis</i> Sullivan	RAL 6036			RAL 4002	
	RAL 6033			RAL 6004	
<i>Candida glabrata</i> (Anderson) S.A Meyer & Yarrow	RAL 4007		<i>Saccharomyces pastorianus</i> E.C. Hansen	RAL 4002 con 3012	
	RAL 3014				

Anexo VIII. Tabla de colores en CHROMagar Candida reportados. Fragmentos de la tabla de identificación de levaduras en el medio CHROMagar reportado por Góralaska K., (2011)