



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CREACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE UNA
COLECCIÓN DE LEVADURAS SILVESTRES CON
POTENCIAL PARA CERVECERÍA

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Román Bruno Paz García

DIRECTORA: M.C. Yuriria Santoyo Páez

CODIRECTOR: D.C. Luis Ernesto Fuentes Ramírez

Agosto, 2019



Dedicatoria

Esta tesis representa la culminación de un gran sueño que comenzó hace un largo tiempo cuando decidí salir de mis orígenes para emprender este camino lleno de retos, aunque no fue fácil llegar hasta este momento hoy agradezco a dios por contar con el apoyo de personas increíbles a lo largo de este trayecto. Este trabajo está dedicado a todos aquellos que estuvieron junto a mí apoyándome día con día para lograr mi sueño, en especial a:

Mi madre María de la Luz García Guzmán

Mis hermanas: Débora Ivette Paz García e Itzel Monserrat Paz García

Mis profesores, en especial a Yuriria Santoyo Páez

Mis familiares

Mis amigos

Agradecimientos

A mis padres: María de la Luz García Guzmán y
Román Bruno Paz

A mis hermanas: Débora Iveth Paz García e
Itzel Monserrat Paz García

A mis asesores: M. C. Yuriria Santoyo Páez y
D. C. Luis Ernesto Fuentes Ramírez

Al CICM del ICUAP

A todos mis amigos

Resumen

La producción de cerveza es un proceso llevado a cabo por levaduras principalmente del género *Saccharomyces* aunque en algunos estilos de cerveza pueden participar levaduras no convencionales o “no-*Saccharomyces*”. Las levaduras liberan y reducen componentes químicos durante la fermentación que producen aromas y sabores únicos y característicos de ciertos estilos de cerveza. En este trabajo se aislaron un total de 98 levaduras silvestres, 56 cepas procedentes de *Ananas comosus* (piña), 4 cepas provenientes de *Prunus cerasifera* (ciruela), de *Agave angustifolia* (espadín) solo 3 cepas, de pulque 5 cepas y de un grupo de hongos lignícolas un total de 30 cepas, las cuales tenían características coloniales y microscópicas levaduriformes. La colección se caracterizó mediante diferentes pruebas como: inducción de ascosporas, asimilación de urea y de asimilación y fermentación de carbohidratos. Los perfiles de los aislados se compararon con el de *Saccharomyces cerevisiae*, realizando un screening y reduciendo el número de cepas a probar. Se eligieron 21 cepas con los perfiles más parecidos al de *S. cerevisiae* mediante un análisis de similaridad/disimilaridad, las cepas elegidas se evaluaron para tolerancia al etanol, a valores bajos de pH y a prueba de termotolerancia. Los análisis de los resultados de estas pruebas de potencial indican que las cepas 100, 31 y 60 de la colección pueden tener potencial para la producción de cerveza. Por análisis cuantitativo obtenido por índice de Jaccard, se evidencio que la cepa 100 aislada de *Byssomerulius corium*, presentó los mejores resultados con mayor similaridad al control en las pruebas bioquímicas y de potencial productor. Se estandarizó y aprobó el uso de técnicas para el aislamiento y caracterización de levaduras silvestres.

Índice de Contenido

1. Introducción	6
1.1. Avances científicos en las levaduras a lo largo de la historia	7
1.2. Levadura	9
1.3. Morfología	10
1.4. Importancia de la pared celular en la fermentación.....	14
1.5. Metabolismo aerobio y anaerobio	15
1.6. Floculación.....	18
1.7. Tipos de fermentación utilizados en cervecería	19
1.8. Efecto Crabtree.....	20
1.9. Biosíntesis de glicerol	22
1.10. Biosíntesis de glucógeno	22
1.11. Ciclo del ácido cítrico	23
1.12. Productos del metabolismo de la levadura que generan sabores y aromas en la cerveza.....	23
1.13. Tipos de levaduras cerveceras	26
1.14 . Levaduras silvestres	28
2. Antecedentes.....	30
3. Justificación	34
4. Hipótesis	35
5. Objetivos de la investigación.....	35
5.1. Objetivo general.....	35
5.2. Objetivos específicos	35
6. Materiales y métodos	36
6.1. Recolección de muestras.....	36
6.2. Aislamiento de levaduras a partir de piña, ciruela y maguey espadín.....	31
6.3. Aislamiento de levaduras a partir de pulque	42
6.4. Aislamiento de levaduras a partir de hongos	42
6.5. Caracterización micro y macroscópica.....	44
6.6. Conservación de las levaduras silvestres	44

6.7. Pruebas bioquímicas.....	45
6.7.1. Asimilación de urea.....	45
6.7.2. Asimilación y fermentación de carbohidratos.....	45
6.8. Prueba de ascosporas.....	47
6.9. Prueba de tolerancia al etanol.....	47
6.10. Prueba de tolerancia a bajos valores de pH.....	48
6.11. Pruebas de termotolerancia.....	48
6.12. Montaje de atenuación de azúcares de la malta.....	49
6.13. Cepas tipo.....	50
7. Resultados y discusión.....	52
7.1. Aislamiento de cepas.....	52
7.2. Análisis por morfología de colonia y microscopía.....	54
7.3. Pruebas bioquímicas.....	57
7.4. Análisis de perfiles bioquímicos por índice Jaccard.....	63
7.5. Prueba de ascosporas.....	63
7.6. Prueba de tolerancia a etanol.....	67
7.7. Tolerancia a valores de pH bajos.....	68
7.8. Pruebas de termotolerancia.....	70
7.9. Análisis del potencial mediante el índice Jaccard.....	71
7.10. Microfermentación con azúcares de malta.....	72
7.11. Discusión.....	73
8. Conclusiones.....	79
9. Bibliografía.....	80
Anexos.....	88
Anexo 1: Aislamientos.....	88
Anexo 2: Pruebas bioquímicas.....	93
Anexo 3: Pruebas de tolerancia.....	103
Anexo 4: Medios de cultivo.....	110
Anexo 5: Procesamiento de muestras.....	113
Anexo 6: Fichas técnicas.....	117

1. Introducción

Las levaduras son hongos microscópicos, unicelulares de gran importancia para la humanidad desde hace mucho tiempo. Esto se debe principalmente a su capacidad de realizar el proceso de fermentación, en el cual utilizan los azúcares de un sustrato como alimento que les permite obtener energía para su crecimiento y su reproducción. En condiciones de ausencia de oxígeno, durante el proceso se liberan mayoritariamente sustancias como etanol y dióxido de carbono. Estos microorganismos han sido utilizados por el hombre para producir una gran variedad de alimentos y bebidas fermentados. En la actualidad las levaduras siguen siendo muy utilizadas en fermentaciones desde procesos de tipo artesanal hasta escalas industriales. Además se ha podido diversificar su uso para obtener otros productos como combustibles alternativos (bioetanol) e inclusive para la producción de moléculas heterólogas de gran importancia para la salud, como la insulina humana, vacunas contra la hepatitis y contra el virus del papiloma humano (Steensels *et al.*, 2014).

La mayoría de estas producciones dependen de la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae*. Estos microorganismos se pueden encontrar en muy diversos hábitats debido a que sólo necesitan una fuente de carbono, como algún azúcar simple, que es base de su alimentación y adicionalmente una fuente de nitrógeno. Presentan características particulares de acuerdo al ecosistema de donde provienen tales como tolerancia a determinadas temperaturas, a distintos niveles de humedad, asimilación y fermentación de varios azúcares, etc. Las levaduras adecuadamente elegidas son las que comunican un sabor y aromas especiales durante la elaboración de bebidas fermentadas. Esto es importante porque son ellas las que definen las características únicas de cada estilo y tipo de bebida (Sicard y Legras, 2011). Las levaduras utilizadas para fermentaciones deben cumplir con una serie de particularidades como el ser tolerantes al alcohol, ser capaces de asimilar y fermentar los azúcares que se encuentran en el medio, tolerar pH bajo, mostrar estabilidad genética y formar flóculos que permiten separar los productos del resto de las células de levadura (Lentz, *et al.* 2014).

1.1. Avances científicos en las levaduras a lo largo de la historia

Las levaduras han sido utilizadas por el hombre desde hace varios milenios antes de Cristo como agentes de fermentación para producir alimentos y bebidas de una manera empírica. Una de las primeras bebidas fermentadas elaboradas por el ser humano es la cerveza. Según estudios arqueológicos sus primeros indicios de producción ocurrieron en China desde 7000 A.C. (Bai et al, 2004), pero hay evidencia fuerte de que las primeras "cervezas" se produjeron en los 9000 a.C. durante la Revolución Neolítica (Hornsey, 2004) cuando la humanidad dejó el nomadismo por una vida más estable. Esta nueva forma de vida trae la aparición de la agricultura y el almacenamiento de sus productos. Es probable, que los graneros naturales produjeran las primeras fermentaciones de granos obteniendo una bebida parecida a la cerveza. La producción de bebidas fermentadas como la cerveza continuó en crecimiento a lo largo de la historia, pero seguía sin conocerse el agente que llevaba a cabo el proceso y fue hasta el siglo XVII que Antonie Van Leeuwenhoek el "padre de la microbiología" observó por primera ocasión a los microorganismos responsables en muestras de vino, a través del microscopio llamándolos "animálculos" (Stewart, 2017). Posteriormente Charles Cagniard en 1838 reportó que la levadura era responsable del proceso de fermentación alcohólica (Rank *et al.*, 1983). En este mismo año el botánico Franz Meyen designó como *Saccharomyces cerevisiae* a la levadura de cerveza basándose en observaciones microscópicas, evidenciando la formación de ascosporas y su gemación. Fue hasta la década de 1890 cuando Emil Fischer describe la utilización de azúcares por la levadura (Stewart, 2017).

Los estudios sobre levaduras continuaron con la descripción del ciclo de vida, por el científico Øjvind Wingë quien se dedicó al estudio y comprensión de los estadios haploide y diploide. Mediante estos logros se comprende y describe el ciclo sexual de la levadura, identificando dos fenotipos sexuales denominados MAT a y MAT α . Posterior a este gran avance, Louis Pasteur en 1871 realizó estudios donde demostró que la fermentación era producto de organismos vivos, además trabajo sobre problemáticas de la industria cervecera donde reportó contaminaciones en cervezas dañadas y se dio a la tarea de idear un método para mantener la inocuidad

de la cerveza. Él concluyó que debía hacerse una mejora en cuanto a las condiciones de elaboración de la cerveza ya que en este caso no podría utilizarse el proceso de pasteurización. Esto debido a que los componentes de sabor de la cerveza se ven afectados por este proceso (Pasteur, 1873). Para 1897 Eduard Buchner, descubrió que el extracto de las levaduras molidas con albumina tenía la capacidad de fermentar soluciones azucaradas.

Posteriormente a finales del siglo XIX Emil Christian Hansen al percatarse que en muchas fermentaciones un contaminante común eran otras levaduras silvestres, utilizó diluciones en serie para separar células de levadura basándose en su morfología. De esta manera logró obtener cepas puras de levadura lager y mostró que los diferentes cultivos puros de fondo dieron lugar a una única y reproducible producción industrial, esta cepa denominada *Saccharomyces pastorianus* es muy utilizada hoy en día para la fabricación de cerveza lager (Rank *et al.*, 1988) (Stewart, 2017). Por último, Horace Brown identificó bacterias contaminantes y levaduras silvestres en fermentación de mosto y caracterizó sus efectos sobre la levadura de cerveza en el mosto como cambios en el sabor estabilidad y potabilidad de la cerveza. También demostró la importancia del oxígeno en la fermentación y continuó con estudios sobre lavado de células de levadura con ácido para eliminar contaminantes bacterianos (Brown, 1916).

Los estudios sobre las levaduras de cerveza continúan a lo largo del siglo XX en laboratorios de investigación cervecera, institutos como el Centro de Investigación Carlsberg, Campden BRI y el VTT en Helsinki, Finlandia, en la Universidad Heriot Watt, en la Universidad de California Davis, en la Universidad de Tecnología de Berlín, en la Universidad Técnica de Munich en Weihenstephan, en la Universidad de Lovaina, en la Universidad de Abertay, y en la Universidad de Nottingham. Hoy en día, los focos de la investigación de levadura de cerveza están en Alemania, Bélgica, Finlandia, Japón y China (Stewart, 2017).

Los estudios realizados a lo largo de este tiempo han permitido llegar hasta el conocimiento que tenemos actualmente sobre levaduras y sobre la producción de otros insumos que generan las levaduras en especial las del género *S. cerevisiae*.

Llevando a la evolución en los sistemas fermentación. La investigación que se ha realizado alrededor del mundo que se enfoca al estudio de las levaduras para cervecería ha sido llevada a cabo en su mayoría por los países considerados como el foco de la investigación. En nuestro país las investigaciones sobre este tema son escasas, lo que abre un panorama para estudiar levaduras autóctonas que puedan tener un potencial para generar fermentaciones de este tipo.

1.2. Levadura

En la actualidad, se han registrado alrededor de 651 especies de levaduras distribuidas en diversos ambientes y áreas geográficas (Sicard y Legras, 2011). El género más representativo es *Saccharomyces*, debido en gran medida por el su potencial biotecnológico. El grupo “*Saccharomyces sensu stricto*” se compone de nueve especies de levaduras biológicamente distintas. Este complejo se compone por las especies *Saccharomyces cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. uvarum*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. arborícola*, *S. eubayanus*, *S. pastorianus*, *S. bayanus* (los últimos dos son híbridos naturales) y la especie más recientemente agregada *Saccharomyces jurei* (Figura 1, Naseeb *et al.*, 2017). La especie *S. bayanus* y *S. pastorianus* participan en la fermentación de cerveza lager, mientras que *S. uvarum* se ha aislado de las fermentaciones de vino y sidra (Sicard y Legras, 2011), la levadura *S. paradoxus* ha sido reportada en cervezas de fermentación espontánea (Osburn *et al.*, 2016). Algunas de estas especies como *S. mikatae* y *S. kudriavzevii* han sido hibridadas con *S. cerevisiae* para generar nuevas levaduras productoras de vino que pueden brindar una gama de sabores más compleja a los vinos (Peris *et al.*, 2018); Bellon *et al.*, 2013). La especie *S. paradoxus* ha sido utilizada para hibridaciones también, buscando características para producción de cerveza lager con nuevos perfiles de sabor (Nikulin *et al.*, 2018). Las hibridaciones entre especies del complejo sensitivo y la variación de la ploidía han ocurrido muchas veces y han participado en la evolución de la levadura domesticada (Sicard y Legras, 2011).

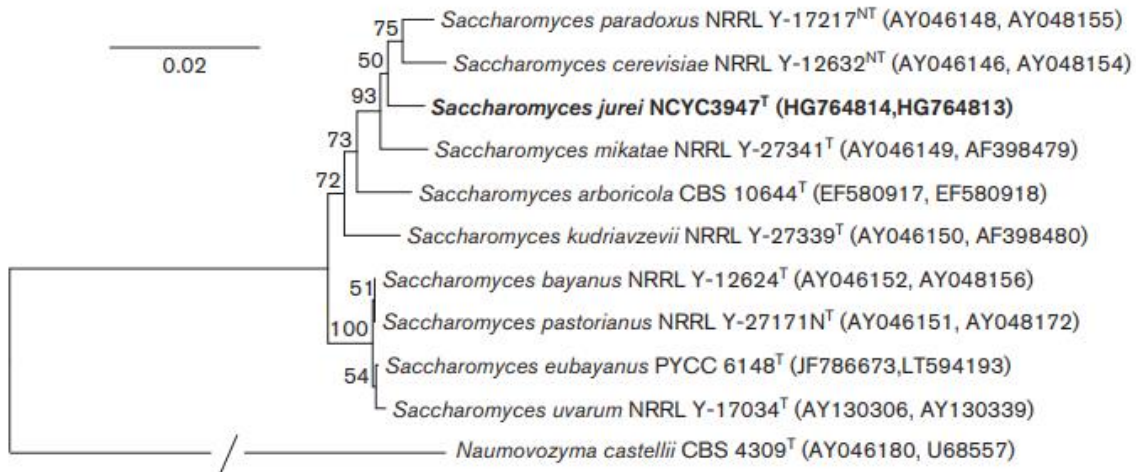


Figura 1. Relaciones filogenéticas entre *Saccharomyces*. Se utilizaron secuencias combinadas de las regiones LSU D1 / D2 e ITS (incluido el ARNr 5.8S) de *Saccharomyces jurei* sp. nov. y sus parientes más cercanos. Los nombres de las especies van seguidos de los números de acceso de la cepa CBS, NCYC, NRRL o PYCC y, respectivamente, los números de acceso de EMBL / GenBank para las regiones ITS y LSU D1 / D2. Se usó *Naumovozyma castellii* como la especie de grupo externo para el análisis. Los valores de Bootstrap de > 50%, determinados a partir de 1000 réplicas, se muestran en los nodos de rama. Barra, 2 sustituciones de base por 100 nt. (Naseeb *et al.* 2017)

1.3. Morfología

Las levaduras son hongos microscópicos unicelulares que suelen tener forma oval, esférica, de un limón o un puro y se dividen por gemación. Mediante una microscopía simple solamente se logran observar a la célula rodeada por una pared y en su interior pueden distinguirse muy pocos orgánulos, salvo una o más vacuolas (Hough, 1990). En general una célula de levadura completamente desarrollada de forma ovoide puede medir alrededor de 5 a 10 μm de diámetro (Pires y Brányik, 2015).

Las levaduras se reproducen vegetativamente por gemación. Este proceso les permite multiplicarse en poco tiempo cuando cuentan con un medio rico en nutrientes y con una temperatura adecuada. Una sola célula puede dar lugar a 30 gemas o más a lo largo de su vida.

La gemación comienza con la formación de una profusión del citoplasma en una zona debilitada de la pared, donde de inmediato se provee de pared comenzando a formar un brote o gema. Los orgánulos de la célula madre, incluido un núcleo, van emigrando a la gema a medida que crece. Por último, la gema alcanza su tamaño definitivo y tiende a separarse, aunque no implica

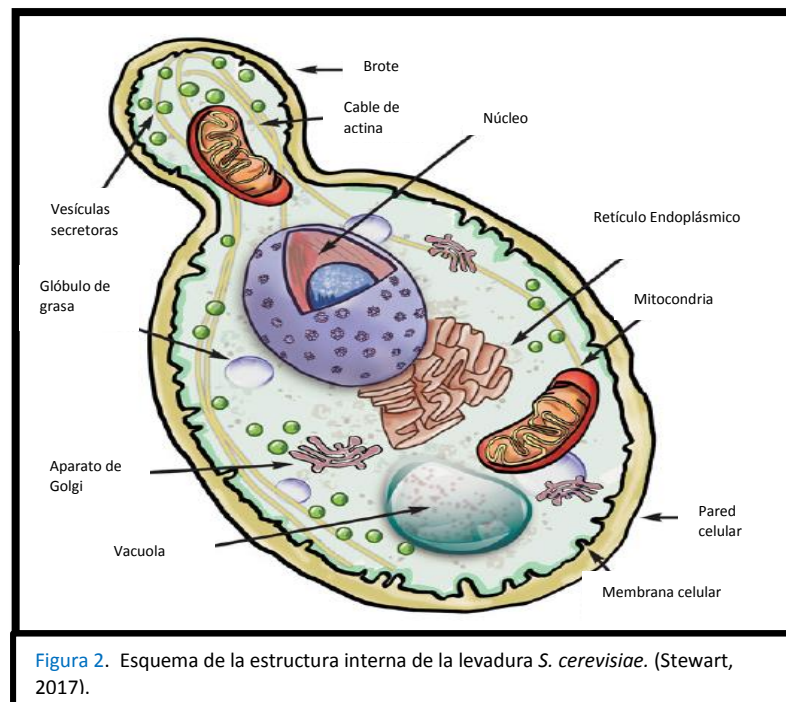
necesariamente su separación de la célula madre, ya que es bastante frecuente encontrar largas cadenas de levaduras, debido a la no disyunción de las distintas células formadas.

Las cepas pueden mantenerse estables como haploides durante algunas generaciones a las que se denominan heterotálicas, pero algunas otras pueden realizar una reproducción de tipo sexual por conversión génica al fusionar sus núcleos células de diferente carácter sexual (a o α) y formar células diploides llamadas homotálicas. (Mortimer *et al.*, 1994). Durante el ciclo de vida de *S. cerevisiae*, las células pueden existir tanto en un estado haploide como diploide. Las células diploides son heterocigóticas para el locus del tipo de apareamiento (tipo de apareamiento a o α), lo que hace que los diploides sean incapaces de aparearse con alguno de su mismo locus de apareamiento. Las células haploides tienen un tipo de gen de apareamiento a o α y pueden aparearse con una célula del tipo de apareamiento opuesto. En condiciones ricas en nutrientes, tanto las células haploides como las diploides pueden proliferar asexualmente, por gemación. Cuando se exponen a condiciones de escasez de nutrientes los diploides pueden experimentar esporulación (meiosis seguida de formación de esporas), lo que resulta en la conversión de una célula diploide en cuatro esporas haploides, dos de tipo a y dos α , que pueden germinar en células haploides cuando las condiciones mejoran. (Steensels *et al.*, 2014).

En la levadura de cerveza las ascosporas no logran separarse debido a que se funden rápidamente dentro del asca, produciendo nuevamente la condición diploide antes de que el asca se abra. Es necesario separar físicamente las esporas para poder obtener células haploides.

La célula contiene en su interior una serie de orgánulos unidos a la membrana los cuales son: núcleo, vacuolas, mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, vesículas secretoras, glóbulos de grasa y filamentos de actina (Figura 2). El exterior de la célula está constituido por una pared celular y una membrana plasmática con un espacio, el periplasma, entre los dos (Arnold, 1991).

El citoplasma de la levadura se halla envuelto por una membrana viva, el plasmalema o membrana celular que no sólo recubre al citoplasma, sino que se ramifica uniéndose a la red membranosa interna. Estas estructuras están constituidas por lípidos, entre ellos fosfolípidos, esteroides y proteínas y juegan un papel importante en la regulación del flujo de todos los elementos necesarios para la levadura, tanto hacia afuera como al interior de la célula.



El núcleo de las células de levadura tiene un tamaño aproximado de 1.5 μm y está rodeado por una doble membrana y en su interior alberga una zona densa en forma de media luna denominada nucléolo. Una levadura haploide contiene 16 cromosomas variando en tamaño de 200 a 2200 Kb, en los cuales, como resultado del análisis de la secuencia de su genoma, se han localizado un total de 6183

marcos de lectura abiertos (ORF). A diferencia de los genomas de organismos multicelulares, el genoma de la levadura es muy compacto, dado que el 72% de la secuencia corresponde a secuencias codificantes. El tamaño promedio de los genes de levadura es de 1.45 kb, o 483 codones, y solamente el 3.8% de los ORFs contienen intrones. Aproximadamente el 30% de los genes se han caracterizado experimentalmente. Del 70% restante, cuya función no se conoce, aproximadamente la mitad contiene al menos un motivo de algún tipo de proteínas ya caracterizadas, o corresponden a genes que codifican para proteínas estructuralmente relacionadas con productos génicos ya conocidos en levaduras o en otros organismos. El ARN ribosomal se encuentra codificado por 120 copias repetidas y arregladas en tándem en el cromosoma, en tanto que existen 262 genes que codifican para ARNs de transferencia, 80 de los cuales poseen intrones. Los cromosomas contienen elementos movibles, retrotransposones, que varían en número y posición en las diferentes cepas de *S. cerevisiae*, aun cuando la mayoría de las cepas de laboratorio poseen aproximadamente 30 elementos. (Valenzuela, 2019)

Las células de levadura en crecimiento rápido por lo regular tienen varias vacuolas, pero al madurar se quedan sólo con una.

Cuando las levaduras crecen en condiciones aeróbicas y en especial si la concentración de glucosa es escasa se pueden observar las mitocondrias, estos orgánulos rodeados por una doble capa contienen citocromos y enzimas implicadas en la producción de ATP (Hough, 1990)

La pared celular es permeada por algunas enzimas segregadas por la levadura. La más importante es la hidrolasa que actúa en la sacarosa antes de que pueda entrar a la célula, también se segregan fosfatasas. La secreción de enzimas es una característica que nos permite diferenciar especies, por ejemplo, *Saccharomyces carlsbergensis* genera melibiasa a comparación de *S. cerevisiae* que no lo hace.

1.4. Importancia de la pared celular en la fermentación

La pared celular de la levadura es un orgánulo dinámico que determina la forma de la célula y mantiene la Integridad del organismo durante el crecimiento y división celular. Debe proporcionar a la célula la suficiente resistencia mecánica para soportar cambios en la presión osmótica del medio ambiente (Gibson *et al.* 2007; Dague *et al.* 2010) y dar protección a la célula de las tensiones mecánicas impuestas por técnicas usadas sobre un cultivo, como la centrifugación (Chlup *et al.*, 2007) y estrés durante el almacenamiento entre fermentaciones (Stoupis *et al.*, 2002). La pared celular no es estática, y debe evolucionar, dependiendo de las condiciones de crecimiento, desarrollo morfológico y como respuesta a cambios en las condiciones ambientales. El daño de la pared celular puede ser inducido por una serie de parámetros, por ejemplo, compuestos que perturban las paredes, como cafeína o dodecilsulfato de sodio (SDS), enzimas como la zimoliasa, mutaciones en los genes relacionados con la pared y agitación mecánica (Stoupis *et al.*, 2002; Heinisch, 2005; Chlup y Stewart, 2011).

La composición química básica de la pared celular de *S. cerevisiae* contiene tres componentes principales los β -glucanos (formados por enlaces 1,3- y 1,6- β -) que representan el 50-60% de la masa de la pared celular y manoproteínas (proteínas altamente O- o N- glicosiladas y residuos de manosa unidos por enlaces 1,2, -1,3, 1,4 y 1,6- α), que representan el 40-50%. Un tercer componente es la quitina, que es sintetizado por 1,4- β -N-acetilglucosamina, el cual se encuentra en bajas cantidades (1–3% de la masa de la pared celular) en comparación con los glucanos y manosas.

Las manoproteínas tienen funciones de gran importancia para la levadura como son:

1. Estabilización de las condiciones osmóticas internas, controlando la entrada de agua al interior de la célula.
2. Protección contra estrés físico, debido a que la membrana posee una resistencia mecánica y elasticidad suficiente para soportar presiones físicas (Morris *et al.* 1986).
3. Mantenimiento de la forma celular.

4. Soportan polisacáridos como glicoproteínas que ayudan a tolerar el estrés en procesos de cervecería y destilería (Osumi, 1998; De Nobel *et al.* 1990).

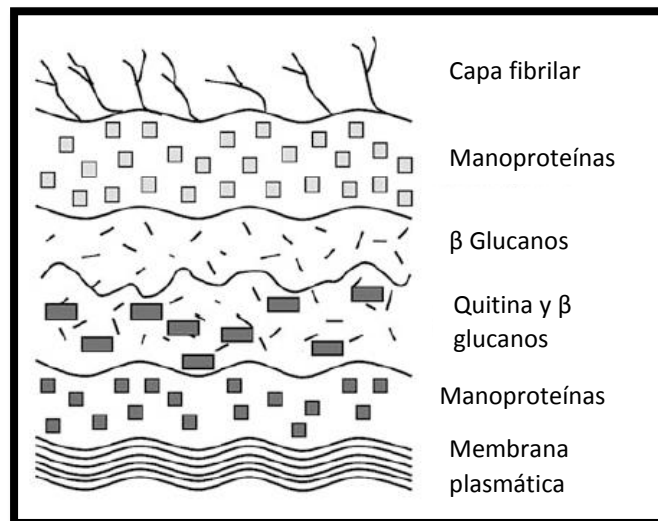


Figura 3. Diagrama de la arquitectura de la pared celular, describe como se encuentran ordenados los componentes de la pared celular (Stewart, 2017)

Las diferencias existentes entre la estructura química de las capas exteriores de las células de levadura son las responsables de que algunas cepas suban a la superficie durante el proceso fermentativo. A estas levaduras se les conoce como de fermentación alta y contrastan con las de fermentación baja, que se hunden y tienden a depositarse en la base del fermentador. (Lewandowski, 2015).

1.5. Metabolismo aerobio y anaerobio

Las levaduras obtienen energía para realizar procesos biológicos tales como la reproducción y mantenimiento a través de una serie de reacciones enzimáticas que metabolizan carbohidratos utilizando como vía principal el glucolisis la cual puede concluir en una vía fermentativa o de respiración. La vía fermentativa se lleva a cabo en ausencia de oxígeno y se obtienen como productos finales principalmente dióxido de carbono (CO_2) y etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$). La gran ventaja de la fermentación es la supresión de microorganismos que compiten por la fuente de alimento al producir etanol, además el etanol después de proporcionar la ventaja competitiva

puede ser utilizado por la levadura como fuente de energía y carbono (cambio diaúxico)((Pires y Brányik, 2015).

La fermentación alcohólica comienza con la descomposición de la glucosa en el citoplasma en una serie de reacciones que finalmente producen dos moléculas del metabolito central piruvato. Esta vía metabólica se conoce como glucólisis y puede observarse en la figura 4. El siguiente paso hacia la formación de etanol es la descarboxilación de piruvato para formar acetaldehído y CO₂ catalizado por la enzima piruvato descarboxilasa (PDC). La actividad de PDC depende de la ayuda de las coenzimas pirofosfato de tiamina (TPP) y magnesio (Kutter et al. 2009). El etanol se forma adicionalmente a través de la reducción del acetaldehído realizado por alcohol deshidrogenasas.

A lo largo de la fermentación, el pico de actividad de PDC en la levadura se alcanza en la fase de crecimiento exponencial y disminuye cuando se agota la glucosa (Weusthuis *et al.* 1994; Assis *et al.* 2013). La PDC se activa por fosforilación cuando la levadura está expuesta a altos niveles de glucosa.

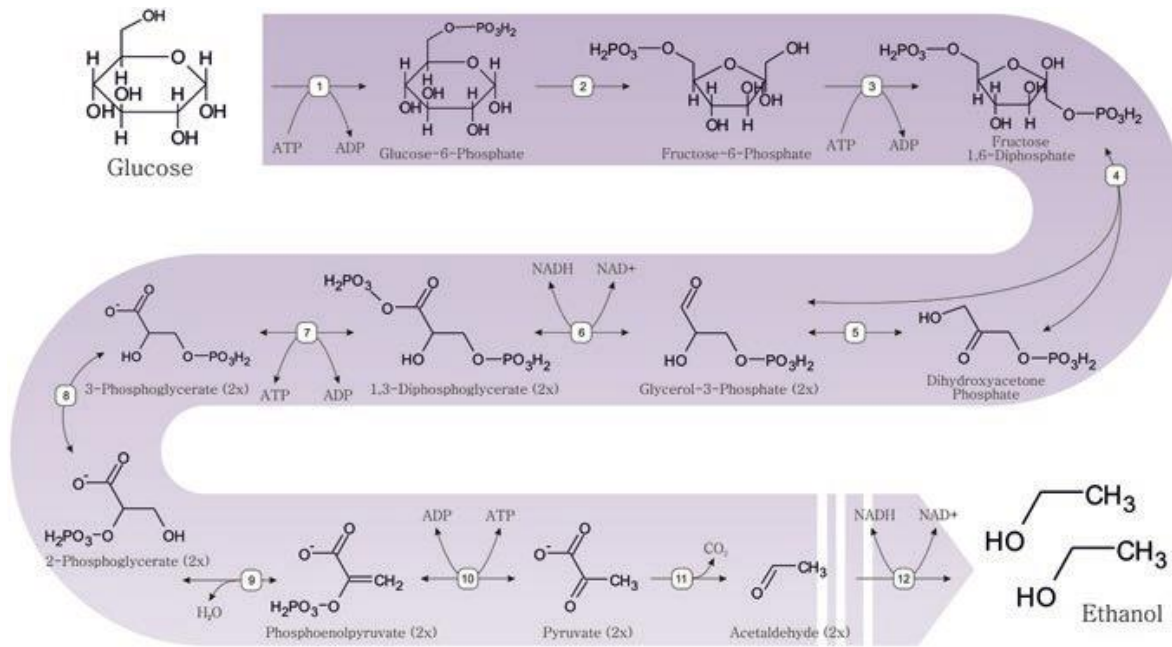


Figura 4. Diagrama de la fermentación alcohólica realizada por levadura a través de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (el tipo más común de glucólisis). Dentro de la célula de levadura, la glucosa es fosforilada por (1) hexocinas, que utiliza el fosfato de ATP. Glucosa-6 fosfato entra en la cadena glucolítica que finalmente la convertirá en dos moléculas de piruvato, a través de la acción de (2) glucosa-6-fosfato isomerasa; (3) 6-fosfofructoquinasa; (4) aldolasa difosfato de fructosa; (5) triosa-fosfato isomerasa (convierte el intermedio dihidroxiacetona fosfato en glicerol-3-fosfato); (6) gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; (7) fosfoglicerato quinasa; (8) fosfoglicerato mutase; (9) fosfopiruvato hidratasa; (10) piruvato quinasa. El piruvato se descarboxila adicionalmente mediante (11) piruvato descarboxilasa, liberando CO_2 y formando acetaldehído, que luego se reduce con (12) alcohol deshidrogenasa a etanol. El producto neto de la fermentación alcohólica a partir de 1 mol de glucosa es entonces 2 mol de CO_2 ; 2 mol de ATP; y 2 mol de etanol.

La levadura de cerveza es capaz de producir y degradar el etanol a través de la acción de las deshidrogenasas de alcohol ADH1 y ADH2, respectivamente. El primero está codificado de manera constitutiva por el gen *ADH1*, mientras que el gen *ADH2* sólo se activa cuando los niveles de azúcar descienden, por ejemplo, al final de la fermentación primaria de la cerveza (Wills, 1976). Ambas enzimas tienen un ancestro común llamado *ADHA* que ha sido clonado por Thomson y colaboradores en el 2005. Los autores demostraron que la contraparte ancestral fue optimizada sólo para producir, nunca para consumir etanol. Esto es consistente con la hipótesis de que *ADHA* se preparó originalmente para reciclar el NADH generado en la ruta glucolítica. Se cree que la necesidad de desarrollar dos homólogos con funciones divergentes coincide con la aparición de frutas jugosas en la era cretácica (Thomson *et al.* 2005). Estas observaciones sólo refuerzan la discusión evolutiva

temprana sobre la producción de etanol para deshacerse de microorganismos competidores.

Para fines industriales, ADH1 es claramente la enzima de mayor interés y por lo tanto es la más estudiada. La enzima ADH1 es una proteína tetramérica que contiene cuatro subunidades idénticas con 347 aminoácidos (Bennetzen y Hall, 1982). Cada una de estas subunidades ha sido demostrada por Raj y colaboradores en el 2014, por poseer dos entidades de zinc: uno es catalítico, y el otro es estructural. En la fermentación de la cerveza, el nivel de expresión de ADH1 se ha relacionado directamente con la concentración inicial de azúcar y la temperatura de fermentación. Entre varios genes probados, ADH1 tiene la mayor expresión en condiciones de fermentación (Saerens *et al.* 2008).

1.6. Floculación

La floculación consiste en el agrupamiento de células de levadura e implica la unión de proteínas de tipo lectina a los receptores de manoproteínas, promovidas por los iones de calcio. La hidrofobicidad de la superficie de la célula también es importante, y esto puede relacionarse con la tendencia de los agregados celulares a migrar a la superficie de un fermentador (levadura de fermentación superior) (Daenen *et al.*, 2008). Aparte de la mayor hidrofobicidad superficial de las levaduras altas, las diferencias fundamentales entre ambos tipos se refieren a la temperatura de fermentación y propiedades de sabor y aroma de la cerveza producida. Las levaduras altas operan generalmente en el intervalo de temperaturas 15-22 °C y las bajas en el 8-15 °C. La fermentación llevada a cabo próximo al límite superior de intervalo de temperatura es más rápida cuando se emplea levaduras de fermentación alta.

La floculación es posible debido a una mayor cantidad de lípidos de membrana de carácter hidrofóbico y el papel más importante se lleva a cabo por la unión de manoproteínas con proteínas de tipo lectinas que permiten que las células se unan y puedan conglomerarse. Esto es activado por iones de calcio en el medio y permite que al estar unidas las células atrapen burbujas de dióxido de carbono

(CO₂) y de esta forma pueden permanecer en la superficie del fermentador en forma de espuma. Este mecanismo es regulado por una serie de genes llamados FLO que confieren esta capacidad a las levaduras de fermentación alta (Steward, 2017).

1.7. Tipos de fermentación utilizados en cervecería

La fermentación de azúcares de mostos es un proceso vital en la elaboración de alimentos y bebidas. En el caso particular de la producción de cerveza se utilizan dos tipos de fermentación, dadas por el tipo de levadura: Una es la de tipo lager (Baja fermentación) y el otro tipo Ale (Alta fermentación).

En el tipo Ale, las levaduras permanecen en la parte superior del fermentador durante el proceso, brindan al producto final aromas y sabores frutados característicos y muy perceptibles (Brown *et al.*, 1989). La fermentación de esta categoría de levadura se produce en un rango de temperaturas que varía entre 16 y 20 °C. Estas cepas permiten el consumo con un corto período de maduración.

El estilo lager en cambio, realiza una fermentación más lenta, a bajas temperaturas (10 a 12 °C) y las levaduras se mantienen en el fondo del fermentador. En esta fermentación el lúpulo y la cebada malteada dominan los aromas de la cerveza además de que aportan un aspecto visual más limpio. En este tipo de fermentaciones los aromas y sabores que produce la levadura no son tan perceptibles (De Clerk, 1957). Su producción en condiciones óptimas requiere de una larga maduración a bajas temperaturas, lo que hace indispensable el uso de cámaras de frío.

Hoy en día las cervecerías más grandes e industrializadas por lo general producen cerveza de tipo lager y las cervecerías más pequeñas producen de tipo Ale debido a que es más fácil mantener las condiciones óptimas de fermentación de este tipo de levaduras. Sin embargo, ambos estilos pueden hacerse a escalas artesanales e industriales (Lewandowski, 2015). Las fermentaciones de tipo Ale son realizadas principalmente por cepas de *Sacharomyces cerevisiae* (Hornesey, 2003), mientras que las de tipo lager son realizadas principalmente por levaduras híbridas de *S. cerevisiae* y *S. eubayanus* como la cepas *S. pastorianus* (Libkind

et al., 2011). En la actualidad hay una gran diversidad de levaduras utilizadas para la producción de cerveza, las cuales tienen varias características, que determinan el estilo de cerveza que pueden producir, desde cerveza Lager o Ale hasta estilos especiales (Sicard y Legras, 2011).

1.8. Crabtree

La mayoría de levaduras como *S. cerevisiae* realizan el proceso de obtención de energía a partir de la fermentación alcohólica, para obtener como productos finales etanol, dióxido de carbono en forma de gas y moléculas de ATP (Adenosín trifosfato) que es utilizado por estos microorganismos en su metabolismo celular energético. El género *Saccharomyces* junto con otros más, son fermentadores enérgicos de azúcares bajo condiciones anaeróbicas (Hough, 2002). Curiosamente, esto también puede ocurrir en presencia de oxígeno cuando hay una alta concentración de carbohidratos debido a que un circuito de "represión de glucosa" que reprime la parte respiratoria en presencia de glucosa. La aparición de la fermentación en condiciones aeróbicas se denomina efecto Crabtree y las levaduras que presentan esta peculiaridad se denominan levaduras positivas para Crabtree. Después del agotamiento de la glucosa y la acumulación de etanol, el metabolismo de la levadura positiva de Crabtree cambia en presencia de oxígeno y el etanol se convierte en un sustrato que se degrada y se lleva a cabo respiración (Figura 4). El cambio del metabolismo de la producción de etanol a través de la fermentación al consumo de etanol a través del proceso de respiración se conoce como el cambio diaúxico. Este cambio requiere varios elementos, incluidas las enzimas alcohol deshidrogenasa (ADH). En *S. cerevisiae*, se ha demostrado que ADH1 es predominantemente responsable de la producción de etanol, mientras que ADH 2 utiliza preferentemente al etanol como sustrato produciendo acetaldehído (Sicard y Legras, 2011)

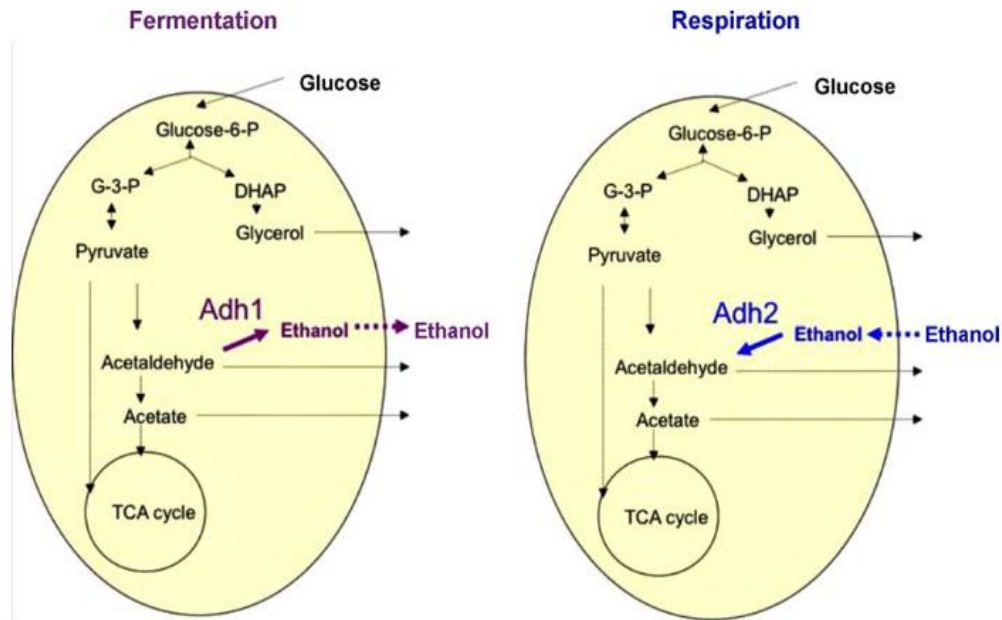


Figura 4. Metabolismo de obtención de energía en condiciones aerobias (Respiración) y anaerobias (Fermentación) de *S. cerevisiae*. (Sicard y Legras, 2011)

Mediante la respiración y la fermentación la levadura obtiene energía potencial para su supervivencia y reproducción. Del mismo modo este organismo genera principalmente etanol que actúa como aceptor final de electrones para obtención de energía en fermentación y como sustrato en respiración. Sin embargo, no es el único compuesto producido durante los procesos de obtención de energía, es destacable mencionar que en el metabolismo de la levadura es bastante complejo y se excretan otros componentes químicos al exterior de la célula. Éstos proceden de precursores químicos que se sintetizan en la glucólisis y ciclo de Krebs principalmente, además de otras vías metabólicas alternas (Figura 6). Estos compuestos son de gran importancia para algunas bebidas como la cerveza debido a que le comunican sabores y aromas únicos.

La liberación de estos compuestos al exterior de la célula es lo que otorga ciertos perfiles de sabor en estilos de cerveza. Algunos compuestos son indeseables para ciertos estilos, sin embargo, son característicos de otros como el sulfuro de dimetilo (DMS). Algunos otros compuestos aromáticos como aldehídos y

ésteres otorgan notas indispensables para ciertos estilos de cerveza (Bokulich y Bamforth, 2013).

1.9. Biosíntesis de glicerol

El glicerol es un subproducto de la glucólisis de *S. cerevisiae* (Kutyna *et al.* 2012; Vijaikishore y Karanth 1987) y es de gran importancia para la cerveza otorgándole cuerpo a esta bebida. Una cerveza con aproximadamente el 5% (v / v) de etanol, contendrá aproximadamente 0.2% (v / v) de glicerol (Stewart, 2014). Este compuesto se forma por la reducción de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a glicerol. En esta reacción se oxida nicotidamida adenin dinucleótido (NADH) a NAD + por la enzima glicerol deshidrogenasa (Bisping y Rehm 1986; Bisping *et al.* 1990; Cronwright *et al.* 2002). El glicerol 3-fosfato se desfosforila a glicerol por la enzima glicerol 3-fosfatasa, liberando fosfato inorgánico. Se cree ampliamente que las células de levadura producen glicerol para mantener un estado redox citosólico propicio para sostener el catabolismo glucolítico (Nordstrom, 1966).

1.10. Biosíntesis de glucógeno

El glucógeno es el hidrato de carbono intracelular principal en las células de levadura. Este polisacárido representa la principal forma de almacenamiento intracelular de glucosa, formando una reserva de energía que puede ser movilizad rápidamente para cumplir con un requerimiento repentino de glucosa.

Uno de los factores que afectará la tasa de fermentación del mosto de cervecería es la condición bajo la cual se almacena el cultivo de levadura entre fermentaciones. El glucógeno sirve como fuente de energía bioquímica durante la fase lag de la fermentación, cuando la demanda de energía es intensa para la síntesis de compuestos tales como esteroides y ácidos grasos insaturados requeridos por la membrana celular (Quain *et al.*, 1981). En consecuencia, es importante que los niveles apropiados de glucógeno celular sean mantenidos durante el almacenamiento de las levaduras.

1.11. Ciclo del ácido cítrico

El ciclo del ácido cítrico (Lowenstein, 1969) es básicamente una serie de reacciones químicas utilizadas por organismos aeróbicos (incluida la levadura) para generar energía a través de la oxidación de acetyl-CoA derivado de carbohidratos, grasas y proteínas en dióxido de carbono y energía química. Además, el ciclo proporciona precursores para ciertos aminoácidos y para el agente reductor NADH, que se utiliza en numerosas otras reacciones bioquímicas (Stewart, 2017).

1.12. Productos del metabolismo de la levadura que generan sabores y aromas en la cerveza.

Durante la fermentación, la levadura excreta una gama de moléculas, además de etanol y CO_2 , que pueden afectar el sabor del producto. Se ha argumentado que la vasta mayoría de levaduras para cervecería no difieren mucho en sus componentes genéticos que producen componentes de sabor únicos. Sin embargo, existe variación entre los niveles de algunos productos, pero existen algunos tipos de levaduras de cerveza que producen sabores que no presentan otras cepas o al menos en diferente medida (Bokulich y Bamforth, 2013).

Un ejemplo son las cepas utilizadas para la producción de cerveza tipo Hefeweizen en Alemania. Éstas tienen genes que codifican para la descarboxilasa del ácido ferúlico, que convierte el ferulato derivado desde las paredes celulares de cereales en 4-vinilguaiacol, impartiendo un carácter picante parecido al clavo (Coghe S. *et al.*, 2004; Omori T. *et al.*, 1997).

Todas las cepas de elaboración producen glicerol (Klopper WJ. *Et al.* 1986; Omori T *et al.*, 1997), dicetonas vecinales (VDKs) (Inoue T *et al.*, 2008), alcoholes (Landaud S. *et al.*, 2001; Quain DE *et al.*, 1985), ésteres (Lyness CA *et al.*, 1997) ácidos grasos de cadena corta (Kirsop BH. *et al.*, 1977), ácidos orgánicos (Klopper WJ. *et al.*, 1986) y diversas sustancias que contienen azufre (Figura 6, Miracle RE. *et al.*, 2005; Walker MD *et al.*, 1993). Los niveles de cada categoría que se encuentran en la cerveza son dependientes en gran parte de la cepa, pero de igual

importancia son las condiciones precisas de fermentación que existen, incluida la velocidad de inoculación del mosto, la temperatura, la extensión de adición de oxígeno, relación C:N, la duración de la fermentación y la maduración (Boulton C, *et al*, 2001).

De especial importancia son las VDK, diacetilo y pentanediona, que proporcionan un carácter mantecoso o similar a la miel que es indeseable para la mayoría de las cervezas (Inoue T (ed). 2008). Éstos se producen durante la fermentación por la degradación no enzimática del acetolactato y acetohidrobutirato, que son intermediarios metabólicos en vías de síntesis de aminoácidos que se filtran hacia la fermentación del mosto. La levadura, sin embargo, eliminará el diacetilo y la pentanediona reduciéndolos a butanodiol y pentanodiol, respectivamente. Esto puede, sin embargo, ser un evento relativamente prolongado, dependiendo del nivel al que el cervecero busca bajar los VDKs (estos compuestos tienen un umbral de detección muy bajo, pero son detectadas con aromas parecidos a la manteca, mantequilla o azúcar caramelizada).

También como subproductos la levadura genera una gama de ésteres, de los cuales uno de los más importantes es el acetato de isoamilo, debido a que produce aromas frutales con notas a banana. Tales ésteres son producidos por la acción del enzima alcohol acetiltransferasa (AAT) en alcoholes superiores y acetil-coenzima A (acetil-CoA) (Procopio S *et al.*, 2011; Verstrepen KJ *et al.*, 2003). Un factor importante que afecta la producción de lípidos y por extensión, a la formación de ésteres es la cantidad de oxígeno y ácidos grasos insaturados en el mosto. La AAT también es responsable de la producción de tioésteres (Verstrepen KJ *et al.*, 2003) que otorgan un sabor parecido a vegetales cocidos.

Existe cierto interés en seleccionar cepas de levadura con niveles elevados de β -glucosidasa (β -G) para mejorar el aroma en cervezas de especialidad debido a que las glucosidasas en *Saccharomyces* escinden los glucósidos no volátiles derivados de lúpulos, frutas y otras plantas utilizadas en la elaboración de cerveza, separando la aglicona volátil del resto de azúcares, compuesto que es responsable de algunas tonalidades en la cerveza (Daenen L *et al.*, 2008).

La producción de dióxido de azufre (SO_2) es significativa debido este compuesto no solo tiene una contribución directa al aroma, también tiene un papel en la protección contra el deterioro del sabor, en particular eliminando las sustancias carbonílicas que se liberan en el descascarillado.

La producción de dióxido de azufre y sulfuro de hidrógeno (H_2S) son formados durante la fermentación principalmente por la cepa utilizada, la composición del mosto y las condiciones de esta. La reducción de dióxido de azufre por sulfito reductasa, sin embargo, es posible regular sus niveles de forma independiente (Pires y Brányik, 2015).

El sulfuro de dimetilo (DMS) es a menudo un contribuyente significativo en el carácter de las cervezas lager, aunque no es agradable en algunos estilos (Bamforth CW., 1982). Mientras que la mayor parte de DMS se origina a partir de la degradación térmica de un precursor (Boulton C., 2006) derivado de la malta, algunas cepas de levadura son capaces de reducir el dimetilsulfóxido que también se origina en la malta (Figura 6) (Bamforth CW., 1982). Los compuestos fenólicos generalmente producen sabor y aroma a plástico o a banditas de curación, sabores ahumados y a clavo. Estos gustos fenólicos son deseados o no dependiendo del estilo. Estos compuestos se liberan en altos niveles debido a factores como la variedad de levadura, clorofenoles en el agua, enjuague inadecuado por desinfectantes a base de cloro, un lavado excesivo del grano, un nivel de pH por encima de 6.0 o por contaminación de levaduras silvestres.

Finalmente, los ésteres producidos por la levadura son compuestos aromáticos que otorgan sabores y aromas de frutas como fresa, pomelo, plátano, frambuesa, manzana, pera y otros. Dependiendo del estilo, este puede ser un sabor deseado o uno completamente inapropiado, por lo regular las cervezas ale y cervezas de alta gravedad contienen grandes cantidades de ésteres frutales, mientras que en cervezas pilsner y lagers americanas son bajos.

Los altos niveles de estos compuestos se deben a la cepa de levadura utilizada, temperaturas de fermentación altas, algunas levaduras lager temperaturas altas y en mostos de alta gravedad (Meilgaard, 1979).

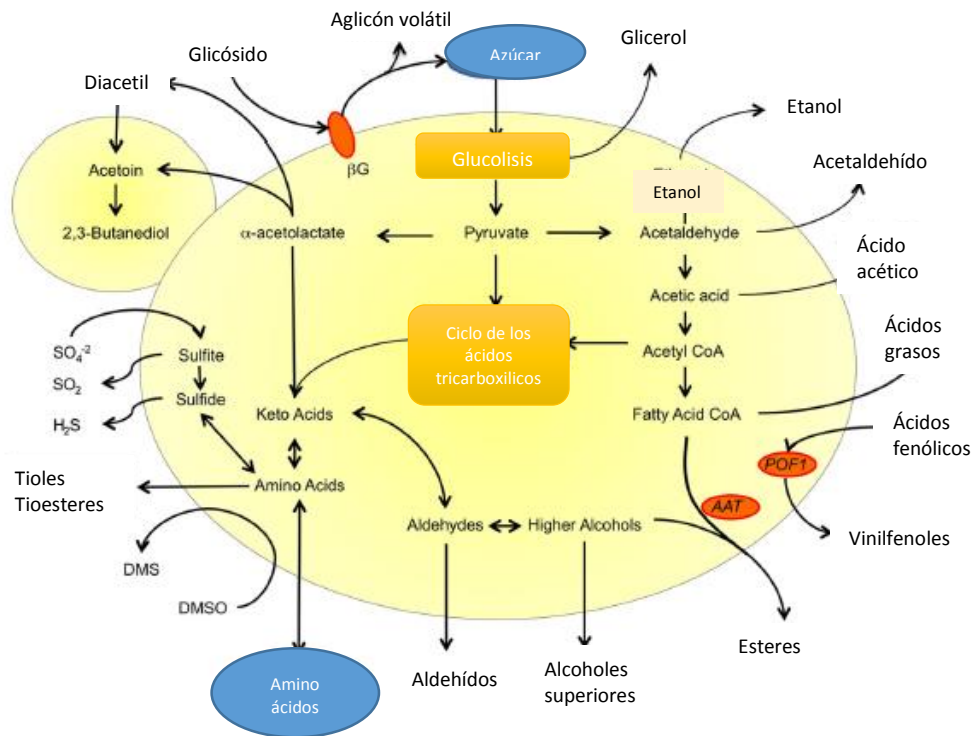


Figura 6. Resumen de las actividades metabólicas de *Saccharomyces* que influyen en la calidad de la cerveza. Este esquema simplificado resume las principales vías metabólicas vinculadas a β G, β - glicosidasa, DMS (sulfuro de dimetilo) y DMSO (dimetilsulfóxido) (Bokulich y Bamforth, 2013)

1.13. Tipos de levaduras cerveceras

Las cepas utilizadas para cervecería se dividen básicamente en dos grandes grupos debido al tipo de fermentación que realizan, las levaduras para producción de cerveza tipo ale y de tipo lager según sus características de fermentación (alta y baja). En las levaduras para cerveza tipo Ale la especie más utilizada es *Saccharomyces cerevisiae* y para las tipo lager la más utilizada es *Saccharomyces pastorianus* anteriormente llamada *S. carlbergensis* (Stewart, 2017). Recientemente se encontró una cepa de levadura que tiene características típicas de levadura lager llamada *Saccharomyces jurei* (Naseeb *et al.*, 2017).

Tabla 1. Diferencias entre levaduras Ale y lager.

Levadura Ale	Levadura Lager
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (tipo Ale)	<i>Saccharomyces pastorianus</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Tipo ale para destilería)	<i>Saccharomyces uvarum</i>
Temperatura de fermentación de 18°C a 25° C.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (tipo lager)
La célula puede crecer a más de 37°C	Fermentación a temperaturas de 8° C a 15° C.
Las células no pueden fermentar el disacárido melibiosa.	Las células no pueden crecer a más de 34° C
Cepas con morfología colonial distintiva sobre medio agar mosto.	Fermentan melibiosa
Fermentación alta	Cepas no presentan morfología colonial distintiva sobre medio agar mosto
	Fermentación baja

(Stewart, 2017)

Estos tipos de fermentación con características muy específicas permiten obtener perfiles de sabor únicos debido a que como parte del metabolismo de la levadura se liberan componentes de sabor y aroma en el mosto de cerveza. Por ejemplo, las levaduras tipo lager producen en una fermentación normal mayores cantidades de dióxido de sulfuro y más diacetilo que las de tipo ale, esto le otorga diferencias en los sabores a los dos tipos de cervezas resultantes (Stewart, 2017).

1.14 Levaduras silvestres

Para el 99% de las cervezas en el mundo, *Saccharomyces* es el único componente microbiano permitido en la elaboración de cerveza y cualquier otro microorganismo que intervenga se considera un defecto en la elaboración. Sin embargo, otras cervezas, que están ganando popularidad en todo el mundo, incorporan cepas no *Saccharomyces*, obtenidas de ambientes "naturales" que no fueron caracterizadas, o microbiota autóctona de la cervecería. Estas cepas generan productos con sabores peculiares e inusuales como las cervezas de fermentación mixta más conocidas como lambics de Bélgica y su descendencia, las "cervezas de coolship" de los Estados Unidos. La característica en común que tienen estas dos cervezas es que no son inoculadas con levaduras comerciales. En cambio, estas cervezas son fermentadas por una mezcla de levaduras y bacterias residentes de la cervecería que entran en contacto con el mosto después una exposición en un tanque abierto donde se enfría el mosto durante toda la noche. A la mañana siguiente, la cerveza se bombea a barricas de roble y se deja fermentar por un periodo de hasta 3 años antes del envasado(Stewart, 2017).

Las fermentaciones tipo Lambic y Coolship Ale exhiben períodos dominados por comunidades microbianas similares. El primer mes está dominado por enterobacterias, incluyendo *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Serratia*, y *Pectobacterium*, y levaduras no *Saccharomyces*, principalmente *Kluyveromyces* (Martens H. *et al.*, 1991; Bokulich NA, *et al* 2012) en Lambic (Van Oevelen *et al.*, 1979) y *Rhodotorula* en Coolship ale (Bokulich NA, *et al* 2012). Las enterobacterias presentes durante 1 a 2 meses producen varios compuestos responsables del aroma en las cervezas tipo lambic, incluyendo 2,3 butanodiol, acetato de etilo, alcoholes superiores, y ácidos acético, láctico y succínico (Martens H. *et al* 1992). Después de un mes, *Saccharomyces* spp. y bacterias ácido lácticas (BAL), principalmente *Pediococcus*, dominan entre los tres a 4 meses. Por último, *Brettanomyces bruxellensis* domina el resto de la fermentación y maduración (Van Oevelen *et al.*, 1979), produciendo una gama de aromas característicos incluyendo

ácidos grasos caprílico y cáprico, además de sus ésteres etílicos (Spaepen M. *et al.*, 1978; Van Oevelen D. *et al.*, 1976).

En estos estilos se sigue presentando fermentación por *Saccharomyces cerevisiae* aunque además de ésta un amplio rango de otras levaduras están involucradas, incluyendo *Meyerozyma caribbica*, *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia kluyveri*, *Kodamaea Ohmeri* (N'Guessan *et al.*, 2011), *Kluyveromyces marxianus*, *Candida melibiosica*, *Cryptococcus albidus var. albidus*, *Dekkera bruxellensis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Debaryomyces hansenii*, *Torulaspota delbrueckii* (Maoura N. *et al.*, 2005), *Candida inconspicua*, *Issatchenkia orientalis*, *Candida magnolia*, *Candida humilis* (Lyumugabe F. *et al.*, 2010), *Candida albicans*, *Dekkera anomala*, *Candida etchellsii*, *Candida kuwiensis* y *Saccharomyces pastorianus* (Kayode APP. *et al.*, 2011).

2. Antecedentes

La naturaleza, es fuente principal de microorganismos con potencial biotecnológico. En ella se encuentra una gran variedad de hábitats que permiten abrir un abanico de posibilidades para la búsqueda de estos microorganismos. No es la excepción en la búsqueda de levaduras silvestres con potencial para la producción de bebidas alcohólicas. El aislamiento y la caracterización de cepas silvestres de diferentes ambientes es el primer paso para la selección y creación de colecciones de cepas con potencial biotecnológico y de innovación. Se han realizado diversos estudios desde hace ya varias décadas donde se han aislado levaduras mediante una serie de métodos de laboratorio que permiten separar la gran diversidad de organismos presentes en su ambiente natural.

Se han reportado aislamientos alrededor del mundo, en una amplia variedad de sustratos cómo pueden ser frutos, cortezas, hongos, bebidas fermentadas, residuos ricos en azúcares, etc. Estos aislamientos se han podido caracterizar por una serie de pruebas como son la comparación de morfologías, particularidades en sus mecanismos de reproducción, por un análisis de su metabolismo o por medio del reconocimiento de regiones conservadas dentro de su genoma. Los estudios han evaluado sus cepas con pruebas que permiten obtener colecciones de levaduras con potencial biotecnológico o para su estudio biológico. La diversidad de levaduras que se aíslan a partir de diversos sustratos muestra características únicas que pueden ser de utilidad en las fermentaciones.

En la tabla 2 se muestra una compilación de trabajos relacionados con la caracterización y aislamiento de levaduras silvestres.

Tabla 2. Descripción de los estudios de asilamiento y caracterización de levaduras silvestres.

Muestra	Lugar de recolección de muestra	Objetivo del estudio	referencia
Uvas para vino	Viñedo de Buenos aires Argentina, provincia de Mendoza	Aislamiento y clasificación de levaduras vínicas de las uvas de Mendoza	(Dalvit, 1940)
Muestras de melaza residual, jugo de caña de azúcar residual, Fábrica de azúcar y efluentes de destilería, suelos superiores en molienda. Zonas de fábricas de azúcar, residuos de caña cosechados. campos, bagazo, lodo filtrante y otras plantas que contienen azúcar	Destilerías de Sri Lanka	Aislamiento y caracterización de cepas de levadura provenientes de ambientes naturales en Sri Lanka y evaluación de su rendimiento en condiciones de laboratorio en un esfuerzo por seleccionar cepas con características superiores para fermentaciones industriales	(Chandrasena. <i>et al.</i> , 2006).
Uvas para vino de tres diferentes viñedos	Viñedos del sur de Francia	Evaluación de la diversidad de levaduras en tres distintos viñedos de sur de Francia durante tres años	(Valero <i>et al.</i> , 2007)
Cultivo de cachaza	Cuba	Evaluación de la cepa aislada de cachaza para producción de etanol y determinar fenotipo “killer”	(Álvarez <i>et al.</i> , 2007)
Tepache	CDMX, Hidalgo y Estado de México	Desarrollo de un inóculo para la elaboración de una bebida tipo tepache, mediante la realización de pruebas de fermentación en cultivo puro y mixto de levaduras identificadas de manera presuntiva en esta bebida	(Cerón, 2007)

Pulque	Tlaxcala, México	Caracterización microbiológica del pulque y cuantificación de su contenido de etanol mediante espectroscopia Raman	(Cervantes <i>et al.</i> , 2008)
Estromas de Hongo <i>Cittaria hariatii</i>	Parque Nacional Nahuel Huapi (Noroeste Patagónico, Argentina)	Este trabajo contribuye al conocimiento de la biodiversidad de levaduras de la Patagonia	(Ulloa <i>et al.</i> , 2009)
Corteza, suelos y estromas de hongo <i>Cittaria</i> del árbol <i>Nothofagus</i>	Cerca de los parques nacionales del sur de Argentina Lanin y Nahuel Huapi	Este estudio muestra que la combinación de la ecología microbiana con la genómica comparativa facilita el descubrimiento y la preservación de las reservas genéticas silvestres de microbios domesticados para rastrear su historia, identificar cambios genéticos y sugerir caminos para un mejoramiento industrial.	(Libkind <i>et al.</i> , 2011)
<i>A. angustifolia</i> , <i>A. cupreata</i> , <i>A. durangensis</i> , <i>A. salmiana</i> y <i>A. tequilana</i> .	Oaxaca, Durango, Zacatecas, Guerrero y San Luis Potosi	Evaluación de las capacidades fermentativas y la generación de volátiles de ocho cepas de levaduras mezcaleras, cinco no-Saccharomyces y tres Saccharomyces, en cinco diferentes jugos de agave (<i>A. angustifolia</i> , <i>A. cupreata</i> , <i>A. durangensis</i> , <i>A. salmiana</i> y <i>A. tequilana</i>).	(Alcázar, 2011)
Mezclas de "Sochu" (Bebida Japonesa fermentada)	Miyazaki, Japón	Evaluación de fermentación de cepas aisladas de "Sochu", utilizando como sustrato arroz y papa dulce.	(Yamamoto <i>et al.</i> , 2011).
"Chicha de Jora" (Bebida fermentada de Perú)	Trujillo, Perú	El objetivo de este trabajo es aislar levaduras productoras de etanol a partir de "Chicha de jora"	(Castillo <i>et al.</i> , 2012)
Frutas como uvas, melaza, mosambi, anacardo, caña de azúcar, sorgo y muestras del	Turipati, India	Este estudio es un aislamiento e identificación de cepas de levadura de hábitats naturales, selección de esas cepas de levadura para tolerancia al etanol y caracterización molecular de	(Tikka <i>et al.</i> , 2013)

efluente de una destilería		cepas de levadura usando marcadores RAPD	
Corteza de árboles de roble	América del norte y algunos sitios de europeos	En este estudio se realizó el patrón de utilización de los hidratos de carbono en poblaciones silvestres de <i>Saccharomyces paradoxus</i>	(Samani <i>et al.</i> , 2015)
fruta de palma pindo, níspero, almez y mora	Florida, U.S.A.	Este estudio examina la utilización de nuevas cepas de levaduras salvajes puras en la elaboración de una cerveza única	(Lentz <i>et al.</i> , 2014)
Fruto de <i>Syzygium malaccense</i> (Pomorroso)	Neiva, Colombia	En este estudio se aislaron y caracterizaron levaduras presentes en el fruto del pomorroso	(Trujillo y Hernández, 2015)
Uvas de viñedos	Querétaro, México	En este estudio se buscó el aislamiento, selección con base en su potencial enológico e identificación de levaduras <i>Saccharomyces</i> nativas de viñedos queretanos.	(Miranda-Castilleja <i>et al.</i> , 2015)
Corteza de roble (<i>Quercus robur</i>) y suelo circundante	Saint Auban, Francia	Aislamiento e identificación genética de una nueva especie de levadura del género <i>Saccharomyces</i>	(Naaseb <i>et al.</i> , 2017)
Bagazo de caña de azúcar	Tamaulipas, México	Valoración de la capacidad de producción de etanol de cepas de levaduras nativas, aisladas en medio YPD e hidrolizado de bagazo de caña de azúcar. Utilizando como variables de estudio el tipo de cepa y el tiempo de proceso, se realizó un análisis multifactorial (ANOVA) para su evaluación.	(Gonzales <i>et al.</i> , 2017)
Desechos de industrias vitivinícolas	Viñedos de Querétaro y Baja California	El objetivo de este estudio fue aislar, purificar e identificar levaduras no- <i>Saccharomyces</i> de desechos de industrias vitivinícolas y evaluar su capacidad para producción de cerveza.	(Resendis <i>et al.</i> , 2018).

3. Justificación

La cervecería representa una de las industrias de más importancia en nuestro país. En la actualidad México es el primer exportador de cerveza y el cuarto mayor productor en el mundo sólo por debajo de Brasil y por encima de Alemania. Nuestro país alberga un importante mercado de este producto ya que se calcula el consumidor promedio toma 65 litros de cerveza anuales. Estos puntos colocan a la cervecería como una de las industrias más grandes en nuestro país. Las empresas cerveceras mexicanas y productoras en su mayoría de cerveza lager actualmente y desde la introducción de la cerveza a nuestro país en 1845, utilizan levaduras de origen extranjero en sus fermentaciones para mantener los perfiles de sabor del estilo de cerveza que producen. Las levaduras forman parte primordial para la elaboración de estilos de cervezas, estas levaduras fueron aisladas y domesticadas empíricamente desde hace siglos. Actualmente la industria de la cervecería busca dar nuevas características a sus productos e innovar sus sabores, por lo que se han empleado cepas aisladas de entornos naturales denominadas levaduras salvajes e incluso se llegan a usar levaduras no-*Saccharomyces*. En México se tiene una gran diversidad de ambientes que albergan una variedad de sustratos ricos en azúcares donde pueden habitar diversas comunidades de levaduras, además de bebidas autóctonas fermentadas espontáneamente como antecedente de la utilización de estos microorganismos de forma empírica, abriendo la posibilidad de encontrar nuevas levaduras silvestres que tengan potencial para ser productoras de cerveza y que puedan generar nuevos perfiles de aroma y sabores, lo que sería de importancia para la industria de la cervecería. Debido a lo anterior este trabajo buscará aislar y caracterizar levaduras silvestres de diversos sustratos con potencial para producir cerveza.

4. Hipótesis

Se encontrarán levaduras silvestres en los aislamientos realizados a las muestras, que probablemente tengan potencial para la producción de cerveza artesanal.

5. Objetivos de la investigación

5.1. Objetivo general

Aislar y caracterizar una colección de levaduras silvestres productoras de etanol con potencial para cervecería.

5.2. Objetivos específicos:

- Aislar y purificar levaduras silvestres a partir de muestras de diferentes ambientes en base a su caracterización morfológica en colonia y célula.
- Conformación de una colección de levaduras silvestres.
- Caracterizar por pruebas bioquímicas a los aislados con base al perfil de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Caracterizar y seleccionar levaduras silvestres con potencial para su aplicación en la producción de cerveza artesanal.

6. Materiales y métodos

6.1. Recolección de muestras

En este trabajo se colectaron muestras de distintas fuentes vegetales y fúngicas como son: *Ananas comosus* (piña), *Prunus cerasifera* (ciruela), *Agave angustifolia* (espadín), pulque y distintos hongos lignícolas. Las muestras procedían de diferentes regiones geográficas y ambientes. El pulque proviene de la localidad de San Mateo Ozolco del municipio de Calpan en el estado de Puebla. Las ciruelas fueron colectadas de un rancho en el barrio de Atenzingo el municipio de San Dionisio Yahuquemecan en el estado de Tlaxcala. El agave espadín fue muestreado en San Bartolomé Chimalhuacán de Puebla en el Parque estatal de “Sierra del Tentzo. Dichas ubicaciones se pueden observar en la figura 12. La piña se obtuvo de forma comercial. La mayoría de las muestras no tiene historial de fertilización química y proceden de zonas silvestres.

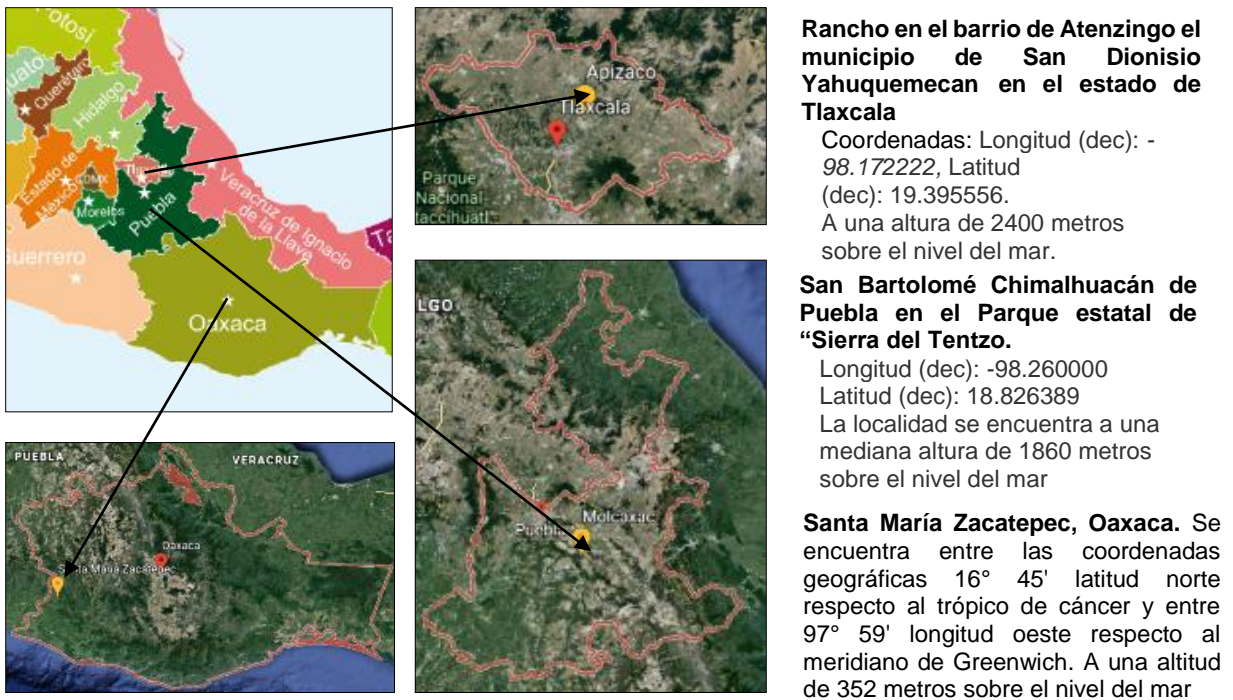



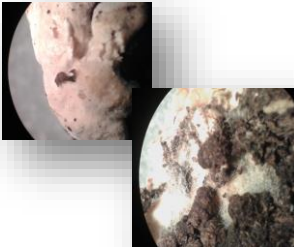




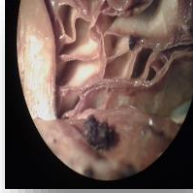
Figura 12. Lugares de recolección de muestras Fuente: Google earth.

<https://www.google.com/intl/es-419/earth/>

Finalmente, los hongos lignícolas provenientes de la localidad Sta. María Zacatepec, Oaxaca ubicada en la parte suroeste del estado, consistieron de un total de 12 muestras recolectadas en julio del 2016 (Figura 13). Los hongos se identificaron por sus características morfológicas como tamaño, forma del cuerpo fructífero, forma de estromas, bordes agujas y color, para poder determinar su género y especie por el departamento de investigación en ciencias agrícolas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (DICA-ICUAP).

No.	Imagen	Género
1		
		<i>Trametes versicolor</i>
2		
		<i>Meruriopsis</i>
3		
		<i>Cyathus striatus</i>

4



Micena o hygroporus

5



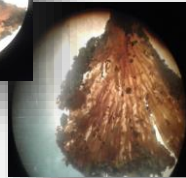
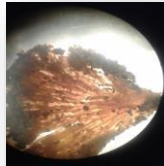
Byssomerulius corium

6



Trametes sp.

7



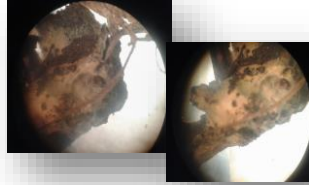
*Crepidotus
applanatus*

8



Scutellinia scutellata

9



Peniophora cinerea o
P. limitata

10



Gastrum saccatum

11



Micena sp.

12



Figura 13. Muestras de hongos recolectados en la región de Santa María Zacatepec, Oaxaca.
Fuente: Autoría personal.

Debido a que hay antecedentes donde las levaduras se asocian a estromas de hongos que se encuentran en cortezas de árboles solamente se utilizaron para el procesamiento los hongos asociados a troncos como: *Trametes versicolor*, *Trametes sp*, *Byssomerulius corium*, *Bjerkandera adusta* y *Crepidotus applanatus*.

6.2. Aislamiento de levaduras a partir de piña, ciruela y maguey espadín.

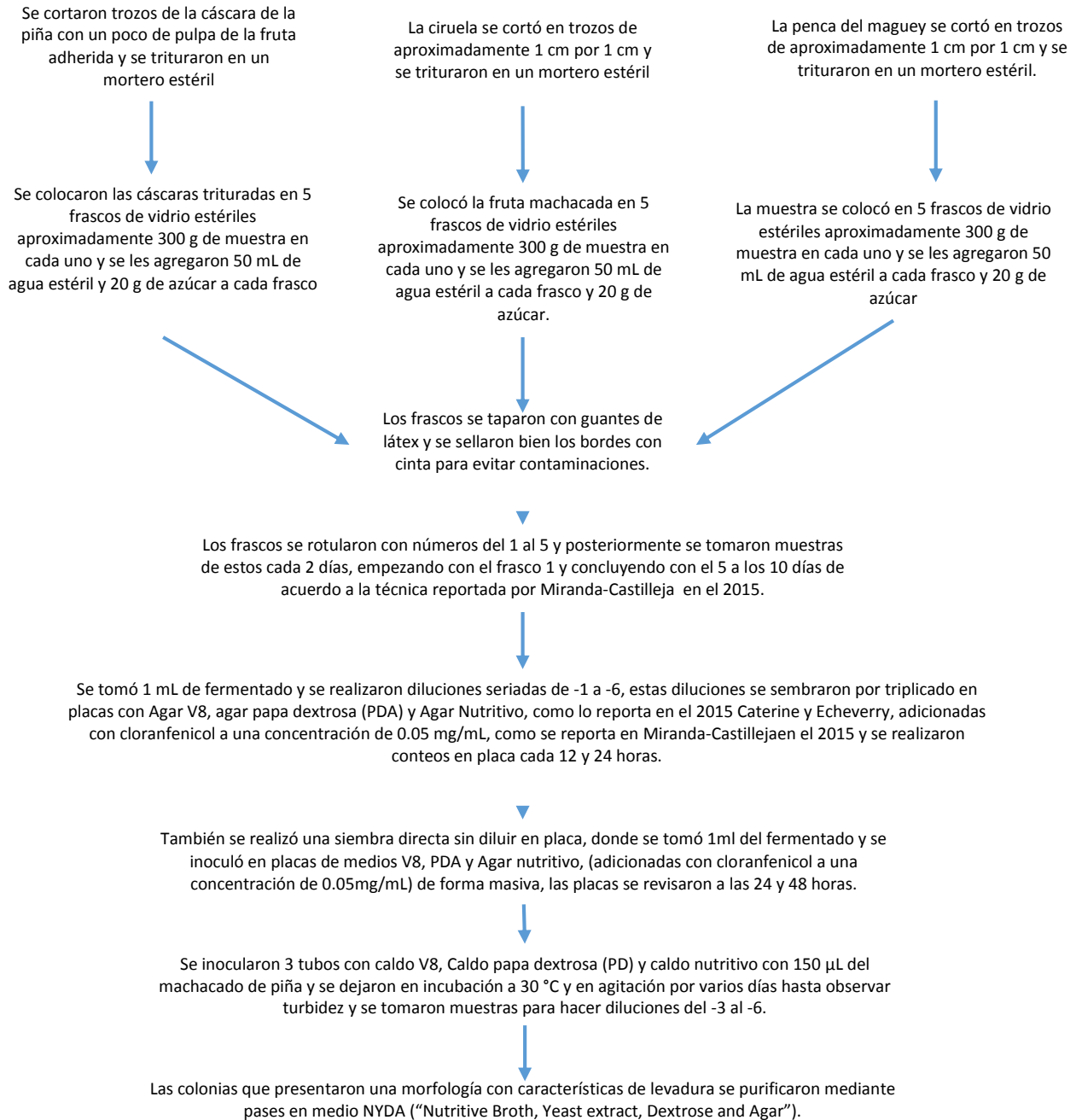


Figura 14. Diagrama que muestra el procesamiento de piña, ciruela y maguey espadín para el aislamiento de cepas de levadura

6.3. Aislamiento de levaduras a partir de pulque

1. Se tomó 1 mL de pulque de la superficie de la muestra y 1 mL proveniente del sedimento de éste.
2. Se realizaron diluciones seriadas de las dos muestras.
3. Las diluciones se sembraron por triplicado en placas con medio PDA y V8 adicionadas con cloranfenicol a una concentración de 0.05 mg/mL por triplicado y se dejaron incubar a 30° C durante 72 h.

Las colonias que presentaron una morfología con características de levadura se purificaron mediante resiembra en medio NYDA (Anexo 4).

6.4. Aislamiento de levaduras a partir de hongos

Se realizó el aislamiento a partir de los hongos identificados como: *Trametes versicolor*, *Trametes sp*, *Byssomerulius corium*, *Bjerkandera adusta* y *Crepidotus applanatus*. Estos hongos se procesaron por el método descrito en el diagrama de la figura 15, las especificaciones de este proceso se encuentran en el anexo 5. El propósito de usar estas técnicas fue encontrar levaduras asociadas a estos hongos según lo reportado en Ulloa y colaboradores en el 2009.

Procesamiento de hongos

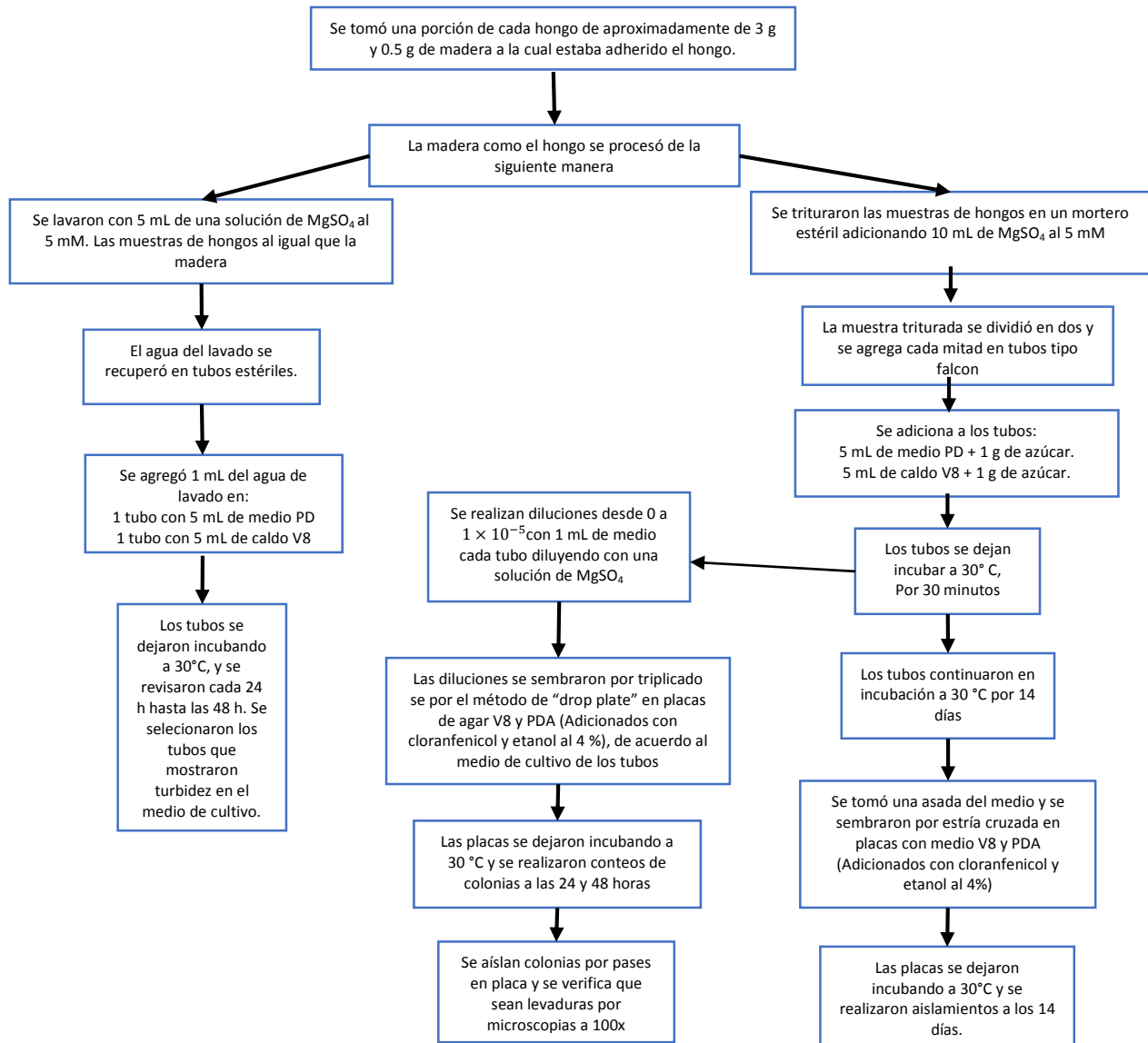


Figura 15. Diagrama que muestra el procesamiento de los hongos de repisa de los que se busca aislar levaduras.

6.5. Caracterización micro y macroscópica

Macroscópica

Se realizó la caracterización macroscópica mediante la observación de las colonias aisladas, registrándose la forma, textura y el color en placas con medio NYDA a las 24 h de crecimiento en incubación a 30 °C.

Microscopía

Se realizaron microscopías de los aislados para distinguir sus características celulares y de cultivo puro a un aumento de 100x sin teñir, buscando células grandes redondas, ovaladas o alargadas, características levaduriformes como estructuras de división celular y pseudohifas a fin descartar hongos que no fueran de levaduras, además de verificar la pureza del cultivo. Se tomó una pequeña asada de una colonia de un cultivo fresco 24 a 48 h de crecimiento a 30° C, se hizo un frotis y se colocó el cubre objetos y portaobjetos.

6.6. Conservación de las levaduras silvestres

Para la conservación de las cepas silvestres puras y con las características morfológicas deseadas. Se prepararon tubos cónicos falcón de 50 mL con 10 mL de medio NYD (Anexo 4) los cuales se incubaron en agitación a 140 rpm a una temperatura de 30 °C durante 48 h. Posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min, retirando el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 700 µL de glicerol al 50% y con 700 µL de medio PDA. Las muestras se resguardaron a – 70 °C en ultracongelador.

6.7. Pruebas bioquímicas

6.7.1. Asimilación de urea

Se realizó una prueba de asimilación de urea para todas las cepas aisladas, utilizando medio de Stuart modificado con azúcar (Anexo 4), esta prueba evidencia la presencia de la enzima ureasa que hidroliza la urea en el medio, haciendo que el medio vire de color paja a rosa intenso cuando es positivo, se tomaron en cuenta solamente los resultados negativos, que se ajusta al perfil de *S. cerevisiae*.

1. Todas las cepas aisladas se inocularon por medio de estría en pico de flauta, por triplicado y se incubaron a 30° C.
2. Se realizaron lecturas de viraje de color (rosa: positivo; color paja: negativo) cada 24 h hasta que se cumplieran las 72 h de incubación.

6.7.2. Asimilación y fermentación de carbohidratos

Se realizaron pruebas de asimilación y fermentación de manitol, glucosa, sorbosa, rafinosa, sacarosa, maltosa, lactosa, xilosa y arabinosa en las cepas que resultaron ureasa negativa a fin de seleccionar cepas con perfil semejante al de *S. cerevisiae* (tabla 3), lo cual reducirá también la cantidad de cepas a evaluar.

1. Se inoculó cada cepa por triplicado en tubos con 8 mL de caldo rojo de fenol adicionado con los azúcares (Anexo 4) y una campana de Durham, mediante una asada de un cultivo fresco de 48 h (Kurtzman, 1999).
1. Los tubos se incubaron a 30 °C sin agitación.
2. Se tomaron lecturas cada 24 h hasta las 72 h evaluando los siguientes puntos: -Viraje de color: Positivo (Rosa) y Negativo (Amarillo paja)
 - Presencia de gas en campanas Durham
 - Crecimiento

Tabla 3., Perfil de asimilación y fermentación para el género *"Saccharomyces mayen ex Hansen"* modificado de Kurtzman, 1999

Asimilación	Resultado	Asimilación	Resultado	Fermentación	Resultado
Glucosa	+	Ramnosa	-	Glucosa	+
Galactosa	v	D- Glucosamina	-	Galactosa	V
L- sorbosa	-	Glicerol	-	Sacarosa	+
Sacarosa	+	Erithritol	-	Maltosa	V
Maltosa	+	Ribitol	-	Lactosa	-
Celobiosa	-	Galactitol	-	Trehalosa	-
Trehalosa	+	D. manitol	-		
Lactosa	-	Glucitol	-		
Melibiosa	v	A.M.D. Glucosido	V		
Rafinosa	+	D- gluconato	-		
Melizitosa	v	DL-lactato	V		
Almidón soluble	-	Mio-inositol	-		
D- xilosa	-	2-k-D gluconato	-		
Arabinosa	-	D- glucuronato	-		
Ribosa	-	Nitrato	-		

6.8. Prueba de ascosporas

Se realizó la prueba en placas de agar acetato de potasio que contenía la mitad de la cantidad indicada de carbohidratos y extracto de levadura, por medio de estría alargada. La formación de estas estructuras ayuda a diferenciar género de levaduras. En esta prueba se utilizaron las cepas control *S. cerevisiae* ale 05 y la cepa *S. cerevisiae* de panadería para observar esporulación.

1. Las levaduras se dejaron incubando a 30 °C durante 15 días.
2. Se realizaron observaciones al microscopio sin teñir con un aumento de 100x a los 4, 7 y 15 días y se registraron fotográficamente.

6.9. Prueba de tolerancia al etanol

Se cultivaron los aislados a diferentes porcentajes de etanol en un rango de 0% a 12% con el fin de conocer su tolerancia y resistencia al etanol.

1. Se prepararon tubos estériles con 4 mL de medio NYD por triplicado, a los cuales se les retiro un volumen del medio equivalente al porcentaje de etanol absoluto a probar: 2%-100 µL, 4%- 6%-300 µL, 8%-400 µL, 10%-500 µL, 12%-600 µL. Posteriormente, se prepararon inóculos en medio NYD agregando colonias a partir de placa, hasta ajustar a 0.5 de absorbancia a 530 nm ($1.5 \cdot 10^7$ UFC), tomando como blanco el medio.
2. Se agregó 1 mL de inóculo en cada tubo y se dejaron incubar en agitación a 30 °C durante 72 h, tomando lecturas de turbidez. Reportándose de la siguiente manera:
 - Crecimiento abundante: +++
 - Crecimiento medio: ++
 - Crecimiento bajo: +
 - Sin crecimiento: x

6.10. Prueba de tolerancia a bajos valores de pH.

En esta prueba se evaluó la capacidad de las levaduras para tolerar bajos valores de pH, debido a que es una característica que deben poseer cepas de fermentación ya que en este tipo de procesos se acidifican los medios fermentables.

Se prepararon tubos con medio NYD por triplicado (5 mL en tubo) por cada pH a probar. Posteriormente se ajustó el pH con ayuda de un potenciómetro, utilizando ácido láctico: 4.5, 3.5, 2.5 y 2.0 y se esterilizaron. Se prepararon inóculos en medio NYD dejándolos a 0.5 de absorbancia a una longitud de onda de 530 nm con el fin de inocular los tubos con 1 mL. Los tubos se dejaron incubando en agitación a 30 °C y se tomaron lecturas de crecimiento de la cepa cada 12 h por 72 h, las cuales se midieron de la siguiente manera:

- Crecimiento abundante: A
- Crecimiento medio: B
- Crecimiento bajo: C
- Sin crecimiento: X

6.11. Pruebas de termotolerancia

Se realizaron pruebas de termotolerancia con el fin de poder conocer la temperatura máxima a la cual sobreviven las cepas aisladas, lo cual permite conocer si las levaduras podrán resistir las temperaturas a la que se lleva a cabo una fermentación.

1. Se prepararon placas con medio NYDA y se inocularon por estría.
2. Las placas se dejaron incubando a diferente temperatura: 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C.
3. Se realizó un registro fotográfico de las cepas a cada temperatura, cada 12 h hasta completar 96 h.

6.12. Montaje de atenuación de azúcares de la malta

La atenuación de los azúcares en extracto de malta permitió conocer si las levaduras seleccionadas consumen los azúcares del extracto de malta y en qué medida se lleva a cabo este proceso.

1. Se preparó un mosto sin lúpulo, sólo con extracto de malta. Amber Pilsner y agua, con una densidad final aproximada de 1.050 SG.
2. El mosto se esterilizó a 115 °C por 20 min y se dejó enfriando toda la noche.
3. El mosto se decantó en microfermentadores de 250 mL esterilizados previamente y se dejaron a prueba de esterilidad.
4. Se prepararon inóculos con el mosto decantado colocando una asada de la cepa a evaluar en tubos tipo falcon estériles con 5 mL de mosto y dejándolos en incubación a 30 °C y en agitación por 24 h.
5. Los inóculos se ajustaron tomando como blanco el mosto a una absorbancia aproximada de 0.500 OD en una densidad de onda de 530 nm.
6. Se agregaron 3 mL de inóculo a cada microfermentador a temperatura ambiente (20 °C aproximadamente) y se taparon con un corcho con airlock y se dejaron fermentando en un lugar oscuro y a una temperatura de entre 19 °C y 20 °C.
7. Cada 72 h se midieron grados Brix con ayuda de un refractómetro.

6.13 Cepas tipo

Se utilizó una serie de cepas tipo para las pruebas bioquímicas y de potencial como control negativo y positivo Además de controles negativos sin inocular que llevaron a todo el proceso para confirmar que el medio estaba bien elaborado y sin contaminante.

Con respecto a las pruebas bioquímicas se utilizaron tanto bacterias como levaduras como control negativo y positivo. (Tabla 4)

Tabla 4. Microorganismos control utilizados en los experimentos de perfiles bioquímicos parciales.

Cepas	Marca	Especie	Control
Safe ale S-05	Lallemand-Windsor	<i>S. cerevisiae</i>	Positivo-ureasa
TradiPan	SAFMEX, S.A. DE C.V. / FERMEX, S.A. DE C.V.	<i>S. cerevisiae</i>	Positivo-ureasa- Carbohidratos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Propiedad de colección de Dr. Jesús Muñoz	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo-ureasa- carbohidratos
<i>Pseudomonas</i>	Propiedad de colección de Dr. Jesús Muñoz	<i>Pseudomonas sp.</i>	Negativo-ureasa
<i>Cepa 41</i>	Propiedad de colección de Dr. Jesús Muñoz	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Negativo- Carbohidratos

Para las pruebas de potencial como tolerancia a etanol, tolerancia a bajos valores de pH y termotolerancia solo se utilizaron las cepas control Safe ale S-05 y Safe lager S-189 ambas con características para la producción de cerveza como controles positivos y de panadería TradiPan como control negativo (Tabla 5)

Tabla 5. Microorganismos control utilizados en las pruebas de potencial para producción de

Cepas	Marca	Especie	Control
Safe ale S-05	Lallemand-Windsor	<i>S. cerevisiae</i>	Positivo
Safe lager S-189	Fermentis	<i>S. cerevisiae</i>	Positivo
TradiPan	SAFMEX, S.A. DE C.V. / FERMEX, S.A. DE C.V.	<i>S. cerevisiae</i>	Positivo

7. Resultados y discusión

7.1. Aislamiento de cepas

Las levaduras habitan las pieles de frutos y otros sustratos, gracias a múltiples mecanismos de adaptación que han desarrollado frente a condiciones adversas, como la exposición directa a los rayos solares, periodos de desecación, temperaturas y condiciones de osmolaridad extrema (Uribe 2007), lo cual permite que estos microorganismos puedan encontrarse en diversos nichos. En este trabajo se obtuvieron un total de 98 cepas aisladas de las muestras colectadas de hongos lignícolas, piña, ciruela, maguey espadín y pulque. La gran mayoría de cepas fueron aisladas a partir de la muestra de piña, obteniendo 57.14% (56 cepas) del total de aislados, por medio de la técnica de enriquecimiento del medio y fermentación, se obtuvieron tanto por siembra directa como por diluciones seriadas, al igual que las aisladas de ciruela y maguey espadín. El 31% de las colonias aisladas totales, se obtuvieron de los hongos lignícolas *Trametes versicolor*, *Trametes sp* y *Byssomerulius corium*, por la técnica de enriquecimiento del medio, con un largo tiempo de fermentación, y siembra directa en placa por estría cruzada. Se ha reportado que las levaduras se asocian a los estromas de hongos lignícolas debido a que producen una gran cantidad de azúcares simples como glucosa, fructosa y sacarosa (Ulloa *et al.*, 2009). Por último, 5 cepas de pulque se aislaron por siembra directa en placa equivalentes a un 5.10 % de los aislamientos (Gráfico 1).

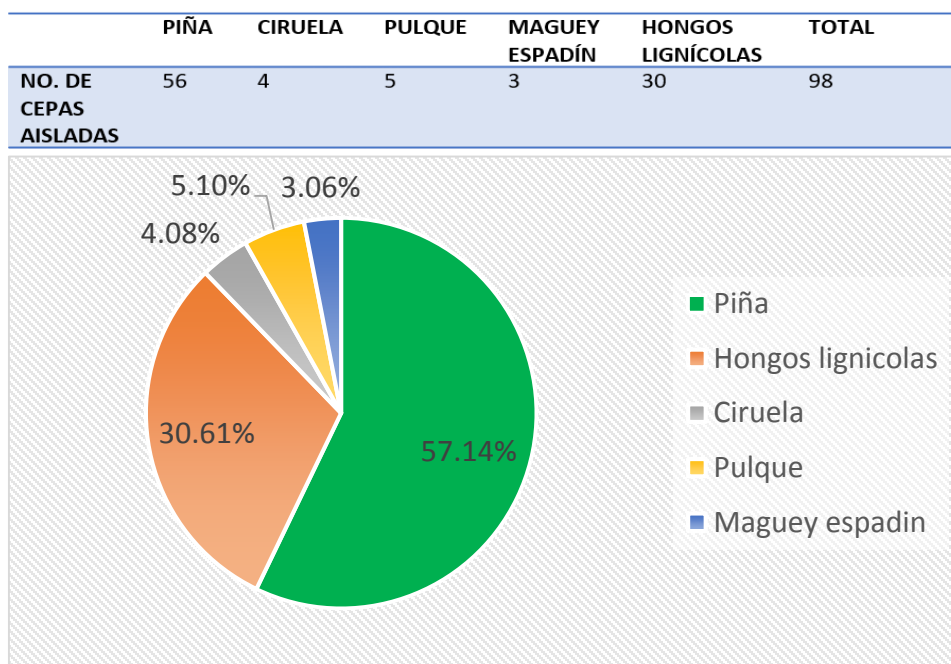


Gráfico 1. Número y porcentaje de aislamientos por sustrato.

El aislamiento de estas cepas de levadura se llevó a cabo con tres medios de cultivo PDA, Agar V8 y Agar Nutritivo permitiendo comparar la eficacia de éstos en el aislamiento de levaduras silvestres. El medio en el que más levaduras se aislaron fue el PDA con un 51.02% (50 cepas) del total de aislados (Gráfico 2), debido a la gran cantidad de azúcares fermentables disponibles en este medio (glucosa y fructosa) procedentes del almidón que aporta la papa, además de una fuente de nitrógeno (Morales, *et al.*, 2015). De acuerdo al sustrato las cepas provenientes de pulque y ciruela, se aislaron en medio PDA y las de maguey espadín solamente se aislaron en Agar nutritivo. En la muestra de piña se aislaron las cepas en los tres medios utilizados, pero mayoritariamente en medio PDA, seguido de agar V8 y en menor medida Agar nutritivo. Por último, los aislamientos de hongos se realizaron sólo en medio V8 y PDA siendo en este último en el que se obtuvo la mayor cantidad de aislados (Gráfico 2).

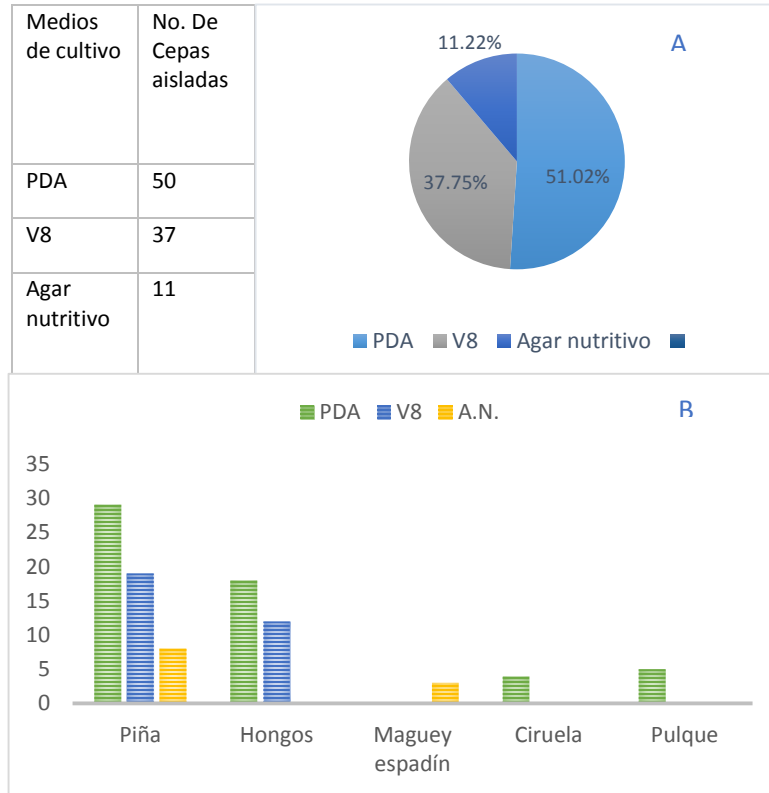


Gráfico 2. A) Porcentaje y número de aislados por medio V8, PDA y agar nutritivo. B) Gráfico de barras entre muestras y número de aislados en cada medio.

7.2. Análisis por morfología de colonia y microscopía

El análisis de morfología de colonia nos permite diferenciar colonias de levaduras mediante su forma, color y textura y en la microscopía podemos observar características de la célula de levadura como su forma redonda, ovalada o alargada generalmente, y estructuras reproductivas como pseudohifas o brotes de gemación. Las colonias de levaduras aisladas presentan una morfología de colonia típica, con las siguientes características: color blanco mate o brillante, colonias convexas, de consistencia pastosa y con bordes lisos y redondos en algunas cepas y en otras los bordes son más irregulares (figura 16).

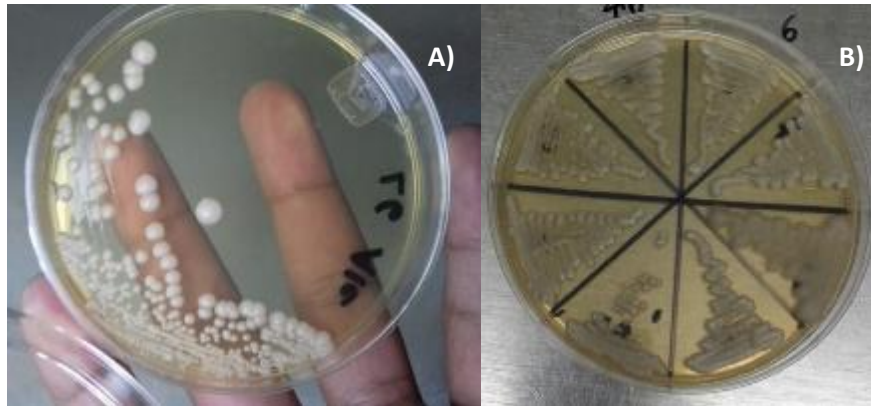


Figura 16. En la figura A) se observan colonias de la levadura control saf-ale 05 sembrada por estría cruzada. En la figura B) se observan 8 cepas sembradas por estría simple. Autoría propia

Las colonias de levadura encontradas presentan estas características típicas, pero pueden variar en cuanto al tamaño de colonia. También se observaron diferencias en la velocidad de crecimiento sin embargo a las 48 h todas las colonias alcanzaban su máximo crecimiento con respecto al control.

Para confirmar las características microscópicas típicas de las células de levadura y la pureza se realizaron microscopías con un frotis simple a un aumento de 100x. La morfología celular observada fue: redonda, elipsoidal o alargada y se observaron estructuras de gemación, ascosporas, pseudohifas y contaminantes como hongos filamentosos o bacterias en el cultivo (figura 17).

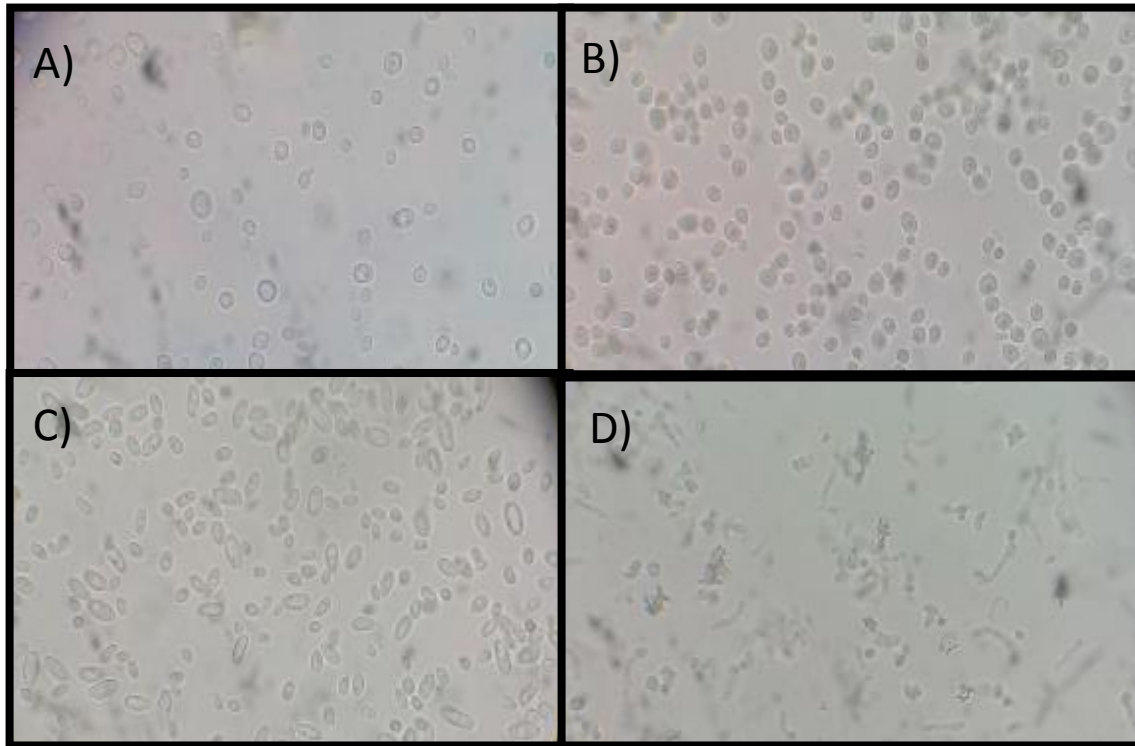


Figura 17. En esta figura se observa en cada cuadrante una microscopía simple con un aumento de 100x pertenecientes a las siguientes cepas: A) Ceba 15, B) cepa 5, C) cepa 60, D) cepa 1. Autoría propia

Las formas celulares que se encontraron con más frecuencia mostraban una forma redondeada (Fig. 17, cuadrantes A y B) y en ocasiones formas elipsoidales (Fig. 17, cuadrante C), la forma alargada se encontró en muy pocas cepas como en la cepa 1 (Fig. 17, cuadrante D).

La gemación genera estructuras en forma de brotes (figura 18). Mediante el análisis microscópico también se pudieron observar contaminantes bacterianos bacilares y algunos hongos filamentosos con grandes hifas en las microscopías de algunas cepas.

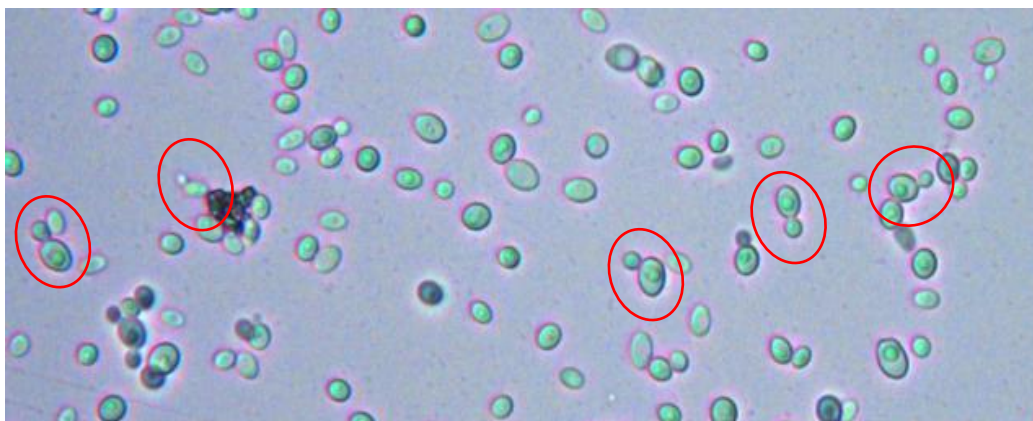


Figura 18. En esta imagen se pueden observar levaduras en gemación de la cepa 5 encerradas en círculos rojos, vistas con un aumento de 200x. Autoría propia

7.3. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas son una herramienta que permite la identificación de levaduras y la caracterización de sus capacidades metabólicas para la asimilación o fermentación de diferentes compuestos químicos. Se evaluaron las 98 levaduras aisladas, con una serie de pruebas de utilización de azúcares y ureasa de las cuales: 55 cepas mostraron resultados negativos para la prueba de ureasa de igual manera que el perfil bioquímico de *S. cerevisiae* como se muestra en la tabla 4.

Las 55 cepas que presentaron un resultado negativo en prueba de ureasa se redujeron a 38 debido a que se descartaron 17 cepas después de realizar las pruebas de asimilación y fermentación de manitol y glucosa. Posteriormente en la prueba de maltosa se descartaron 3 cepas y en las de sorbosa y sacarosa se evaluaron 35 de las cuales solo 33 se evaluaron en la prueba de rafinosa. Por último, se descartaron otras 12 cepas debido a que se encontraron unas pequeñas contaminaciones bacterianas entre las células de levadura, dejando así un total de 21 levaduras que se evaluaron para los azúcares arabinosa, xilosa y lactosa. La tabla 4 se presenta se muestra el origen de la cepa y los resultados que obtuvieron en la evaluación bioquímica de azúcares en asimilación y fermentación.

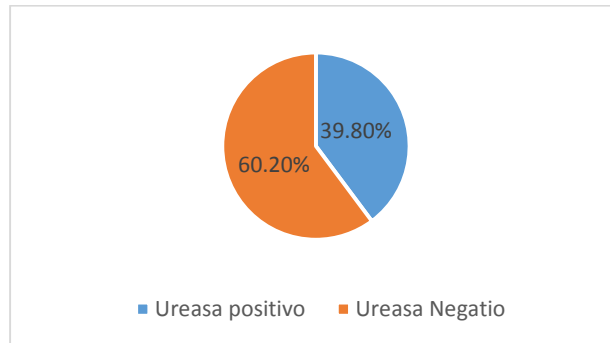
Tabla 4. Perfiles de utilización de carbohidratos de 55 cepas que tuvieron un resultado negativo en la prueba de ureasa y un control *S. cerevisiae*. Las celdas en color amarillo contienen resultados que corresponden al perfil de *S. cerevisiae*, las celdas en rojo representan diferencias y las celdas en gris que esa prueba bioquímica no se realizó. Positivo: +, negativo: -, variable: v

Cepas	Origen de la muestra	Ureasa	Manitol	Sacarosa		Maltosa		Sorbose	Glucosa		Rafinosa		Xilosa	Arabino	Lactosa	
				A	F	A	F		A	F	A	F			A	F
<i>S. cerevisiae</i>	Comercial	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
1	pulque	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
5	pulque	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
6	Ciruela	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
7	Ciruela	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
9	ciruela	-	+	+	-											
14	piña	-	-													
15	Piña	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
16	piña	-	-	+	-	+	-	v	+	-	-					
17	Piña	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-					
19	Piña	-	-	+	+	+	+	-	+	+	v					
22	Piña	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+					
23	Piña	-	-	+	+	+	-	-	+	+	v					
25	Piña	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-					
29	Piña	-	+													
31	Piña	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-					
35	piña	-	-	-	-	+	-	-	+	+	v					
37	Piña	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-					
40	Piña	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+					
42	Piña	-	+													
52	Piña	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+					
56	piña	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+					
60	Piña	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-					
61	Piña	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+					
62	Piña	-	+													
63	Piña	-	-	-	-	+	-	-	-	-	v					
64	Piña	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+					
65	Piña	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+					
66	Piña	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+					
67	Piña	-	+													
68	Piña	-	+													
69	Piña	-	+													
70	Piña	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+					
71	Piña	-	+													
72	Piña	-	+													
73	Piña	-	+													
74	Piña	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+					
75	piña	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+					
76	piña	-	-			+	-									
82	Hongos	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+					
86	Hongos	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-					
93	Hongos	-	+													
94	Hongos	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+					
95	Hongos	-	+													
96	Hongos	-	-	+	+	+	+	-	+	+	v					
97	Hongos	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+					
98	Hongos	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+			+	+	-
99	Hongos	-	+													
100	Hongos	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+					
101	Hongos	-	+													
102	Hongos	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-					
103	Hongos	-	+													
104	Hongos	-	+													
105	Hongos	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-					
106	Hongos	-	-													

Al evaluar los azúcares se determinó que la glucosa y sacarosa son los más utilizados tanto para asimilación como para fermentación. Para glucosa asimilaron y fermentaron 63.63% (21 cepas) de 35 cepas y para sacarosa 71.42% (25/35). Ninguna cepa logró asimilar o fermentar xilosa (Gráfico 3).

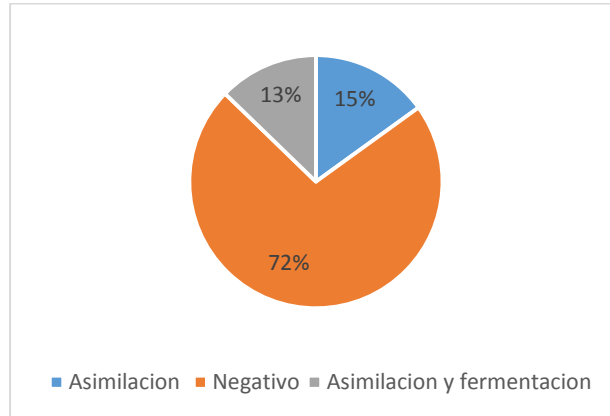
Resultados de la Prueba de asimilación de urea

Se evaluaron las 98 cepas aisladas en la prueba de ureasa de las cuales 55 no asimilaron la urea del medio, estas cepas fueron seleccionadas de acuerdo al perfil de *S. cerevisiae* para ser evaluadas en las pruebas de asimilación y fermentación de carbohidratos.



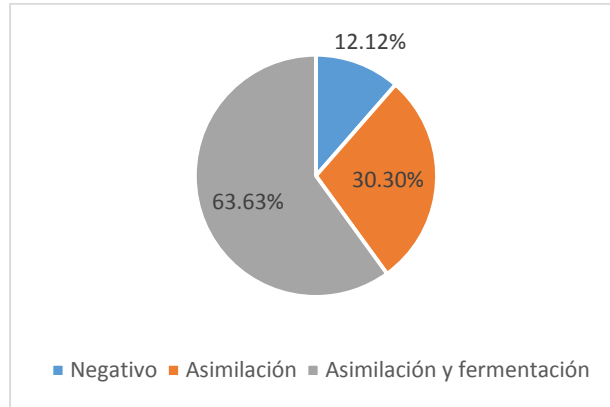
Manitol

Para este ensayo se utilizaron las 55 cepas que resultaron ser Ureasa negativo, de las cuales 40 no asimilaron ni fermentaron el manitol en el medio, 7 utilizaron y fermentaron el manitol y otras 8 sólo lo asimilan.



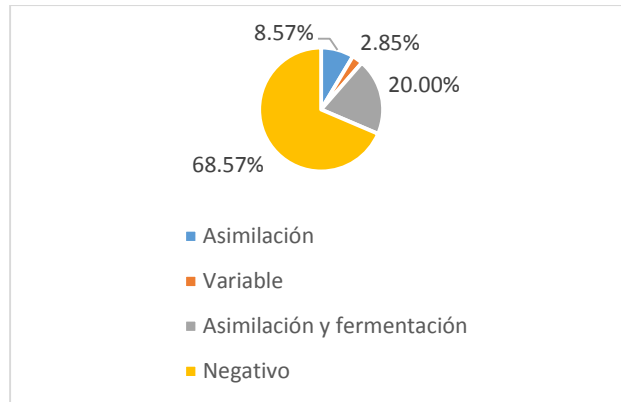
Glucosa

De las 55 cepas utilizadas para la prueba bioquímica de manitol se probaron 35 cepas de las cuales solo 4 no asimilaron ni fermentaron la glucosa del medio y de los 31 restantes 10 solamente asimilaron la glucosa y 21 asimilaron y fermentaron este azúcar.



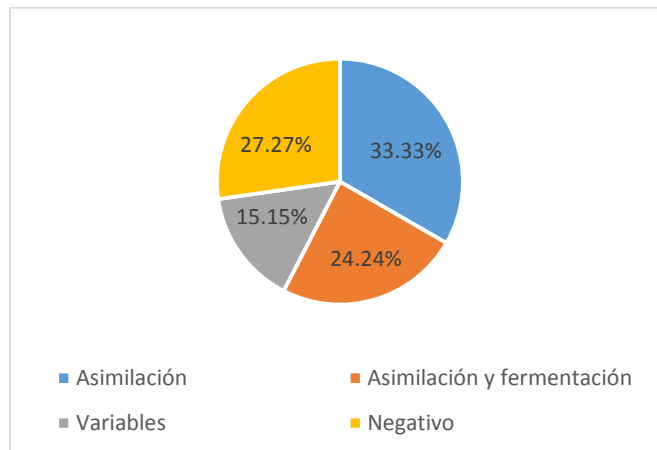
Sorbosa

Para la prueba de sorbosa se probaron 35 cepas de las cuales una resultó variable, 7 asimilaron y fermentaron sorbosa, 3 sólo asimilaron el azúcar y los 24 restantes tuvieron un resultado negativo. Y se distribuyen en porcentaje en la siguiente gráfica.



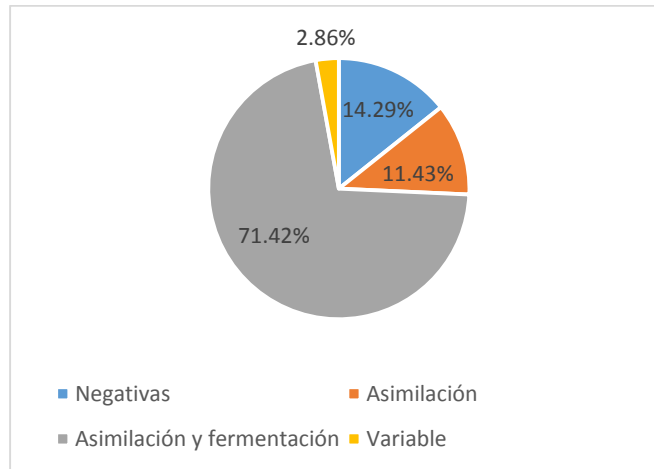
Rafinosa

Para la prueba bioquímica de rafinosa se probaron 33 cepas de las cuales 5 cepas resultaron variables, 9 resultaron negativos, 8 fermentaron y asimilaron rafinosa y los 11 restantes sólo asimilaron el azúcar.



Sacarosa

Para la prueba bioquímica de Sacarosa se probaron 35 cepas de las cuales 5 resultaron negativas, 4 sólo asimilaron este azúcar, 1 variable y los 25 restantes asimilaron y fermentaron sacarosa.



Maltosa

Para la prueba bioquímica de Maltosa se probaron 38 cepas de las cuales 9 resultaron negativas, 12 asimilan y fermentan maltosa, y los 14 restantes sólo asimilaron la maltosa.

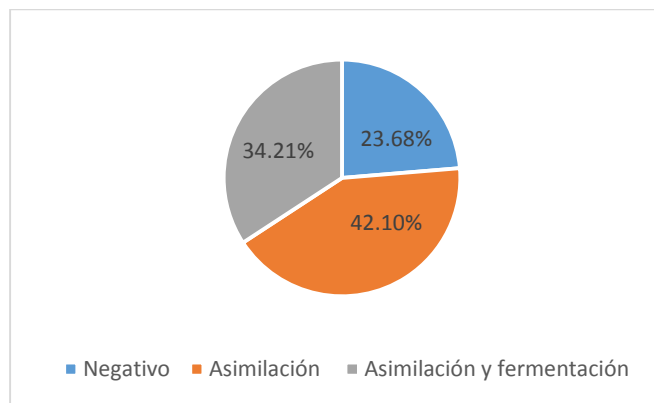


Gráfico 3. Resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas de levaduras, describiendo las cepas sometidas a la prueba y el porcentaje de cepas que asimilaron o fermentaron los azúcares de las pruebas en un gráfico circular.

Lactosa

Para la prueba bioquímica de Lactosa se utilizaron 21 cepas, las identificadas con los números 1 y 98 pudieron fermentarla.

Xilosa

Para la prueba bioquímica de Xilosa se utilizaron 21 cepas y ninguna de ellas pudo asimilar o fermentar este azúcar.

Arabinosa

Para la prueba bioquímica de Arabinosa se utilizaron 21 cepas de las cuales se obtuvieron resultados negativos a excepción de la cepa 98 que logró asimilar este azúcar.

Al final se obtuvieron los perfiles bioquímicos para 9 azúcares y ureasa para sólo 21 de 98 cepas, esto representa el 21.4% del total de asilados obtenidos, que se distribuyen de acuerdo a su sustrato en: 2/21 levaduras de pulque, 2/21 de ciruela, 12/21 de piña y 5/21 de hongos.

Tabla 6. Perfiles bioquímicos de asimilación y fermentación de azúcares y urea de las 21 cepas a las que se les realizaron todas las pruebas bioquímicas descritas anteriormente.

Cepas	Asimilación										Fermentación				
	Ureasa -	Sacarosa+	Maltosa+	Sorbose-L	Glucosa+	Xilosa	Arabinosa	Rafinosa+	Lactosa	Manitol	Glucosa	Sacarosa	Maltosa	Rafinosa	Lactosa
Control <i>S. cerevisiae</i>	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-
1	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
5	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-
6	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
7	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
15	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
17	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
22	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
25	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
31	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
35	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
37	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
40	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
52	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
60	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
61	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
70	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
86	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
98	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
100	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
102	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
105	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Las cepas 6, 61 y 70 presentan perfiles de asimilación y fermentación muy similares al control, sin embargo, no fermentan maltosa y las demás tienen un perfil bastante parecido al de *S. cerevisiae*, pero con algunas diferencias en comparación al control (Tabla 6). Al realizar el screening mediante pruebas bioquímicas obtuvimos una

colección de 21 cepas aisladas de diferentes muestras y lugares para proseguir con las pruebas de potencial (Tabla 6).

7.4. Análisis de perfiles bioquímicos por índice Jaccard

Para tener una mayor certeza que las pruebas realizadas en las levaduras silvestres permitieron escoger aquellas cepas con perfiles bioquímicos parciales similares a *S. cerevisiae*, se realizó un análisis de similitud/disimilitud de caracteres el cual permite medir la diversidad de los perfiles fenotípicos parciales obtenidos por medio de un coeficiente. En este caso se escogió un método cualitativo que expresa la semejanza entre dos muestras considerando únicamente la composición de especies. Este es el índice de Jaccard que relaciona el número de caracteres compartidas con el número total de caracteres exclusivas.

El índice de Jaccard del perfil bioquímico más alto obtenido es de 0.8889 de la cepa 5 y la cepa 70 de 0.7777 provenientes de pulque y piña respectivamente. También se encontraron cepas menos semejantes según el análisis de perfiles fenotípicos con un índice de 0.6667 de las cepas 52, 40, 22, 100 y 6 aislados de piña, hongos y ciruela, este grupo se determinó como cercano o semejante al perfil bioquímico parcial de utilización de carbohidratos de *S. cerevisiae*.

7.5. Prueba de ascosporas

La inducción de la formación de ascosporas nos permite identificar algunas especies de levadura como *S. cerevisiae*. Para esta prueba se sembraron las 21 cepas y 2 controles en medio acetato, siguiendo su crecimiento por 15 días. Las microscopias se llevaron a cabo con un aumento de 100x. De las 21 levaduras evaluadas, 13 de ellas no presentaron ascosporas en el tiempo del ensayo. Las levaduras 1, 98 y 105 presentaron estructuras de ascosporas desde el cuarto día, los controles aun no presentaron cambios.

Tabla 7. Inducción de ascosporas durante 15 días. Signo +: Aparición de ascosporas, signo -: Ausencia de ascosporas.

Cepa	Origen de la cepa	Día 1	Día 4	Día 7	Día 15
S. cerevisiae panadería	Comercial	-	-	+	+
S.cerevisiae Safe ale 05	Comercial	-	-	+	-
1	Pulque	-	+	+	+
5	Pulque	-	-	+	+
6	Ciruela	-	-	+	-
7	Ciruela	-	-	+	+
15	Piña	-	-	-	-
17	Piña	-	-	-	-
22	Piña	-	-	+	-
25	Piña	-	-	-	-
31	Piña	-	-	-	-
35	Piña	-	-	-	-
37	Piña	-	-	-	-
40	Piña	-	-	-	-
52	Piña	-	-	-	-
60	Piña	-	-	-	-
61	Piña	-	-	-	-
70	Piña	-	-	-	-
86	Hongos	-	-	-	+
98	Hongos	-	+	+	+
100	Hongos	-	-	-	-
102	Hongos	-	-	-	-
105	Hongos	-	+	+	+

En el séptimo día se lograron observar ascosporas en 7 cepas y en los 2 controles de levadura comercial, pero en el día 15 solamente presentaron estas estructuras las cepas 1, 5, 7, 86, 98 y 105 al igual que el control de panadería como se puede observar en la tabla 7.


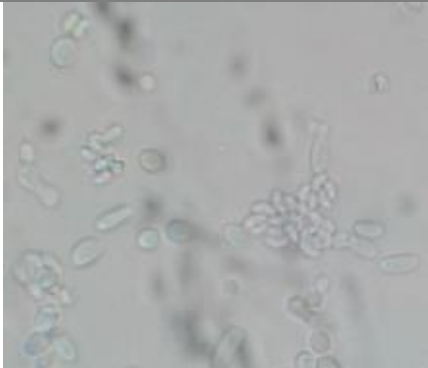
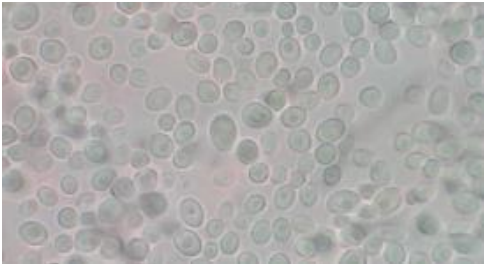
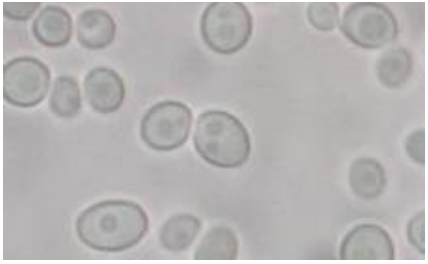
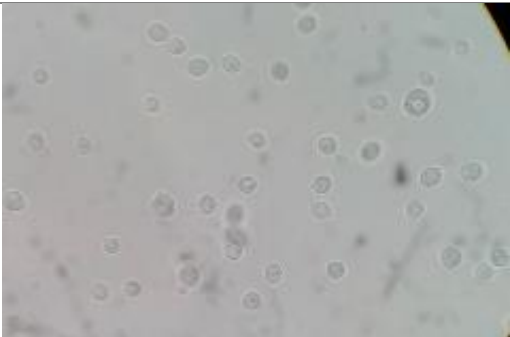
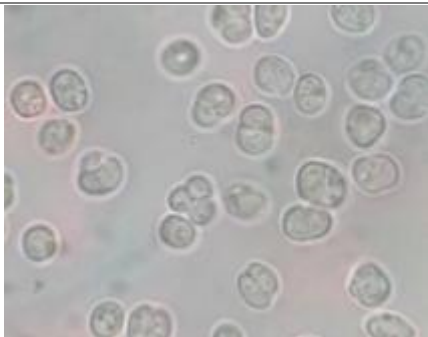
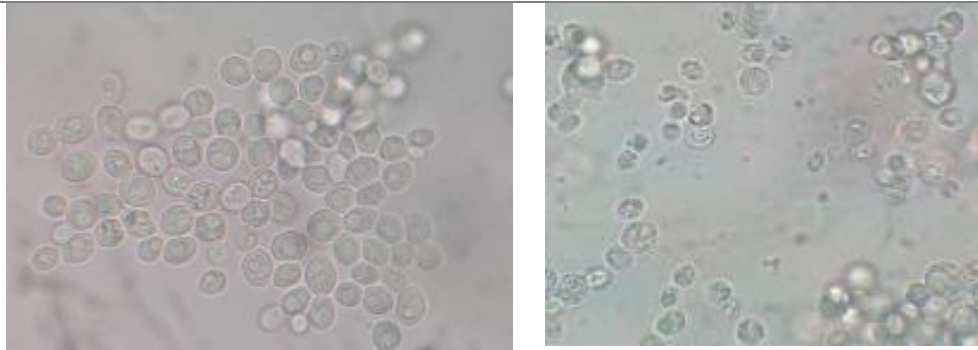
Cepa	Microscopia de levaduras	Microscopia de esporas
105		
86		
Controles <i>S. cerevisiae</i> panadería		

Figura 19. Se muestran los tipos de esporas que se observan al evaluar las cepas en comparación con los controles utilizados para esta prueba. Autoría propia

S.cerevisiae
Safe ale 05



Las levaduras 6, 22 y 86 presentaron estructura de ascosporas solamente en un solo día. En las cepas que presentaron estructuras de ascosporas se observaron dos formas principales: Arriñonadas que se presentaron en dos cepas provenientes de hongos y una de pulque, y redondas pequeñas o punteadas que se pudieron observar en 5 cepas de las cuales 2 pertenecen a ciruela, una de pulque, una de piña y una de hongos (Figura 19), estas estructuras se compararon con los controles utilizados, pero presentaron estructuras diferentes.

7.6. Prueba de tolerancia a etanol

La tolerancia al etanol es una característica fundamental para las levaduras de fermentación ya que este compuesto aumenta gradualmente durante la fermentación y puede llegar a ser tóxico para las levaduras, al interactuar con los fosfolípidos de la membrana celular y causar un aumento en la fluidez de la membrana, esto puede conducir a una filtración del contenido celular en la fermentación afectando el producto final (Marza *et al.* 2002; Weber y de Bont 1996). Esta prueba permitió conocer las levaduras que tienen una mejor tolerancia al etanol lo cual es una característica indispensable en levaduras para fermentaciones, mediante la visualización del crecimiento en medio líquido de las levaduras en una serie de concentraciones de etanol que van del 0 al 12 % comparado contra levaduras control de uso comercial. De las 21 levaduras evaluadas, las cepas 40 y 52 provenientes de muestras de piña (*Ananas comosus*) tuvieron una tolerancia máxima de 10 % y una resistencia de 12 %, las cepas comerciales en cambio lograron tolerar hasta un 12 %. La tolerancia al etanol de las demás levaduras va en orden descendente como se puede observar en el gráfico 4, aunque no se descartan las levaduras que tienen una tolerancia máxima de 8 % (Cepas: 60, 98, 105, 100 y 31) y de 6 % (Cepas: 15, 37, 25, 61, 35, 7 y 70). La cepa 86 del hongo *Byssomerulius corium* tuvo la mayor tolerancia debido a que presentó un crecimiento abundante en concentraciones de hasta 12 % de etanol, una tolerancia igual a la de los controles comerciales.

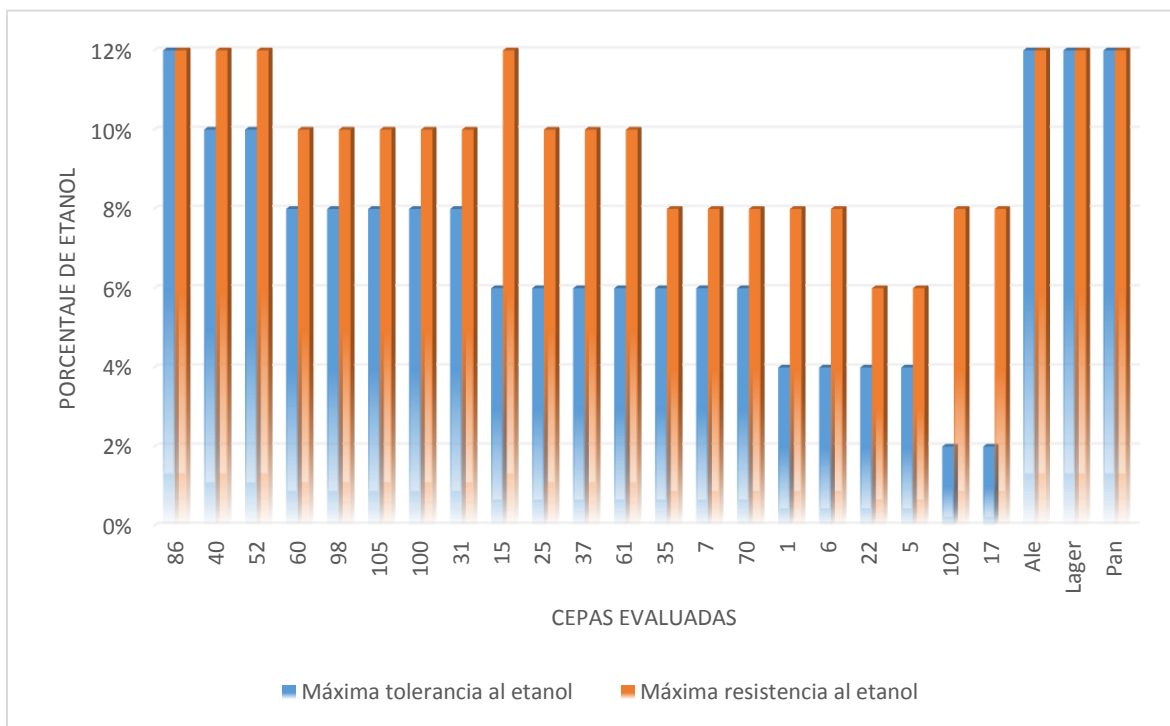


Gráfico 4. Gráfico de tolerancia a etanol de las 21 cepas y controles. Las barras azules muestran la máxima tolerancia al etanol y las barras anaranjadas representan su resistencia máxima al etanol.

7.7. Tolerancia a valores de pH bajos

Los ácidos orgánicos tienen un efecto inhibitorio en su forma disociada. De esta forma el ion H^+ penetra la célula, pero el ácido no disociado $RCOOH$ no puede hacerlo. De este modo la sensibilidad de la levadura a un ácido depende del pH de éste y de la capacidad que tenga de metabolizar o eliminar el ácido si penetra en la célula (Rose, 1987), lo cual depende directamente de las ATPasas de membrana que funcionan como bombas de H^+ (Steward, 2017). 21 cepas seleccionadas (Tabla 8) se colocaron en diferentes valores de pH por 72 horas para conocer su tolerancia máxima, de las cuales 9 cepas tuvieron una máxima tolerancia a un valor de pH de 4.5, sin embargo, las cepas 35, 86, 98 y 105 presentaron una tolerancia máxima a valores de 3.5 estas cepas tuvieron una tolerancia igual a las cepas más control, pero las levaduras con mayor tolerancia fueron las cepas 5, 6, 22, 25, 31, 60 y 100

que toleraron valores de pH de hasta 2.5, presentando mayor tolerancia que los controles de levaduras comerciales. Ninguna cepa pudo tolerar un pH de 2.0.

Tabla 8. Valores de resistencia a pH de las 21 cepas.

Cepa	Origen de la cepa	Máxima tolerancia de pH
1	Pulque	4.5
5	Pulque	2.5
6	Ciruela	2.5
7	Ciruela	4.5
15	Piña	4.5
17	Piña	4.5
22	Piña	2.5
25	Piña	2.5
31	Piña	2.5
35	Piña	3.5
37	Piña	4.5
52	Piña	4.5
60	Piña	2.5
61	Piña	4.5
70	Piña	4.5
86	Hongos	3.5
98	Hongos	3.5
100	Hongos	2.5
102	Hongos	4.5
105	Hongos	3.5
<i>S. cerevisiae</i> ale 05	Control	3.5
<i>S. cerevisiae</i> S-189	Control	3.5
<i>S. cerevisiae</i> panadería	Control	3.5

7.8. Pruebas de termotolerancia

Las levaduras termotolerantes pueden presentar grandes ventajas para la industria debido a que pueden disminuir costos de enfriamiento, presentan mayor actividad metabólica, menores tiempos de fermentación e incluso reducción de subproductos indeseables por lisis celular entre otras (Mejía *et al.*, 2016). De las 21 cepas evaluadas, todas crecieron de forma óptima en el intervalo de 25 ° C a 35 ° C y en esta última temperatura se obtuvo el crecimiento más abundante en comparación con los controles de levaduras comerciales, a la temperatura de 40 °C las cepas 61, 40, 70, 15, 52 y 37 no presentaron crecimiento alguno, aunque 13/21 cepas (61.9%) y los 3 controles crecieron a esta a una temperatura a la cual se consideran termotolerantes. A 45 °C ninguna cepa incluyendo los controles comerciales presentaron crecimiento (tabla 9).

Tabla 9. Resultados de la prueba de termotolerancia en las 21 cepas de levadura y 3 controles. Signo +: Crecimiento Signo -: Sin crecimiento.

Cepa	Origen de la cepa	25° C	30°C	35°C	40°C	45°C
<i>S. cerevisiae ale 05</i>	Control	+	+	+	+	-
<i>S. cerevisiae S-189</i>	Control	+	+	+	+	-
<i>S. cerevisiae panadería</i>	Control	+	+	+	+	-
1	Pulque	+	+	+	+	-
5	Pulque	+	+	+	+	-
6	Ciruela	+	+	+	+	-
7	Ciruela	+	+	+	-	-
15	Piña	+	+	+	-	-
17	Piña	+	+	+	+	-
22	Piña	+	+	+	+	-
25	Piña	+	+	+	+	-
31	Piña	+	+	+	+	-
35	Piña	+	+	+	+	-
37	Piña	+	+	+	-	-
40	Piña	+	+	+	-	-
52	Piña	+	+	+	-	-
60	Piña	+	+	+	+	-
61	Piña	+	+	+	-	-
70	Piña	+	+	+	-	-
86	Hongos	+	+	+	+	-
98	Hongos	+	+	+	+	-
100	Hongos	+	+	+	+	-
102	Hongos	+	+	+	-	-
105	Hongos	+	+	+	+	-

7.9. Análisis del potencial mediante el índice Jaccard

Los resultados obtenidos en las pruebas de tolerancia a etanol, tolerancia a bajos valores de pH y de termotolerancia se analizaron mediante un análisis de disimilaridad por índice de Jaccard para conocer el potencial para producción de cerveza de 21 cepas seleccionadas comparadas contra el control de levadura *S. cerevisiae*. Los datos de estas pruebas además del índice de Jaccard se observan en la tabla 9. Los valores tomados referenciados fueron para etanol de 8% al 12%, temperaturas entre 35 °C y 40 °C y un pH de entre 3.5 y 2.5. Las cepas con mayor potencial deben tener un índice cercano a 1. Las cepas 31, 60 y 100 presentan los mejores resultados teniendo un índice de 1 marcadas en la tabla 10 con color amarillo, aunque hay cepas que tienen un potencial aceptable con un índice de Jaccard 0.66667 como son las cepas 5, 6, 22, 25, 86, 98 y 105, estas cepas tienen características aceptables para pruebas en fermentaciones.

Tabla 10. Valores de evaluación de potencial para cervecería de 21 cepas

Cepa	Origen de la cepa	Máxima tolerancia al etanol (%)	Termotolerancia máxima (° C)	Tolerancia a pH ácido	Índice de Jaccard potencial
1	Pulque	4	40	4.5	0.33333
5	Pulque	4	40	2.5	0.66667
6	Ciruela	4	40	2.5	0.66667
7	Ciruela	6	35	4.5	0
15	Piña	6	35	4.5	0
17	Piña	2	40	4.5	0.33333
22	Piña	4	40	2.5	0.66667
25	Piña	6	40	2.5	0.66667
31	Piña	8	40	2.5	1
35	Piña	6	40	3.5	0.33333
37	Piña	6	35	4.5	0.33333
40	Piña	10	35	3.5	0.33333
52	Piña	10	35	4.5	0.33333
60	Piña	8	40	2.5	1
61	Piña	6	35	4.5	0
70	Piña	6	35	4.5	0
86	Hongos	12	40	3.5	0.66667
98	Hongos	8	40	3.5	0.66667
100	Hongos	8	40	2.5	1
102	Hongos	2	35	4.5	0
105	Hongos	8	40	3.5	0.66667
<i>S. cerevisiae</i> ale 05	Control	12	40	3.5	1
<i>S. cerevisiae</i> S-189	Control	12	40	3.5	1
<i>S. cerevisiae</i> panadería	Control	12	40	3.5	1

7.10. Microfermentación con azúcares de malta

Se determinó la atenuación de azúcares de malta en microfermentadores con 450 mL c/u de mosto a base de extracto de malta amber pils (Figura 20). En el gráfico 5 podemos observar el descenso de grados Brix durante un periodo de 12 días de seguimiento donde los azúcares iniciales se encontraban en una concentración de 12.3 ° Brix; en el caso de la levadura safe ale 05 tuvo un mayor descenso (7.4 °Brix), la cepa de levadura lager S-189 descendió hasta 8.6 °Brix al igual que la levadura de *S. cerevisiae* de panadería (Gráfico 5). Las fermentaciones se llevaron a cabo en temperaturas de entre 19 °C y 20 °C.

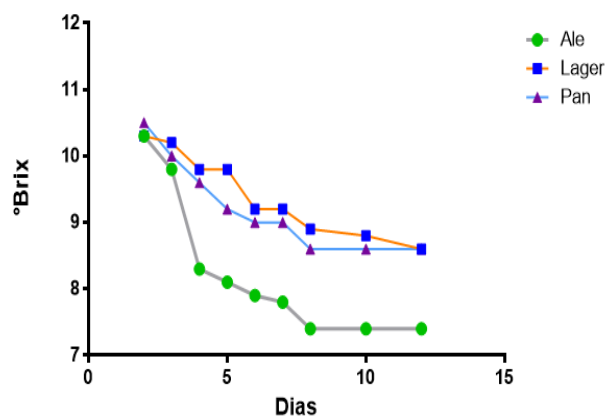


Gráfico 5. Este gráfico muestra la atenuación de azúcares una microfermentación por 3 cepas: saf-ale 05, S189 Lager y *S. cerevisiae* de panadería, comparando su descenso de grados brix durante 12 días



Figura 20. Sistema de Microfermentación. Autoría propia

7.11. Discusión

La búsqueda de levaduras salvajes como agentes de fermentación y la incorporación de estilos de cerveza con fermentación espontánea ha crecido en la producción de cerveza en el mundo, en gran medida debido a que estas levaduras permiten obtener perfiles de sabor nuevos por diferencias en su metabolismo, lo cual otorga originalidad a las cervezas producidas por estos microorganismos. En este trabajo se buscaron levaduras con características que pudieran ser de utilidad en la producción de cerveza y puedan otorgar perfiles de sabores nuevos y únicos a esta bebida.

Se lograron establecer metodologías para el aislamiento de levaduras silvestres a partir de 5 muestras diferentes, mediante el proceso de enriquecimiento y fermentación del sustrato para promover el crecimiento de levaduras, obteniéndose una mayor cantidad de aislamientos de las 5 muestras en comparación con el aislamiento directamente de la muestra. Un 51.02% del total de los aislamientos (98 cepas) crecieron en medio PDA, esto indica que las cepas pueden utilizar azúcares derivados del almidón de papa presente en este medio como glucosa, fructosa y sacarosa (Morales-Fernández *et al*, 2015), estos azúcares también se encuentran en cantidades importantes en las muestras utilizadas para el aislamiento. En este trabajo se seleccionaron 21 levaduras silvestres en base a la semejanza al perfil parcial de utilización de azúcares y prueba de ureasa de *Saccharomyces cerevisiae*. De estos más de la mitad (12/21) proceden de piña que fue el sustrato que presentó más abundancia de cepas aisladas esto se debe a la gran cantidad de azúcares que contiene: 9.24% aproximadamente según datos de la Conferencia de las naciones unidas sobre comercio y desarrollo (CNUCED) en 2013, entre los cuales destacan glucosa, fructosa y sacarosa. Los perfiles de levaduras de piña presentan diferencias entre sí, de igual manera en su morfología, lo que indica que hay una diversidad de especies de levadura en este fruto, esto concuerda con otros autores como Mambuscay M. y colaboradores que en 2013 identificaron una gran variedad de levaduras en zumo de piña como *Wickerhamomyces pijperi*, *Candida boidinii*, *Meyerozyma caribbica*, *Candida pseudointermedia*, *Pichia sp*, *Hanseniaspora pseudo guilliermondii* y *Pichia membranifaciens* por medio de técnicas moleculares.

También se han reportado aislamientos en bebidas fermentadas autóctonas a base de piña como levaduras *S. cerevisiae*, especies de *Candida*, *Pichia* y *Torulospora* por Godoy y colaboradores en el 2003 estas especies también se reportan en pulque.

Los perfiles de asimilación y fermentación de carbohidratos permitieron detectar una semejanza con *S. cerevisiae* y así formar un grupo de levaduras silvestres. En el caso de los aislados de piña, las cepas 70, 52, 40 y 22, la 5 de pulque, la 6 de ciruela y la 100 de hongos, fueron las más cercanas al perfil de *S. cerevisiae*. También se presentaron perfiles parciales semejantes a otras especies de levaduras reportadas por algunos autores como la cepa 37 a *Candida incomunis*, el aislado 31 a *Brettanomyces bruxelensis* o *B. anomalus* basándonos en lo reportado por Michael Lentz y colaboradores en el 2014. La levadura 17 se acerca al género *Kloeckera* basados en los resultados de Ulloa en el 2009. Y finalmente la levadura 60, tiene un perfil y una morfología muy parecida al género *Pichia* según lo reportado por C. P. Kurtzman en 2011.

Las cepas 86, 98, 100 y 105 provienen del hongo *Byssomerulius corium* y sólo la cepa 102 pertenece al hongo *Trametes* sp. Hasta la fecha no se han reportado aislamientos de levaduras en estos hongos. 3 de las 5 cepas aisladas presentaron perfiles semejantes a *S. cerevisiae*, el género *Kloeckera* y *Pichia* (100 102 86, respectivamente) según lo reportado por Ulloa en 2009 y C. Kurtzman en el 2011. Y finalmente con las levaduras restantes provenientes de ciruela y pulque, presenta un perfil más similar al de *S. cerevisiae* y a *Saccharomyces ludwigii*. Las semejanzas de los perfiles obtenidos, con los perfiles reportados por otros autores son evidencia de que tienen fenotipos similares a estas levaduras.

Las cepas 98 y 105 generan esporas además la 98 puede asimilar lactosa y arabinosa. La diversidad en cuanto a metabolismo de los azúcares evaluados y en formación de esporas indica una diversidad de especies de levaduras asociadas a estos hongos en especial a *Byssomerulius corium*, éstas pueden estar asociadas a los estromas donde se ha reportado acumulación de azúcares simples en otros tipos de hongos parásitos de árboles de la especie *Cittaria hariatii* por Ulloa y

colaboradores en el 2009. Estudios realizados en estos hongos y otras muestras de los árboles que parasita este hongo (*Nothofagus*) han servido para dilucidar el origen de las cepas de levadura lager *S. pastorianus* que se cree que es un híbrido entre levaduras salvajes *S. eubayanus* y levaduras domesticadas *S. cerevisiae* (Libkin, 2011).

Con lo que respecta a las levaduras restantes provenientes de ciruela (7 y 6) y pulque (1 y 5), se han reportado estudios microbiológicos de producciones ciruela donde se reportan grandes cargas de hasta 318 unidades formadoras de colonia por gramo de materia seca de este fruto en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C., (CIAD), unidad Culiacán, por lo cual se esperaba obtener algunas levaduras de este fruto. Este fruto contiene aproximadamente un 7.8% de azúcares de los cuales la glucosa se encuentra en mayor cantidad seguido por fructosa, debido a esto las cepas lograron aislarse en medio PDA ya que contiene azúcares similares, pero en mayor proporción según el estudio realizado por Morillas y Delgado en él 2012. Aunque actualmente no hay reportes de aislamientos evaluados para fermentaciones, hay antecedentes de bebidas prehispánicas fermentadas como el “chuanuco” o el “jobo” donde se hacen fermentar frutos de especie *Spondias mombin* (especie de ciruela), *Prunus pérsica* (especie de durazno) (Godoy *et al*, 2003), la cepa 6 y 7 provienen de ciruela y tienen perfiles similares al control, aunque la 6 presenta un perfil con mayor similaridad al de *S. cerevisiae*.

El pulque es una bebida fermentada de manera espontánea y en el cual se esperaba encontrar bacterias como *Zymomonas sp*, *Leuconostoc sp* y una gran cantidad de levaduras *Saccharomyces sp*, según lo reportado por Cervantes y colaboradores en el 2008 y además de especies de *Saccharomyces* se pueden encontrar géneros como *Pichia*, *Candida*, *Kloeckera*, *Rodothorula* y *Kluyveiomyces* según lo reportado por Godoy en el 2003. Las cepas 1 y 5 provienen de muestras de pulque la 5 presenta un perfil altamente similar a *S. cerevisiae* inclusive por índice de Jaccard de 0.8889, aunque también concuerda con lo reportado por Kurtzman en el 2011 para la levadura *Saccharomyces ludwigii*. La cepa 1 tiene la capacidad de asimilar

y fermentar lactosa una característica de la levadura *Kluyveromyces*, además produce esporas en forma de gajos de naranja.

Las pruebas de ascosporas mostraron diferentes tipos de esporas, aunque ninguna coincide con las características de la levadura control ale 05, según lo reportado por Graham G. Steward en 2017, las ascosporas en levaduras de cerveza sólo se observan en pequeños periodos debido a que vuelven a fusionarse inmediatamente después de formarse las esporas, aunque hay algunas que formaron esporas estables en forma de gajos de naranja (levaduras 1, 98 y 105) estas estructuras pueden diferenciarse en algunos géneros y son de gran importancia para la obtención de levaduras haploides.

Mediante los resultados obtenidos en las pruebas de potencial para producción de cerveza, pudimos observar que 13 de las 21 cepas lograron crecer en una temperatura de 40° C, lo cual ya se ha reportado por Koedrith et al. en 2008 considerándose termotolerantes. Temperaturas de incubación mayores a los 37°C pueden conducir a la reducción o deterioro de la floculación, ya que este tipo de estrés afecta directamente a la mitocondria de la levadura e indirectamente sobre la estructura de la membrana celular afectando la secreción de lectinas, reduciendo la floculación en levaduras no tolerantes (Steward 2014). Las 8 restantes crecieron hasta los 35° C. Las 13 levaduras termotolerantes pueden tener ventajas en la industria tales como reducción de contaminación y costos de enfriamiento, mayor viabilidad, actividad metabólica y velocidad de fermentación, mayor mantenimiento de condiciones anaerobias al disminuir la solubilidad de CO_2 , disminuir la viscosidad del medio de fermentación y la reducción de compuestos indeseables debido a lisis celular (Fernández et al., 2008). Los aislamientos obtenidos pueden tener potencial para fermentaciones tipo ale que necesiten llevarse a cabo en temperaturas superiores. En 2007 se reportaron levaduras de destilerías cubanas por Xiomara Álvarez y colaboradores del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), que pueden fermentar de 37°C a 40°C, sin afectar el rendimiento de alcohol producido, pero se necesitan hacer más pruebas para determinar el potencial de nuestras cepas en fermentación debido a que las altas

temperaturas propician la síntesis de alcoholes superiores (Hiralal *et al*, 2014) por la levadura lo que puede modificar los perfiles organolépticos finales de la cerveza.

La tolerancia a bajos pHs se encuentra asociada a la membrana celular donde ATPasas actúan como bombas de protones y permiten mantener un pH intracelular estable para la levadura, esta bomba juega un papel importante en la proliferación celular y en la regulación de la fermentación (Heggart *et al*. 2000). El gradiente [H⁺] transmembrana que se genera es la fuerza impulsora para el transporte de nutrientes importantes, por ejemplo, maltosa, maltotriosa y aminoácidos en la célula de levadura (Steward, 2017). La tolerancia a pHs que muestran las levaduras evaluadas va de 4.5 hasta 2.5, lo cual muestra un buen rango de tolerancia. El rango de pH óptimo para levaduras va de 5.0 a 3.0 (Jin y Spears, 2000), aunque en fermentaciones con inóculos mixtos como bacterias del género *lactobacillus* y otras levaduras no-*Saccharomyces* para producción de cervezas ácidas como estilos Lambic, Gueze y Flandes, el pH final puede llegar hasta 3.2. Se obtuvieron 7 cepas (5, 6, 22, 25, 21, 60 y 100) tolerantes a pH de 2.5 que fue el menor pH tolerado, ya que ninguna cepa pudo tolerar un pH de 2.0. En aislamientos a partir de fruta madura según lo reportado por Michael Lentz y colaboradores en el 2014 se encontraron levaduras tolerantes hasta pHs de 2.4, pero ninguna toleró el 1.9.

La tolerancia al etanol que presentaron las 21 levaduras va desde el 2% al 12% de etanol de acuerdo a la guía de estilos de la BJCP (Beer Judge Certification Program), así como los estilos van en un rango de contenido de alcohol desde <2 % a >9%. La cepa 86 pudo tolerar el 12% al igual que los controles de levadura de cerveza safe ale 05 y S-189 (Lager), las cepas 40 y 52 presentaron una tolerancia de 10%, las cepas 60, 98, 100, 105 y 31 presentaron una tolerancia al etanol de 8%. En aislamientos de levaduras a partir de fruta reportado y sometidas a diferentes concentraciones de etanol, las cepas más tolerantes reportadas por Chiranjeevi Tikka en el 2013 y por Michael Lentz en el 2014 toleraron hasta un 12% de etanol v/v al igual que la cepa 86. Las levaduras tolerantes al etanol presentan diferencias en la pared celular que les permite tolerar concentraciones altas de etanol, este compuesto afecta la estructura de la membrana celular causando rupturas en ésta

y provocando que salga el contenido celular además de que el etanol intracelular es altamente tóxico para la levadura generando daños a nivel mitocondrial (Steward, 2017). Esta cualidad presente en algunas de nuestras cepas puede ser de interés en la producción de cervezas con un alto grado alcohólico como cervezas de doble fermentación, cervezas de guarda o en estilos de “barley wyne” e incluso en fermentaciones de bebidas destiladas.

Las cepas de levaduras silvestres aisladas, seleccionadas y evaluadas en este trabajo presentan características que evidencian su potencial para producción de cerveza, algunas cepas presentan similitud mayor a otros géneros de levaduras no- *Saccharomyces*, como por ejemplo la 37 a *Candida*, la 31 a *Bretanomyces* y la 1 a *Kluyveromyces*, estos géneros levaduras ya se han utilizado y determinado características que aportan a cervezas como aromas y sabores (Osburn *et al*, 2016). Sin embargo, hay otros como los perfiles de las cepas 17 y 102 que son parecidos a *Kloeckera*, este género no se reporta con utilización en cerveza, pero si en otras fermentaciones como en vinos aportando una mayor complejidad de sabores a la bebida, también se encontraron perfiles parecidos a *Pichia* y esta levadura se ha utilizado como modelo de estudios genéticos y producción de proteínas heterólogas. Esto que se realizó no determina la taxonomía de los aislados y es conveniente realizarla por metodología molecular para verificarla.

Aún falta realizar pruebas de fermentación con maltas o azúcares de malta para conocer su capacidad para fermentar mostos. Las cepas 98 y 100 son las que presentaron tanto un perfil que puede fermentar azúcares como glucosa y sacarosa, una buena tolerancia a etanol, pHs bajos y a temperaturas de 40 °C. En este trabajo también se realizó un modelo para poder evaluar las levaduras en microfermentaciones, en el cual se puede hacer un seguimiento de la atenuación de los azúcares. Sin embargo, falta realizar una evaluación de todas cepas para conocer su potencial en fermentación. Los estudios relacionados con el aislamiento y evaluación de levaduras silvestres en nuestro país son escasos, sin embargo, en este trabajo se han establecido metodologías que pueden ayudar a continuar con la búsqueda de levaduras salvajes que con potencial uso en la industria.

8. Conclusiones

- Se logró establecer una metodología para el aislamiento de cepas de levaduras silvestres de una variedad de sustratos diferentes, que permite seleccionar de una gran población a las que tengan potencial para ser evaluadas en producción de cerveza, basadas en su metabolismo de carbohidratos y en su capacidad para tolerar tres tipos de estrés presentes en la fermentación.
- Se conformó una colección de 98 cepas silvestres con características macro y microscópicas levaduriformes a partir de *Ananas comosus* (piña), *Prunus cerasifera* (ciruela), *Agave angustifolia* (espadín), pulque y cinco especies de hongos lignícolas.
- Se obtuvieron 21 perfiles bioquímicos parciales semejantes a *Saccharomyces cerevisiae*. Las cepas 100, 70, 52, 40, 22, 5 y 6 con una mayor similitud.
- Se seleccionaron 3 cepas (100, 31 y 60) con muy buenas características de potencial para cervecería. Sin embargo, no se descartan las cepas 5, 6, 22, 25, 86, 98 y 105 ya que presentaron características interesantes para la industria.
- La cepa 100 aislada de *Byssomerulius corium* tienen un perfil muy similar a *S. cerevisiae* y además presento muy buenas características de potencial para cervecería.
- Primer aislamiento de levaduras a partir de hongos basidiomicetos en nuestro país.

9. Bibliografía

Alcázar Valle, Elba Monserrat y Gschaedler Anne. (2011) Capacidades fermentativas y generación de volátiles de cepas de levaduras aisladas en diferentes estados productores de mezcal. Repositorio institucional CIATEJ <http://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1023/91>.

Arnold WN (1991) Periplasmic space. In: Rose AH, Harrison JS (eds) The yeasts, vol 4. Academic Press, London, pp 279–293.

Assis LJ, Zingali RB, Masuda CA, Rodrigues SP, Montero-Lomelí M (2013) Pyruvate decarboxylase activity is regulated by the Ser/Thr protein phosphatase Sit4p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res 13(6):518–528.

Augusto Godoy, Teófilo Herrera, Miguel Ulloa. (2003). Mas allá del pulque y el tepache, Las bebidas alcohólicas no destiladas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de investigaciones antropológicas.

Bai FW, Chen LJ, Zhang Z, Anderson WA, Moo-Young M (2004) Continuous ethanol production and evaluation loss under very high gravity medium conditions. J Biotechnol 110:287–293.

Rios-Resendiz, Y., Trejo-Márquez, M.A.*, Lira-Vargas, A.A.; Pascual-Bustamante, S. Aprovechamiento de levadura enológica nativa no-saccharomyces para su uso como agentes fermentativos en elaboración de cerveza artesanal . RESUMEN : ABSTRACT : (2018), 3, 108–113.

Bellon, J. R., Schmid, F., Capone, D. L., Dunn, B. L., & Chambers, P. J. (2013). Introducing a New Breed of Wine Yeast : Interspecific Hybridisation between a Commercial *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast and *Saccharomyces mikatae*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062053>.

Bennetzen JL, Hall BD (1982) The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase. J Biol Chem 257(6):3018–3025.

Bisping B, Rehm HJ (1986) Glycerol production by cells of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in sintered glass. Appl Microbiol Biotechnol 23:174–179.

Bokulich, N. A., & Bamforth, C. W. (2013). The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(2), 157–172. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00060-12>.

- Boulton C, Quain DE (ed). 2001. *Brewing yeast and fermentation*. Blackwell, Oxford, United Kingdom.
- Brown HT (1916) Reminiscences of fifty years' experience of the application of scientific method to brewing practice. *J Inst Brew*:22: 267–22: 354.
- Briefs, S., & Biochemistry, I. N. *SPRINGER BRIEFS IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY Biochemistry of Beer Fermentation*.
- C. P. Kurtzman, J. W. Fell, T. Boekhout. (2011). *The yeasts, a taxonomy study*, volumen 1, Quinta edicion. Editorial Elsevier.
- Caterine, L., & Echeverry, S. (2015). Aislamiento y caracterización de levaduras presentes en el fruto del *Syzygium malaccense* (L .) Merr . & L . M Perry Isolation and characterization of yeasts present in the mountain apple *Syzygium malaccense* (L .) Merr . & L . M Perry in commune 1 of Neiva- Huila, 13(1), 37–45.
- Cerón Montes, Genaro Iván, Balderas Lopez, Jose Abraham, Suaso Abarca, Samuel. (2007). Aislamiento, caracterización y pruebas de fermentación en cultivo puro y mixto de levaduras de tepache. Tesis profesional, unidad profesional interdisciplinaria de biotecnología. Instituto Politecnico Nacional.
- Cervantes-Contreras M. Pedroza A. M. (2008). caracterización microbiológica del pulque y cuantificación de etanol mediante espectroscopía Raman. Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales.
- Chandrasena, G., Keerthipala, A. P., & Walker, G. M. (2006). Isolation and characterisation of Sri Lankan yeast germplasm and its evaluation for alcohol production. *Journal of the Institute of Brewing*, 112(4), 302–307. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2006.tb00735.x>.
- Cronwright GR, Rohwer JM, Prior BA (2002) Metabolic control analysis of glycerol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 68:4448–4456.
- Daenen L, Saison D, Sterckx F, Delvaux FR, Verachtert H, Derdelinckx G. 2008. Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* brewing yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 104:478–488.
- Dague E, Bitar R, Ranchon H, Durand F, Yken HM, Francois JM (2010) An atomic force microscopy analysis of yeast mutants defective in cell wall architecture. *Yeast* 27:673–684.
- De Nobel JG, Klis FM, Priem J, Munnik T, Van den Ende H (1990) The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 6:491–499.
- Dufour JP (1994) Higher alcohols, acids and ester secretion during yeast growth. In: 6th Jean De Clerck Chair, Leuven, Belgium. Academic Press, Waltham, pp 1–40.

Fernández, T., M. Marcet, W. Olivera y C. Martín, Aislamiento y evaluación de cepas termotolerantes de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de aguardientes y ron. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 6(1), 64-70 (2008).

González-Leos, Adrián, Del Angel-Del Angel José Alfredo, González-Castillo José Luis, Rodríguez-Durán Nadia, Bustos-Vázquez, Guadalupe (2017). Evaluación de levaduras nativas productoras de etanol presentes en el bagazo de caña de azúcar. *CienciaUAT*, vol. 11.

Gibson BR, Lawrence SJ, Leclaire JP, Powell CD, Smart KA (2007) Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol Rev* 31(5):535–569. doi:[10.1111/j.1574-6976.2007.00076.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00076.x).

Heggart H, Margaritis A, Pilkington H, Stewart RJ, Sobczak H, Russell I (2000) Measurement of brewing yeast viability and vitality: a review of methods. *MBAA Tech Quart* 37:409–430.

Heinisch JJ (2005) Baker's yeast as a tool for the development of antifungal kinase inhibitors—targeting protein kinase C and the cell integrity pathway. *Biochim Biophys Acta* 1754:171–182.

Hiralal L, Olaniran AO, Pillay B (2014) Aroma-active ester profile of ale beer produced under different fermentation and nutritional conditions. *J Biosci Bioeng* 117:57–64.

Hornsey I (2004) *A history of beer and brewing*, vol 1. Royal Society of Chemistry, Cambridge
Landaud S, Latrille E, Corrieu G (2001) Top pressure and temperature control the fusel alcohol/ ester ratio through yeast growth in beer fermentation. *J Inst Brew* 107(2):107–117.

Hough, J. S. (1990). *Biotechnology de la cerveza y de la malta*.

Inoue T (ed). 2008. *Diacetyl in fermented foods and beverages*. American Society of Brewing Chemists, St. Paul, MN.

Jin Y, Speers RA (2000) Effect of environmental conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Am Soc Brew Chem* 58:108–116.

Kayode APP, Vieira-Dalode G, Linneman AR, Kotchoni SO, Hounhouigan AJD, van Boekel MAJS, Nout MJ. 2011. Diversity of yeasts involved in the fermentation of tchoukoutou, an opaque sorghum beer from Benin. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5:2737–2742.

Kirsop BH. 1977. Yeast lipids and beer flavor. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 14:227–230.

- Klopper WJ, Angelino S, Tuning B, Vermeire HA. 1986. Organic-acids and glycerol in beer. *J. Inst. Brew.* 92:225–228.
- Koedrith, P., E. Dubois, B. Scherens, E. Jacobs, C. Boonchird y F. Messenguy, Identification and characterization of a thermotolerant yeast strain isolated from banana leaves, doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2008.34.147, *Science Asia*, 34, 147-152 (2008).
- Kutyna DR, Varela C, Stanley GA, Borneman AR, Henschke PA, Chambers PJ (2012) Adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* to generate strains with enhanced glycerol production. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1175–1184.
- Landaud S, Latrille E, Corrieu G. 2001. Top pressure and temperature control the fusel alcohol/ester ratio through yeast growth in beer fermentation. *J. Inst. Brew.* 107:107–117.
- Lentz, M., Putzke, T., Hessler, R., & Luman, E. (2014). Genetic and physiological characterization of yeast isolated from ripe fruit and analysis of fermentation and brewing potential. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(4), 559–564. <https://doi.org/10.1002/jib.154>.
- Lewandowski, C. M. (2015). Diseño de una planta de elaboración de cerveza artesanal para consumo directo ce. Microcervecería. *The Effects of Brief Mindfulness Intervention on Acute Pain Experience: An Examination of Individual Difference*, 1. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Libkind, D., Hittinger, C. T., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., ... Sampaio, J. P. (2011). Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(35), 14539–14544. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105430108>.
- Lowenstein JM (1969) *Methods in enzymology*, vol 13: Citric acid cycle. Academic Press, Boston.
- Luz Adriana Mambuscay M., William Andrés López A., Raúl Alberto Cuervo M., Francisco E. Argote V., Esteban Osorio C. (2013). Identificación de las levaduras nativas presentes en zumos de piña, mora y uva. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial Edición Especial No. 2* (136 - 144).
- Lyness CA, Steele GM, Stewart GG. 1997. Investigating ester metabolism: characterization of the ATF1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 55:141–146.
- Maoura N, Mbaiguinam M, Nguyen HV, Gaillardin C, Pourquoi J. 2005. Identification and typing of the yeast strains isolated from bili bili, a traditional sorghum beer of Chad. *Afr. J. Biotechnol.* 4:646–656.

Martens H, Dawoud E, Verachtert H. 1991. Wort enterobacteria and other microbial populations involved during the first month of lambic fermentation. *J. Inst. Brew.* 97:435– 439.

Martens H, Dawoud E, Verachtert H. 1992. Synthesis of aroma compounds by wort enterobacteria during the first stage of lambic fermentation. *J. Inst. Brew.* 98:421– 425.

Marza E, Camougrand N, Manon S (2002) Bax expression protects yeast plasma membrane against ethanol induced permeabilization. *FEBS Lett* 521:47–52.

Mejía-Barajas, Jorge A., Rocío Montoya-Pérez, Christian Cortés-Rojo, Alfredo Saavedra-Molina. (2016). Levaduras Termotolerantes: Aplicaciones Industriales, Estrés Oxidativo y Respuesta Antioxidante. *Información Tecnológica* Vol. 27(4), 3-16 (2016) doi: 10.4067/S0718-07642016000400002.

Miracle RE, Ebeler SE, Bamforth CW. 2005. The measurement of sulfur-containing aroma compounds in samples from production-scale brewery operations. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 63:129 –134.

Miranda-Castilleja, D. E., Ortiz-Barrera, E., Arvizu-Medrano, S. M., Ramiro-Pacheco, J., Aldrete-Tápia, J. A., & Martínez-Peniche, R. A. (2015). Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces* spp. nativas de viñedos en Querétaro, México. *Agrociencia*, 49(7), 759–773.

Morillas-Ruiz JM y Delgado Alarcón JM. (2012). Análisis nutricional de alimentos vegetales con diferentes orígenes: Evaluación de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales. Dpto. Tecnología de la alimentación y nutrición. Univ. católica San Antonio de Murcia.

Morales-Fernández, S. D., Mora-Aguilar, R., Salinas-Moreno, Y., Rodríguez-Pérez, J. E., Colinas-León, M. T., & Lozoya-Saldaña, M. T. (2015). Growth, yield and sugar content of potato tubers at different physiological ages. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 21(2), 129–146. doi: 10.5154/r.rchsh.2014.06.031

Morris GJ, Winters L, Coulson GE, Clarke KJ (1986) Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* 132:2023–2034.

Mortimer R, Romano P, Suzzi G, Polsinelli M (1994) Genome renewal: a new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* from natural fermentation of grape musts. *Yeast*, 10, 1543–1552.

Naseeb, S., James, S. A., Alsammar, H., Michaels, C. J., Gini, B., Nueno-palop, C., ... Delneri, D. (2017). *Saccharomyces jurei* sp. nov., isolation and genetic identification of a novel yeast species from *Quercus robur*, 2046–2052. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002013>.

Nikulín, J., Krogerus, K., & Gibson, B. (2018). Alternative *Saccharomyces*

- interspecies hybrid combinations and their potential for low-temperature wort fermentation, (August 2017), 113–127. <https://doi.org/10.1002/yea>.
- Nordstrom K (1966) Yeast growth and glycerol formation, carbon and redox balances. *Acta Chem Scand* 20:6–15.
- Omori T, Umemoto Y, Ogawa K, Kajiwara Y, Shimoda M, Wada H 1997. A novel method for screening high glycerol- and ester-producing brewing yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) by heat shock treatment. *J. Ferment Bioeng.* 83:64–69.
- Osburn, K., Ahmad, N. N., & Bochm, M. L. (2016). *The Wild , Wild World of Wild Yeast*, (January 2016).
- Osumi M (1998) The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron* 29:207–233.
- Pasteur L (1873) Manufacture of beer and yeast. US Patent 141,072, 9 May 1873.
- Pedram Samani¹, Etienne Low-Decarie², Kyra McKelvey³, Thomas Bell⁴, Austin Burt⁴, Vassiliki Koufopanou⁴, Christian R. Landry⁵ & Graham Bell¹. Metabolic variation in natural populations of wild yeast. *Ecology and Evolution* 2015. doi: 10.1002/ece3.1376.
- Peris, D., & Pérez-torrado, R. (2018). On the origins and industrial applications of *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* hybrids, (October 2017). <https://doi.org/10.1002/yea.3283>.
- Pires EJ, Teixeira JA, Brańnyik T, Vicente AA (2014) Yeast: the soul of beer's aroma-a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:1937–1949.
- Procopio S, Qian F, Becker T. 2011. Function and regulation of yeast genes involved in higher alcohol and ester metabolism during beverage fermentation. *Eur. Food Res. Technol.* 233:721–729.
- Quain DE, Tubb RS (1982) The importance of glycogen on brewing yeasts. *MBAA Tech Quart* 19:29–33.
- Quain DE, Thurston PA, Tubb RS (1981) The structural and storage carbohydrates of *Saccharomyces cerevisiae* changes during fermentation of wort and a role for glycogen metabolism in lipid synthesis. *J Inst Brew* 87:108–111.
- Rank GH, Robertson AJ (1983) Protein and lipid composition of the yeast plasma membrane. In: Spencer JFT, Spencer DM, Smith ARW (eds) *Yeast genetics, fundamental and applied aspects*. Springer, Berlin, pp 225–241.
- Sicard, D., & Legras, J. L. (2011). Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Comptes Rendus - Biologies*,

334(3), 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.12.016>.

Spaepen M, Vanoevelen D, Verachtert H. 1978. Fatty acids and esters produced during spontaneous fermentation of lambic and gueuze. *J. Inst. Brew.* 84:278 – 282.

Stoupis T, Stewart GG, Stafford RA (2002) Mechanical agitation and rheological considerations of ale yeast slurry. *J Am Soc Brew Chem* 60:58–62.

Saerens SM, Delvaux F, Verstrepen KJ, Van Dijck P, Thevelein JM, Delvaux FR (2008a) Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl Environ Microbiol* 74(2):454–461.
doi:[10.1128/AEM.01616-07](https://doi.org/10.1128/AEM.01616-07)

Steensels, J., Snoek, T., Meersman, E., Nicolino, M. P., Voordeckers, K., & Verstrepen, K. J. (2014). Improving industrial yeast strains: Exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), 947–995.
<https://doi.org/10.1111/1574-6976.12073>.

Stewart, G. G. (2017). *Brewing and Distilling Yeasts*. editorial Springer.

Sosa E, Aranda C, Riego L, Valenzuela L, DeLuna A, Cantu JM, Gonzalez A (2003) Gcn4 negatively regulates expression of genes subjected to nitrogen catabolite repression. *Biochem Biophys Res Commun* 310(4):1175–1180.

Thomson JM, Gaucher EA, Burgan MF, De Kee DW, Li T, Aris JP, Benner SA (2005) Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Nat Genet* 37(6):630–635.doi:[10.1038/ng1553](https://doi.org/10.1038/ng1553).

Tikka, C., Osuru, H. P., Atluri, N., Raghavulu, P. C. V., Yellapu, N. K., Mannur, I. S., ... Bhaskar, M. (2013). Isolation and characterization of ethanol tolerant yeast strains. *Bioinformation*, 9(8), 421–425.
<https://doi.org/10.6026/97320630009421>.

Ulloa, J., Libkind, D., & Fontenla, S. (2009). L Evaduras Fermentadoras Aisladas De C Yttaria Hariotii (F Ungi) En Bosques a Ndino -P Atagónicos (a Rgentina), 44, 239–248.

Valero, E., Cambon, B., Schuller, D., Casal, M., & Dequin, S. (2007). Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts, 7(1999), 317–329.
<https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00161.x>.

Van Mulders SE, Christianen E, Saerens SM, Daenen L, Verbelen PJ, Willaert R, Verstrepen KJ, Delvaux FR (2009) Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 9:178–190.

Van Oevelen D, Delescaille F, Verachtert H. 1976. Synthesis of aroma compounds during spontaneous fermentation of lambic and gueuze. *J. Inst. Brew.* 82:322–326.

Vanderhaegen V, Neven H, Coghe S, Verstrepen KJ, Verachtert H, Derdelinckx G (2003) Evolution of chemical and sensory properties during aging of top-fermented beer. *J Agric Food Chem* 51:6782–6790.

Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H, Delvaux FR. 2003. Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61:197–205.

Walker MD, Simpson WJ. 1993. Production of volatile sulfur compounds by ale and lager brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett. Appl. Microbiol.* 16:40–43.

Weber FJ, de Bont JA (1996) Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim Biophys Acta* 1286:225–245.

Weusthuis RA, Visser W, Pronk JT, Scheffers WA, van Dijken JP (1994) Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts: a continuous-culture study of the Kluyver effect. *Microbiology* 140(Pt 4):703–715.

Wills C (1976) Production of yeast alcohol dehydrogenase isoenzymes by selection. *Nature* 261(5555):26–29.

Xiomara Álvarez, Norka Fundora y Yaima Izquierdo. (2007). Aislamiento e identificación de una cepa de levadura con efecto killer. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).

Yamamoto, H., Morimura, S., Mizutani, M., Yamada, K., Ochi, H., Takayama, K., ... Brew, J. I. (2011). Isolation and Characterization of Shochu Yeasts with Superior Brewing Ability from Shochu Mash, *117*(4), 627–633.

Anexos

Anexo 1: Aislamientos

Numero de cepa	Nombre	Fruto o muestra	Fecha de aislamiento (día)	Técnica	Medio	Colonia	Célula
1	Pulque V8 A	Pulque	FP 31/05/16	Enriquecimiento (V8)	PDA	Colonias algo grandes y extendidas, blancas, convexas, con bordes ondulados y una textura cremosa	Células grandes y ovaladas, con un punto grande y claro en el centro, y una sola gemación
2	Pulque V8 B	Pulque	FP 31/05/16	Enriquecimiento (V8)	PDA	Colonias no muy grandes, blancas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y ovaladas, con un punto grande y claro en el centro, y una sola gemación
3	Pulque C	Pulque	FP 31/05/16	Siembra directa	PDA	Colonias algo grandes y extendidas, blancas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa y suave	Células grandes y ovaladas, con un punto grande y claro en el centro, y una sola gemación
4	Pulque B	Pulque	FP 31/05/16	Siembra directa	PDA	Colonias pequeñas y extendidas, blancas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, con un punto grande en el centro, y una sola gemación
5	Sed V8 A	Pulque	FP 01/06/16	Enriquecimiento (V8)	PDA	Colonias algo grandes, blancas, redondas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, con un punto grande y claro en el centro, y una sola gemación
6	Ciruela 1 B	Ciruela	FP 31/05/16	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias redondas, blancas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa y brillante	Células grandes y redondas, con un punto no muy grande en el centro, y una gemación múltiple
7	Ciruela 1 A	Ciruela	FP 31/05/16	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias pequeñas, redondas, blancas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa y brillante	Células grandes redondas, con núcleos grandes, y una gemación monopolar
8	Ciruela 1 C	Ciruela	FP 31/05/16	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias pequeñas, redondas, blancas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa y brillante	Células grandes y redondas, con núcleos grandes, y una gemación monopolar
9	Ciruela 1 D	Ciruela	FP 31/05/16	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias, blancas, redondas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa y brillante	Células grandes y redondas, con núcleos grandes y claros, y una gemación multipolar
10	Ch2 V8 A	Cerveza Chaneque	FP 31/05/16	Enriquecimiento (V8)	PDA	Colonias, blancas mate, redondas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, con núcleos pequeños y blancos, y una gemación monopolar
11	Osadía V8 02	Cerveza Osadía	FP 31/05/16	Enriquecimiento (V8)	PDA	Colonias, blancas, redondas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa y brillante	Células grandes y redondas, con núcleos grandes, y una gemación monopolar
12	Osadía V8 03	Cerveza Osadía	FP 31/05/16	Enriquecimiento (V8)	PDA	Colonias redondas, blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con núcleos grandes y claros, y una gemación monopolar
13	Osadía dir A2	Cerveza Osadía	FP 31/05/16	Siembra directa	PDA	Colonias redondas, blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con núcleos grandes, y una gemación monopolar
14	Piña 2 03	Piña	FP 31/05/16	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias redondas, blancas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa y brillante	Células ovaladas y alargadas, con núcleos grandes y grises, y una gemación monopolar
15	Piña 2 01	Piña	FP 31/05/16	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias redondas, blancas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa y brillante	Células grandes y redondas, con núcleos grandes y claros, y una gemación monopolar
16	Piña 2 b4	Piña	FP 31/05/16	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias no muy grandes y redondas, blancas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa y suave	Células alargadas, con núcleos pequeños y oscuros, y una gemación monopolar.
17	F-piña A	Piña	FP 31/05/16	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células muy grandes de forma redondeada, pero con bordes irregulares, con núcleos pequeños y oscuros, y una gemación monopolar
18	F-piña B	Piña	FP 31/05/16	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias algo grandes, blancas brillantes, redondas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y alargadas, con núcleos no muy grandes, y una gemación monopolar
19	F piña C	Piña	FP 31/05/16	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias blancas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, con núcleos grandes y claros, y una gemación monopolar
20	F-piña D	Piña	FP 31/05/16	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias blancas mate, redondas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas un poco ovaladas, con núcleos grandes, y una gemación monopolar
21	Piña 1 diluciones A	Piña	FP 31/05/16	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas un poco ovaladas, con núcleos grandes, y una gemación monopolar
22	Piña 1 diluciones B	Piña	FP 31/05/16	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, con núcleos grandes, y una gemación monopolar
23	Piña 1 diluciones C	Piña	FP 31/05/16	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, con núcleos grandes y grises, y una gemación monopolar
24	Piña 1 diluciones D	Piña	FP 31/05/16	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias algo grandes, blancas brillantes, redondas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, con núcleos grandes y grises, y una gemación multipolar

Numero de cepa	Nombre	Fruto o muestra	Fecha de aislamiento (día)	Técnica	Medio	Colonia	Célula
25	Piña 1 diluciones E	Piña	FP 31/05/16	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias algo grandes, blancas brillantes, redondas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes, y una gemación monopolar
26	PAN	Levadura	FP 14/06/16	Siembra directa	PDA	Colonias algo grandes, blancas, redondas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa y suave	Células grandes redondas, con vacuolas grandes, y una gemación monopolar
27	Piña 1 diluciones F	Piña	FP 31/05/16	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias algo grandes, blancas brillantes, redondas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y ovaladas, con vacuolas grandes y claras, y una gemación monopolar
28	E491	Levadura	FP 17/06/16	Siembra directa	PDA	Colonias blancas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes, y una gemación monopolar
29	A	Piña	26/08/16 (1)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	Agar nutritivo	Colonias blancas, convexas, con bordes lisos y una textura mucosa brillante	Células grandes y ovaladas, con vacuolas grandes y claras, y una gemación monopolar, y algunas se unen una tras otra como una pseudohifa
30	B	Piña	26/08/16 (1)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	Agar nutritivo	Colonias algo grandes y extendidas, blancas mate, convexas, con bordes lisos e irregulares y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes, y una gemación monopolar
31	C	Piña	27/08/16 (2)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	Agar nutritivo	Colonias grandes, blancas un poco amarillentas, redondas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa y brillante	Células grandes y ovaladas, con núcleos grandes y oscuros, y una gemación monopolar
32	D	Piña	27/08/16 (2)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	Agar nutritivo	Colonias blancas, convexas, con bordes lisos y una textura mucosa y brillante	Células grandes y ovaladas, con vacuolas grandes y claras, y una gemación monopolar, y algunas se unen una tras otra como una pseudohifa
33	E	Piña	27/08/16 (2)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	Agar nutritivo	Colonias blancas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes, ovaladas y alargadas, con vacuolas grandes y grises, y una gemación monopolar
34	F	Piña	31/08/16 (6)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	Agar nutritivo	Colonias algo grandes y extendidas, blancas mate, convexas, con bordes lisos e irregulares y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes y grises, y una gemación monopolar
35	G	Piña	17/08/16 (2)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	V8	Colonias blancas y brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes, ovaladas y alargadas, con vacuolas grandes y claras, y una gemación monopolar
36	H	Piña	29/08/16 (4)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	Agar nutritivo	Colonias algo grandes y extendidas, blancas mate, convexas, con bordes lisos e irregulares y una textura cremosa	Células grandes, ovaladas y alargadas, con vacuolas grandes y claras, y una gemación monopolar
37	I	Piña	11/09/16 (1)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias algo grandes y extendidas, blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con núcleos grandes y grises, y una gemación monopolar
38	VJ	Piña	11/09/16 (1)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	V8	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con núcleos grandes y grises, y una gemación multipolar
39	KM	Piña	12/09/16 (2)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	V8	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, con vacuolas grandes y claras, y una gemación monopolar
40	L	Piña	12/09/16 (2)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias algo grandes y extendidas, blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes y grises, y una gemación monopolar
41	N	Piña	12/09/16 (2)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	V8	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes y grises, y una gemación multipolar
42	O10	Piña	14/09/16 (4)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes y grises, y una gemación monopolar
43	P	Espadín	16/08/16 (1)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	Agar nutritivo	Colonias blancas, convexas, con bordes lisos y una textura suave y brillante	Células grandes y ovaladas, con vacuolas grandes y claras, y una gemación monopolar
44	Q	Piña	12/09/16 (2)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	V8	Colonias algo grandes y extendidas, blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes y grises, y una gemación monopolar
45	UR	Piña	12/09/16 (2)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes y grises, y una gemación monopolar
46	S	Piña	02/08/16 (8)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	Agar nutritivo	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con núcleos grandes y grises, y una gemación monopolar
47	T	Piña	11/09/16 (1)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes y grises, y una gemación monopolar

Numero de cepa	Nombre	Fruto o muestra	Fecha de aislamiento (día)	Técnica	Medio	Colonia	Célula
48	WX	Piña	11/09/16 (1)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	V8	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes y grises, y una gemación monopolar
49	YÑ	Piña	14/09/16 (4)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias blancas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes y grises, y una gemación monopolar
50	Z	Piña	17/08/16 (2)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias grandes, blancas y brillantes, redondas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa,	Células grandes y ovaladas, con vacuolas grandes y grises, y algunas se unen una tras otra como una pseudohifa
51	α	Espadín	16/08/16 (1)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	Agar nutritivo	Colonias blancas, convexas, con bordes lisos y una textura suave y brillante	Células grandes y ovaladas, con vacuolas grandes y claros, y una gemación monopolar
52	β	Piña	12/09/16 (2)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias blancas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes y grises, y una gemación monopolar
53	π	Piña	11/09/16 (1)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes y grises, y una gemación monopolar
54	+	Espadín	16/08/16 (1)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	Agar nutritivo	Colonias blancas, convexas, con bordes lisos y una textura mucosa y brillante	Células grandes redondas, con vacuolas grandes y grises, y una gemación monopolar
55	-	Piña	11/09/16 (1)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias algo grandes y extendidas, blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con núcleos grandes y grises, y una gemación monopolar
56	1	Piña	14/09/16 (4)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	V8	Colonias algo grandes y extendidas, blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes y grises, y una gemación monopolar
57	2	Piña	14/09/16 (4)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	V8	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con núcleos grandes y grises, y una gemación monopolar
58	3	Piña	14/09/16 (4)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	V8	Colonias grandes, blancas y brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes y grises, y una gemación monopolar
59	4	Piña	18/09/16 (8)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	V8	Colonias blancas, convexas, con bordes lisos y una textura mucosa brillante	Células grandes y ovaladas, con vacuolas grandes y claras, y una gemación monopolar, y algunas se unen una tras otra como una pseudohifa
60	5	Piña	18/09/16 (8)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	V8	Colonias y extendidas, blancas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa y brillante	Células grandes y ovaladas, con vacuolas grandes y claras, y una gemación monopolar
61	6	Piña	18/09/16 (8)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con núcleos grandes y grises, y una gemación monopolar
62	7	Piña	18/09/16 (8)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias y extendidas, blancas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa y brillante	Células grandes y ovaladas, con vacuolas grandes y claras, y una gemación monopolar
63	8	Piña	18/09/16 (8)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	V8	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes y claras, y una gemación monopolar
64	9	Piña	18/09/16 (8)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias algo grandes, blancas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa y suave	Células grandes y ovaladas, con vacuolas grandes y grises, y una gemación monopolar
65	11	Piña	14/09/16 (4)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	V8	Colonias algo grandes y extendidas, blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes y grises, y una gemación monopolar
66	12,18	Piña	16/09/16 (6)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes y grises, y una gemación monopolar
68	14	Piña	16/09/16 (6)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	V8	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes y grises, y una gemación monopolar
69	15	Piña	16/09/16 (6)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	V8	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes y grises, y una gemación monopolar
70	16	Piña	16/09/16 (6)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	V8	Colonias blancas y brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes y claros, y una gemación monopolar
71	17	Piña	16/09/16 (6)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	V8	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes y grises, y una gemación monopolar

Numero de cepa	Nombre	Fruto o muestra	Fecha de aislamiento (día)	Técnica	Medio	Colonia	Célula
72	19	Piña	16/09/16 (6)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes y claras, y una gemación monopolar
73	20	Piña	20/09/16 (10)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	V8	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes y grises, y una gemación monopolar
74	21,22,23	Piña	20/09/16 (10)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	V8	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas pequeños y claros, y una gemación monopolar
75	24,25,111	Piña	20/09/16 (10)	Enriquecimiento (fermentación espontánea)	PDA	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes redondas, con vacuolas grandes y grises, y una gemación monopolar
77	AH6dirPDA(3)	<i>Trametes sp.</i>	29 días 4 semanas	Siembra por estría cruzada	PDA	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, presentan una gemación monopolar, además de una vacuola grande y clara
78	BH6dirPDA(4)	<i>Trametes sp.</i>	29 días 4 semanas	Siembra por estría cruzada	PDA	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, presentan una gemación monopolar, además de un núcleo grande y claro
79	CH6dirV8(a)	<i>Trametes sp.</i>	29 días 4 semanas	Siembra por estría cruzada	V8	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, presentan una gemación monopolar, además de una vacuola grande y clara
80	DH6dirV8(b)	<i>Trametes sp.</i>	29 días 4 semanas	Siembra por estría cruzada	V8	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, presentan una gemación monopolar, además de una vacuola grande y clara, pero se pueden ver núcleos más densos
81	EH6dirV8(c)	<i>Trametes sp.</i>	29 días 4 semanas	Siembra por estría cruzada	V8	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, presentan una gemación monopolar, además de una vacuola grande y clara, pero se pueden ver núcleos más densos
82	FH6dirPDA(1)	<i>Trametes sp.</i>	29 días 4 semanas	Siembra por estría cruzada	PDA	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, presentan una gemación multipolar, además de una vacuola grande y clara, pero se pueden ver núcleos más densos
83	KH1dirV8(a)	<i>Trametes Versicolor</i>	35 días, 5 semanas	Siembra por estría cruzada	V8	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, presentan una gemación monopolar, presentan entre 2 y 3 vacuolas bien definidos
84	LH1dirV8(b)	<i>Trametes Versicolor</i>	35 días, 5 semanas	Siembra por estría cruzada	V8	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, presentan una gemación monopolar, además de dos vacuolas bien definidos
85	NH5dirPDA(1)	<i>Byssomerulius corium</i>	20 días, 3 semanas	Siembra por estría cruzada	PDA	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células ovaladas, presentan una gemación monopolar, además de un solo núcleo grande y blanco
86	NH5dirPDA(2)	<i>Byssomerulius corium</i>	20 días, 3 semanas	Siembra por estría cruzada	PDA	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células ovaladas, presentan una gemación monopolar, además de una vacuola grande y blanca
87	OH6dirPDA(5)	<i>Trametes sp.</i>	35 días, 5 semanas	Siembra por estría cruzada	PDA	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, presentan una gemación multipolar, además de una vacuola grande y clara, pero se pueden ver núcleos más densos
88	PH6dirPDA(6)	<i>Trametes sp.</i>	35 días, 5 semanas	Siembra por estría cruzada	PDA	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, presentan una gemación monopolar, además de una sola vacuola grande y clara
89	QH6dirPDA(7)	<i>Trametes sp.</i>	35 días, 5 semanas	Siembra por estría cruzada	PDA	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, presentan una gemación monopolar, aunque parece que algunas tienen gemación multipolar, además de una sola vacuola pequeño y oscuro
90	RH5dirV8(a)	<i>Byssomerulius corium</i>	35 días, 5 semanas	Siembra por estría cruzada	V8	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, presentan una gemación monopolar, además de una sola vacuola
91	SH5dirV8(b)	<i>Byssomerulius corium</i>	35 días, 5 semanas	Siembra por estría cruzada	V8	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, presentan una gemación monopolar, además de una sola vacuola
92	TH5dirV8(c)	<i>Byssomerulius corium</i>	35 días, 5 semanas	Siembra por estría cruzada	V8	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, aunque algunas son un poco ovaladas, presentan una gemación monopolar, además de una sola vacuola
94	WH1dirV8(f)	<i>Trametes Versicolor</i>	45 días, 6 semanas	Siembra por estría cruzada	V8	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células ovaladas, presentan una gemación monopolar, además de una sola vacuola grande y blanca
95	XH5dirV8(d)	<i>Byssomerulius corium</i>	45 días, 6 semanas	Siembra por estría cruzada	V8	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células ovaladas, presentan una gemación monopolar, además de una sola vacuola grande y blanco
96	YH5dirV8(e)	<i>Byssomerulius corium</i>	45 días, 6 semanas	Siembra por estría cruzada	V8	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células ovaladas, presentan una gemación monopolar, además de una sola vacuola grande y blanco
97	ZH5dirV8(f)	<i>Byssomerulius corium</i>	45 días, 6 semanas	Siembra por estría cruzada	V8	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, algunas presentan una gemación bipolar, además de un núcleo pequeño y oscuro
98	IH5dirPDA(3)	<i>Byssomerulius corium</i>	45 días, 6 semanas	Siembra por estría cruzada	PDA	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células ovaladas, presentan una gemación monopolar, además de un núcleo pequeño
99	IIH5dirPDA(4)	<i>Byssomerulius corium</i>	45 días, 6 semanas	Siembra por estría cruzada	PDA	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células ovaladas, presentan una gemación monopolar, además de un núcleo pequeño
100	IIIH5dirPDA(5)	<i>Byssomerulius corium</i>	45 días, 6 semanas	Siembra por estría cruzada	PDA	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células ovaladas un poco alargadas, presentan una gemación monopolar, además de una vacuola grande
101	IVH6dirPDA(8)	<i>Trametes sp.</i>	45 días, 6 semanas	Siembra por estría cruzada	PDA	Colonias blancas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, algunas presentan una gemación bipolar, además de un núcleo pequeño y oscuro
102	V H6dirPDA(9)	<i>Trametes sp.</i>	45 días, 6 semanas	Siembra por estría cruzada	PDA	Colonias blancas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, presentan una gemación monopolar, además de un solo núcleo pequeño y oscuro

Numero de cepa	Nombre	Fruto o muestra	Fecha de aislamiento (día)	Técnica	Medio	Colonia	Célula
103	VI H6dirPDA(10)	<i>Trametes sp.</i>	45 días, 6 semanas	Siembra por estría cruzada	PDA	Colonias blancas, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y redondas, presentan una gemación monopolar, además de un núcleo pequeño y oscuro
104	VII H5dirPDA(3)	<i>Byssomerulius corium</i>	45 días, 6 semanas	Siembra por estría cruzada	PDA	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y ovaladas un poco alargadas, presentan una gemación monopolar, además de una sola vacuola grande y blanco
105	VIII H5dirPDA(4)	<i>Byssomerulius corium</i>	45 días, 6 semanas	Siembra por estría cruzada	PDA	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células ovaladas, presentan una gemación monopolar, además de un núcleo pequeño
106	IX H5dirPDA(5)	<i>Byssomerulius corium</i>	45 días, 6 semanas	Siembra por estría cruzada	PDA	Colonias blancas mate, convexas, con bordes lisos y una textura cremosa	Células grandes y ovaladas, presentan una gemación monopolar, además de un núcleo pequeño

Anexo 2: Pruebas bioquímicas

Prueba de Ureasa

CEPA	Crecimiento	Cambio de color a diferentes tiempos		
		24 h	48 h	72 h
1	+	-	-	-
5	+	-	-	-
6	+	-	-	-
7	+	-	-	-
15	+	-	-	-
17	+	-	-	-
22	+	-	-	-
25	+	-	-	-
31	+	-	-	-
35	+	-	-	-
37	+	-	-	-
40	+	-	-	-
52	+	-	-	-
60	+	-	-	-
61	+	-	-	-
70	+	-	-	-
86	+	-	-	-
98	+	-	-	-
100	+	-	-	-
102	+	-	-	-
105	+	-	-	-
Control <i>S. cerevisiae</i>	+	-	-	-

Resultado positivo: +

Resultado negativo: -

Bioquímicas de manitol

24 hrs				48 hrs				72 hrs			
Cepa	Cambio de color	gas	crecimiento	Cepa	Cambio de color	gas	crecimiento	Cepa	Cambio de color	gas	crecimiento
Levadura de pan <i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	Levadura de pan <i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	Levadura de pan <i>S. cerevisiae</i>	-	-	+
<i>Pseudomonas</i>	-	-	+	<i>Pseudomonas</i>	-	-	+	<i>Pseudomonas</i>	-	-	+
Control negativo	-	-	-	Control negativo	-	-	-	Control negativo	-	-	-
1	-	-	-	1	-	-	+	1	-	-	+
5	-	-	+	5	-	-	+	5	-	-	+
6	-	-	-	6	-	-	+	6	-	-	+
7	-	-	+	7	-	-	+	7	-	-	+
15	-	-	+	15	-	-	+	15	-	-	+
17	-	-	+	17	-	-	+	17	-	-	+
22	-	-	+	22	-	-	+	22	-	-	+
25	-	-	+	25	-	-	+	25	-	-	+
31	-	-	+	31	-	-	+	31	-	-	+
35	-	-	+	35	-	-	+	35	-	-	+
37	-	-	+	37	-	-	+	37	-	-	+
40	-	-	+	40	-	-	+	40	-	-	+
52	-	-	+	52	-	-	+	52	-	-	+
60	-	-	+	60	-	-	+	60	-	-	+
61	-	-	+	61	-	-	+	61	-	-	+
70	-	-	+	70	-	-	+	70	-	-	+
86	-	-	+	86	-	-	+	86	-	-	+
98	-	-	+	98	+	-	+	98	+	-	+
100	-	-	+	100	-	-	+	100	-	-	+
102	-	-	+	102	-	-	+	102	-	-	+
105	-	-	+	105	-	-	+	105	-	-	+

Resultado positivo: +

Resultado negativo: -

Resultado variable: v

Bioquímicas de glucosa

24 hrs				48 hrs				72 hrs			
Cepa	Cambio de color	crecimiento	gas	Cepa	Cambio de color	crecimiento	gas	Cepa	Cambio de color	crecimiento	gas
Levadura de pan <i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	Levadura de pan <i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	Levadura de pan <i>S. cerevisiae</i>	+	+	+
<i>Pseudomonas</i>	-	+	-	<i>Pseudomonas</i>	-	+	-	<i>Pseudomonas</i>	-	+	-
Control negativo	-	-	-	Control negativo	-	-	-	Control negativo	-	-	-
1	+	+	+	1	+	+	+	1	+	+	+
5	+	+	+	5	+	+	+	5	+	+	+
6	+	+	-	6	+	+	-	6	+	+	+
7	+	+	-	7	+	+	-	7	+	+	-
15	+	+	-	15	+	+	-	15	+	+	-
17	+	+	+	17	+	+	+	17	+	+	+
22	+	+	-	22	+	+	-	22	+	+	+
25	+	+	+	25	+	+	+	25	+	+	+
31	-	+	-	31	-	+	-	31	+	+	-
35	+	+	+	35	+	+	+	35	+	+	-
37	+	+	+	37	+	+	+	37	+	+	+
40	+	+	+	40	+	+	+	40	+	+	+
52	+	+	+	52	+	+	+	52	+	+	+
60	+	+	+	60	+	+	+	60	+	+	+
61	+	+	+	61	+	+	+	61	+	+	+
70	+	+	+	70	+	+	+	70	+	+	+
86	+	+	+	86	+	+	+	86	+	+	+
98	-	+	+	98	-	+	+	98	+	+	+
100	+	+	+	100	+	+	+	100	+	+	+
102	+	+	+	102	+	+	+	102	+	+	+
105	-	+	-	105	-	+	-	105	-	+	-

Resultado positivo: +

Resultado negativo: -

Resultado variable: v

Bioquímicas Sorbosa

24 hrs				48 hrs				72 hrs			
Cepa	Cambio de color	crecimiento	gas	Cepa	Cambio de color	crecimiento	gas	Cepa	Cambio de color	crecimiento	gas
Levadura de pan <i>S. cerevisiae</i>	-	+	-	Levadura de pan <i>S. cerevisiae</i>	-	+	+	Levadura de pan <i>S. cerevisiae</i>	-	+	+
Pseudomonas	-	+	-	Pseudomonas	-	+	-	Pseudomonas	-	+	-
Control negativo	-	-	-	Control negativo	-	-	-	Control negativo	-	-	-
1	-	+	-	1	-	+	-	1	-	+	-
5	-	+	-	5	-	+	-	5	-	+	-
6	-	+	-	6	v	+	-	6	-	+	-
7	-	+	-	7	-	+	-	7	-	+	-
15	-	+	-	15	-	+	-	15	-	+	-
17	-	+	-	17	-	+	-	17	-	+	-
22	-	+	-	22	+	+	-	22	-	+	-
25	-	+	-	25	-	+	-	25	-	+	-
31	-	+	-	31	-	+	-	31	-	+	-
35	-	+	-	35	-	+	-	35	-	+	-
37	-	+	-	37	-	+	-	37	-	+	-
40	-	+	-	40	-	+	-	40	-	+	-
52	-	+	-	52	-	+	-	52	+	+	+
60	-	+	-	60	-	+	-	60	-	+	-
61	-	+	-	61	-	+	-	61	+	+	+
70	-	+	-	70	-	+	-	70	+	+	+
86	-	+	-	86	-	+	-	86	-	+	-
98	-	+	-	98	-	+	-	98	-	+	-
100	-	+	-	100	+	+	-	100	+	+	-
102	-	+	-	102	-	+	-	102	-	+	-
105	-	+	-	105	+	+	-	105	+	+	-

Resultado positivo: +

Resultado negativo: -

Resultado variable: v

Bioquímicas de rafinosa

24 hrs				48 hrs				72 hrs			
Cepa	Cambio de color	crecimiento	gas	Cepa	Cambio de color	crecimiento	gas	Cepa	Cambio de color	crecimiento	gas
Levadura de pan <i>S. cerevisiae</i>	+	+	-	Levadura de pan <i>S. cerevisiae</i>	+	+	-	Levadura de pan <i>S. cerevisiae</i>	+	+	-
<i>Pseudomonas</i>	-	+	-	<i>Pseudomonas</i>	-	+	-	<i>Pseudomonas</i>	-	+	-
Control negativo	-	-	-	Control negativo	-	-	-	Control negativo	-	-	-
1	+	+	-	1	+	+	-	1	+	+	-
5	+	+	-	5	+	+	+	5	+	+	+
6	-	+	-	6	-	+	-	6	-	+	-
7	+	+	-	7	+	+	-	7	+	+	-
15	+	+	-	15	+	+	-	15	+	+	-
17	-	-	-	17	-	+	-	17	-	+	-
22	-	+	-	22	-	+	-	22	+	+	-
25	variable	+	-	25	-	+	-	25	-	+	-
31	-	+	-	31	-	+	-	31	-	+	-
35	variable	+	-	35	variable	+	-	35	variable	+	-
37	variable	+	-	37	variable	+	-	37	-	+	-
40	+	+	-	40	+	+	-	40	+	+	-
52	+	+	-	52	+	+	-	52	+	+	-
60	-	+	-	60	-	+	-	60	-	+	-
61	+	+	-	61	+	+	-	61	+	+	-
70	variable	+	-	70	+	+	-	70	+	+	-
86	-	+	-	86	-	+	-	86	-	+	-
98	+	+	-	98	+	+	-	98	+	+	-
100	+	+	-	100	+	+	-	100	+	+	-
102	-	+	-	102	-	+	-	102	-	+	-
105	-	+	-	105	-	+	-	105	-	+	-

Resultado positivo: +

Resultado negativo: -

Resultado variable: v

Bioquímicas de Sacarosa

24 h				48 h				72 h			
Cepa	cambio de color	crecimiento	gas	Cepa	cambio de color	crecimiento	gas	Cepa	Cambio de color	crecimiento	gas
Levadura de pan <i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	Levadura de pan <i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	Levadura de pan <i>S. cerevisiae</i>	+	+	+
<i>Pseudomonas</i>	-	+	-	<i>Pseudomonas</i>	-	+	-	<i>Pseudomonas</i>	-	+	-
Control negativo	-	-	-	Control negativo	-	-	-	Control negativo	-	-	-
1	+	+	+	1	+	+	+	1	+	+	+
5	+	+	+	5	+	+	+	5	+	+	+
6	+	+	-	6	+	+	+	6	+	+	+
7	+	+	+	7	+	+	+	7	+	+	+
15	+	+	-	15	+	+	-	15	+	+	+
17	+	+	+	17	+	+	+	17	+	+	+
22	+	+	-	22	+	+	-	22	+	+	-
25	+	+	-	25	+	+	+	25	+	+	+
31	-	+	-	31	-	+	-	31	-	+	-
35	-	+	+	35	-	+	-	35	-	+	-
37	+	+	-	37	+	+	-	37	+	+	+
40	+	+	+	40	+	+	-	40	+	+	+
52	+	+	-	52	+	+	+	52	+	+	-
60	-	+	-	60	-	+	-	60	-	+	-
61	+	+	-	61	+	+	-	61	+	+	+
70	+	+	-	70	+	+	+	70	+	+	+
86	-	+	-	86	-	+	-	86	-	+	-
98	+	+	-	98	+	+	+	98	+	+	+
100	+	+	-	100	+	+	+	100	+	+	+
102	+	+	-	102	+	+	-	102	+	+	-
105	+	+	-	105	+	+	+	105	+	+	+

Bioquímicas de Maltosa

24h				48h				72h			
Cepa	cambio de color	crecimiento	gas	cepa	cambio de color	crecimiento	gas	cepa	cambio de color	crecimiento	gas
Levadura de pan <i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	Levadura de pan <i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	Levadura de pan <i>S. cerevisiae</i>	+	+	+
<i>Pseudomonas</i>	-	+	-	<i>Pseudomonas</i>	-	+	-	<i>Pseudomonas</i>	-	+	-
Control negativo	-	-	-	Control negativo	-	-	-	Control negativo	-	-	-
1	-	+	-	1	-	+	-	1	-	+	-
5	+	+	-	5	+	+	-	5	+	+	-
6	+	+	-	6	+	+	-	6	+	+	-
7	-	+	-	7	-	+	-	7	-	+	-
15	+	+	-	15	+	+	-	15	-	+	-
17	-	+	-	17	-	+	-	17	-	+	-
22	+	+	-	22	+	+	-	22	+	+	-
25	+	+	-	25	+	+	-	25	+	+	-
31	-	+	-	31	-	+	-	31	-	+	-
35	+	+	-	35	+	+	-	35	+	+	-
37	+	+	-	37	+	+	-	37	+	+	-
40	+	+	-	40	+	+	-	40	+	+	-
52	+	+	-	52	+	+	-	52	+	+	-
60	-	+	-	60	-	+	-	60	-	+	-
61	+	+	-	61	+	+	-	61	+	+	-
70	+	+	-	70	+	+	-	70	+	+	-
86	-	+	-	86	-	+	-	86	-	+	-
98	-	+	-	98	+	+	-	98	+	+	-
100	-	+	-	100	-	+	-	100	-	+	-
102	-	+	-	102	-	+	-	102	-	+	-
105	-	+	-	105	-	+	-	105	+	+	-

Resultado positivo: +

Resultado negativo: -

Resultado variable: v

Bioquímicas de Xilosa

24h				48h				72h			
Cepa	cambio de color	crecimiento	gas	cepa	cambio de color	crecimiento	gas	cepa	cambio de color	crecimiento	gas
<i>S. cerevisiae</i> E491	-	+	-	<i>S. cerevisiae</i> E491	-	+	-	<i>S. cerevisiae</i> E491	-	+	-
<i>Pseudomonas</i>	-	+	-	<i>Pseudomonas</i>	-	+	-	<i>Pseudomonas</i>	-	+	-
Control negativo	-	-	-	Control negativo	-	-	-	Control negativo	-	-	-
1	-	+	-	1	-	+	-	1	-	+	-
5	-	+	-	5	-	+	-	5	-	+	-
6	-	+	-	6	-	+	-	6	-	+	-
7	-	+	-	7	-	+	-	7	-	+	-
15	-	+	-	15	-	+	-	15	-	+	-
17	-	+	-	17	-	+	-	17	-	+	-
22	-	+	-	22	-	+	-	22	-	+	-
25	-	+	-	25	-	+	-	25	-	+	-
31	-	+	-	31	-	+	-	31	-	+	-
35	-	+	-	35	-	+	-	35	-	+	-
37	-	+	-	37	-	+	-	37	-	+	-
40	-	+	-	40	-	+	-	40	-	+	-
52	-	+	-	52	-	+	-	52	-	+	-
60	-	+	-	60	-	+	-	60	-	+	-
61	-	+	-	61	-	+	-	61	-	+	-
70	-	+	-	70	-	+	-	70	-	+	-
86	-	+	-	86	-	+	-	86	-	+	-
98	-	+	-	98	-	+	-	98	-	+	-
100	-	+	-	100	-	+	-	100	-	+	-
102	-	+	-	102	-	+	-	102	-	+	-
105	-	+	-	105	-	+	-	105	-	+	-

Resultado positivo: +

Resultado negativo: -

Resultado variable: v

Bioquímicas de Arabinosa

24h				48h				72h			
cepa	cambio de color	crecimiento	gas	cepa	cambio de color	crecimiento	gas	cepa	cambio de color	crecimiento	gas
Levadura de pan <i>S. cerevisiae</i>	-	+	-	Levadura de pan <i>S. cerevisiae</i>	-	+	-	Levadura de pan <i>S. cerevisiae</i>	-	+	-
<i>Pseudomonas</i>	-	+	-	<i>Pseudomonas</i>	-	+	-	<i>Pseudomonas</i>	-	+	-
Control negativo	-	-	-	Control negativo	-	-	-	Control negativo	-	-	-
1	-	+	-	1	-	+	-	1	-	+	-
5	-	+	-	5	-	+	-	5	-	+	-
6	-	+	-	6	-	+	-	6	-	+	-
7	-	+	-	7	-	+	-	7	-	+	-
15	-	+	-	15	-	+	-	15	-	+	-
17	-	+	-	17	-	+	-	17	-	+	-
22	-	+	-	22	-	+	-	22	-	+	-
25	-	+	-	25	-	+	-	25	-	+	-
31	-	+	-	31	-	+	-	31	-	+	-
35	-	+	-	35	-	+	-	35	-	+	-
37	-	+	-	37	-	+	-	37	-	+	-
40	-	+	-	40	-	+	-	40	-	+	-
52	-	+	-	52	-	+	-	52	-	+	-
60	-	+	-	60	-	+	-	60	-	+	-
61	-	+	-	61	-	+	-	61	-	+	-
70	-	+	-	70	-	+	-	70	-	+	-
86	-	+	-	86	-	+	-	86	-	+	-
98	+	+	-	98	+	+	-	98	+	+	-
100	-	+	-	100	-	+	-	100	-	+	-
102	-	+	-	102	-	+	-	102	-	+	-
105	-	+	-	105	-	+	-	105	-	+	-

Resultado positivo: +

Resultado negativo: -

Resultado variable: v

Bioquímicas de lactosa

24h				48h				72h			
cepa	cambio de color	crecimiento	gas	cepa	cambio de color	crecimiento	gas	cepa	cambio de color	crecimiento	gas
<i>S. cerevisiae</i> E491	-	+	-	<i>S. cerevisiae</i> E491	-	+	-	<i>S. cerevisiae</i> E491	-	+	-
Pseudomonas	-	+	-	Pseudomonas	-	+	-	Pseudomonas	-	+	-
Control negativo	-	-	-	Control negativo	-	-	-	Control negativo	-	-	-
1	-	+	-	1	+	+	-	1	+	+	+
5	-	+	-	5	-	+	-	5	-	+	-
6	-	+	-	6	-	+	-	6	-	+	-
7	-	+	-	7	-	+	-	7	-	+	-
15	-	+	-	15	-	+	-	15	-	+	-
17	-	+	-	17	-	+	-	17	-	+	-
22	-	+	-	22	-	+	-	22	-	+	-
25	-	+	-	25	-	+	-	25	-	+	-
31	-	+	-	31	-	+	-	31	-	+	-
35	-	+	-	35	-	+	-	35	-	+	-
37	-	+	-	37	-	+	-	37	-	+	-
40	-	+	-	40	-	+	-	40	-	+	-
52	-	+	-	52	-	+	-	52	-	+	-
60	-	+	-	60	-	+	-	60	-	+	-
61	-	+	-	61	-	+	-	61	-	+	-
70	-	+	-	70	-	+	-	70	-	+	-
86	-	+	-	86	-	+	-	86	-	+	-
98	+	+	-	98	+	+	-	98	+	+	-
100	-	+	-	100	-	+	-	100	-	+	-
102	-	+	-	102	-	+	-	102	-	+	-
105	-	+	-	105	-	+	-	105	-	+	-

Resultado positivo: +

Resultado negativo: -

Resultado variable: v

Anexo 3: Pruebas de tolerancia

Tolerancia a etanol

Cepa	Máxima tolerancia a etanol	Máxima resistencia a etanol
S. cerevisiae ale 05	12%	12%
S. cerevisiae S-189	12%	12%
S. cerevisiae 86	12%	12%
40	10%	12%
52	10%	12%
60	8%	10%
98	8%	10%
105	8%	10%
100	8%	10%
31	8%	10%
15	6%	12%
25	6%	10%
37	6%	10%
61	6%	10%
35	6%	8%
7	6%	8%
70	6%	8%
1	4%	8%
6	4%	8%
22	4%	6%
5	4%	6%
102	2%	8%
17	2%	8%

Tolerancia a valores bajos de pH

12 horas

Cepa	pH 4.5	pH 3.5	pH 2.5	pH 2.0
<i>S. cerevisiae</i> ale 05	BBB	CCC	CXX	XXX
<i>S. cerevisiae</i> S-189	BBB	CCX	CXX	XXX
<i>S. cerevisiae</i>	BBB	CCX	CXC	XXX
1	BBB	BBB	XXX	XXX
5	BBB	BBB	XXX	XXX
6	BBB	BBB	CCC	XXX
7	CCC	CCC	XXX	XXX
15	BBB	CCB	XXX	XXX
17	CCC	CCC	XXX	XXX
22	BBB	BBB	CCC	XXX
25	BBC	BBB	CCC	XXX
31	CCC	CCB	CCB	XXX
35	BBC	CCB	XXX	XXX
37	CCB	CCC	CXX	XXX
40	CCB	CCC	CXX	XXX
52	CCB	CCC	XXX	XXX
60	CCB	CCC	CCC	XXX
61	CCB	CCB	XXX	XXX
70	CCC	CCC	XXX	XXX
86	CCB	CCC	XXX	XXX
98	CCB	CCB	XXX	XXX
100	CCB	CCC	CCC	XXX
102	CCC	CCC	XXX	XXX
105	CCC	CCC	XXX	XXX

Crecimiento abundante: A

Crecimiento medio: B

Poco crecimiento: C

Sin crecimiento: X

24 horas

Cepa	pH 4.5	pH 3.5	pH 2.5	pH 2.0
<i>S. cerevisiae</i> ale 05	AAB	BCC	CXX	XXX
<i>S. cerevisiae</i> S-189	AAB	CCC	CXX	XXX
<i>S. cerevisiae</i>	AAB	BCC	CXX	XXX
1	AAB	BBC	CXX	XXX
5	BBA	AAB	BBB	XXX
6	AAB	AAB	BBB	XXX
7	CCC	CCC	XXX	XXX
15	BBB	CCB	XXX	XXX
17	BBB	BBC	CCC	XXX
22	BBA	BBA	BBB	XXX
25	BBA	BBA	BBB	XXX
31	BBB	BBA	BBB	XXX
35	BBC	ABB	XXX	XXX
37	AAB	BBC	CBX	XXX
40	ABB	BBC	BBC	XXX
52	BAA	BBA	XXX	XXX
60	BBB	BBA	BBB	XXX
61	BBB	BBB	CXX	XXX
70	CCC	CCB	XXX	XXX
86	ABB	BBB	XXX	XXX
98	BBA	BBA	XXX	XXX
100	BAA	BBA	BBB	XXX
102	BBB	BBC	CCC	XXX
105	BAA	BBA	XXX	XXX

Crecimiento abundante: A

Crecimiento medio: B

Poco crecimiento: C

Sin crecimiento: X

36 horas

Cepa	pH 4.5	pH 3.5	pH 2.5	pH 2.0
<i>S. cerevisiae</i> ale 05	AAA	BBC	BBC	XXX
<i>S. cerevisiae</i> S-189	AAA	BBC	CCB	XXX
<i>S. cerevisiae</i>	AAA	BBC	BCC	XXX
1	AAB	BBC	CXX	XXX
5	BBA	AAB	BBB	XXX
6	AAB	AAB	BBB	XXX
7	CCC	CCC	XXX	XXX
15	BBB	CCB	XXX	XXX
17	BBB	BBC	CCC	XXX
22	BBA	BBA	BBB	XXX
25	BBA	BBA	BBB	XXX
31	BBB	BBA	BBB	XXX
35	BBC	ABB	XXX	XXX
37	AAB	BBC	CBX	XXX
40	AAA	AAB	BBB	XXX
52	BAA	BBA	XXX	XXX
60	BBB	BBA	BBB	XXX
61	BBB	BBB	CXX	XXX
70	CCC	CCB	XXX	XXX
86	ABB	BBB	XXX	XXX
98	BBA	BBA	XXX	XXX
100	BAA	BBA	BBB	XXX
102	BBB	BBC	CCC	XXX
105	BAA	BBA	XXX	XXX

Crecimiento abundante: A

Crecimiento medio: B

Poco crecimiento: C

Sin crecimiento: X

48 horas

Cepa	pH 4.5	pH 3.5	pH 2.5	pH 2.0
<i>S. cerevisiae</i> ale 05	AAA	ABB	BBB	XXX
<i>S. cerevisiae</i> S-189	AAA	BBB	BBB	XXX
<i>S. cerevisiae</i>	AAA	BBB	BBB	XXX
1	AAB	BBC	CXX	XXX
5	BBA	AAB	BBB	XXX
6	AAB	AAB	BBB	XXX
7	CCC	CCC	XXX	XXX
15	BBB	CCB	XXX	XXX
17	BBB	BBC	CCC	XXX
22	BBA	BBA	BBB	XXX
25	BBA	BBA	BBB	XXX
31	BBB	BBA	BBB	XXX
35	BBC	ABB	XXX	XXX
37	AAB	BBC	CBX	XXX
40	AAA	AAA	ABB	XXX
52	BAA	BBA	XXX	XXX
60	BBB	BBA	BBB	XXX
61	BBB	BBB	CXX	XXX
70	CCC	CCB	XXX	XXX
86	ABB	BBB	XXX	XXX
98	BBA	BBA	XXX	XXX
100	BAA	BBA	BBB	XXX
102	BBB	BBC	CCC	XXX
105	BAA	BBA	XXX	XXX

Crecimiento abundante: A

Crecimiento medio: B

Poco crecimiento: C

Sin crecimiento: X

72 horas

Cepa	pH 4.5	pH 3.5	pH 2.5	pH 2.0
<i>S. cerevisiae</i> ale 05	AAA	AAB	BBB	XXX
<i>S. cerevisiae</i> S-189	AAA	AAB	BBB	XXX
<i>S. cerevisiae</i>	AAA	AAA	BBB	XXX
1	AAB	BBB	BCX	XXX
5	AAB	AAB	AAB	XXX
6	AAA	AAA	AAA	XXX
7	BBA	BBA	CCX	XXX
15	AAB	BBA	CXX	XXX
17	AAA	BBA	CCC	XXX
22	AAA	AAB	AAB	XXX
25	AAB	AAB	AAB	XXX
31	AAA	AAB	AAB	XXX
35	AAA	AAA	CCC	XXX
37	AAA	BBA	BCC	XXX
40	AAA	AAA	AAB	XXX
52	BAA	BBA	BCC	XXX
60	AAB	AAB	AAB	XXX
61	AAB	BBB	CXX	XXX
70	BBB	BBB	BBC	XXX
86	AAA	AAB	XXX	XXX
98	BAA	BAA	XXX	XXX
100	AAA	BAA	BAA	XXX
102	AAB	ABB	CCC	XXX
105	BAA	BAA	XXX	XXX

Crecimiento abundante: A

Crecimiento medio: B

Poco crecimiento: C

Sin crecimiento: X

Tolerancia a la temperatura

Cepa	Origen de la cepa	25° C	30° C	35° C	40° C	45° C
S. cerevisiae ale 05	Control	+	+	+	+	-
S. cerevisiae S-189	Control	+	+	+	+	-
S. cerevisiae	Control	+	+	+	+	-
1	Pulque	+	+	+	+	-
5	Pulque	+	+	+	+	-
6	Ciruela	+	+	+	+	-
7	Ciruela	+	+	+	-	-
15	Piña	+	+	+	-	-
17	Piña	+	+	+	+	-
22	Piña	+	+	+	+	-
25	Piña	+	+	+	+	-
31	Piña	+	+	+	+	-
35	Piña	+	+	+	+	-
37	Piña	+	+	+	-	-
40	Piña	+	+	+	-	-
52	Piña	+	+	+	-	-
60	Piña	+	+	+	+	-
61	Piña	+	+	+	-	-
70	Piña	+	+	+	-	-
86	Hongos	+	+	+	+	-
98	Hongos	+	+	+	+	-
100	Hongos	+	+	+	+	-
102	Hongos	+	+	+	-	-
105	Hongos	+	+	+	+	-

Resultado positivo: +

Resultado negativo: -

Anexo 4: Medios de cultivo

Medios sólidos:

Agar papa dextrosa

Papa ----- 200g
Azúcar ----- 100g
Agar ----- 15g
Agua destilada ----- 1000ml

Agar V8

Jugo V8 filtrado ----- 200ml
Azúcar ----- 20g
Agar ----- 15g
Agua destilada ----- 1000ml

Agar Nutritivo

Caldo nutritivo ----- 8g
Agar ----- 15g
Agua destilada ----- 1000ml

Medio NYDA

Caldo nutritivo ----- 8g
Extracto de levadura ----- 5g
Dextrosa ----- 10g
Agar ----- 15g
Agua destilada ----- 1000ml

Agar modificado de Stuart

Extracto de levadura ----- 5g
Dextrosa ----- 1g
Fosfato monopotásico ----- 9.1g
Fosfato disódico ----- 9.5g
Rojo de fenol ----- 0.01g
Urea ----- 20g
Agar ----- 15g
Agua destilada ----- 1000ml

Agar acetato de potasio

Acetato de potasio ----- 15g
Extracto de levadura ----- 2.5g
Dextrosa ----- 5g
Agar ----- 15g
Agua destilada ----- 1000ml

Medios líquidos:

Caldo rojo de fenol

Peptona de caseína ----- 10g
Cloruro de sodio ----- 5g
Rojo de fenol ----- 0.018g
Carbohidrato ----- 10g (1%)
Agua destilada ----- 1000ml

Caldo papa dextrosa

Papa ----- 200g
Azúcar ----- 100g
Agua destilada ----- 1000ml

Caldo V8

Jugo V8 filtrado ----- 200ml
Azúcar ----- 20g
Agua destilada ----- 1000ml

Caldo NYD

Caldo nutritivo ----- 8g
Extracto de levadura ----- 5g
Dextrosa ----- 10g
Agua destilada ----- 1000ml

Anexo 5: Procesamiento de muestras

- **Procesamiento de piña**

1.- Se cortaron trozos de la cascara de la piña con un poco de pulpa de la fruta adherida y se machacaron en un mortero estéril.

2.- Se colocaron las cascaras machacadas en 5 frascos de vidrio estériles aproximadamente 300g de muestra en cada uno y se les agregaron 50 ml de agua estéril y 20g de azúcar a cada frasco.

3.- Los frascos se taparon con guantes de látex y se sellaron bien los bordes con cinta para evitar contaminaciones.

4.- Los frascos se rotularon con números del 1 al 5 y posteriormente se tomaron muestras de estos cada 2 días, empezando con el frasco 1 y concluyendo con el 5 a los 10 días.

5.- Se tomó 1ml de fermentado y se realizaron diluciones seriadas del 1 al -6, estas diluciones se sembraron por triplicado en medios V8, PDA y Agar Nutritivo y se realizaron conteos en placa cada 12 y 24 horas.

6.- También se realizó una siembra directa sin diluir en placa, donde se tomó 1ml del fermentado y se inoculo en placas de medios V8, PDA y Agar nutritivo, de forma masiva.

7.- Se inocularon 3 tubos con caldo V8, Caldo papa dextrosa y caldo nutritivo con 150µl del machacado de piña y se dejaron en incubación a 30°C y en agitación por varios días hasta observar turbidez y se tomaron muestras para hacer diluciones del -3 al -6.

Procesamiento de Ciruela

- 1.- La ciruela se cortó en trozos de aproximadamente 1cm por 1cm y se machacaron en un mortero estéril.
- 2.- Se colocó la fruta machacada en 5 frascos de vidrio estériles aproximadamente 300g de muestra en cada uno y se les agregaron 50 ml de agua estéril a cada frasco y 20g de azúcar.
- 3.- Los frascos se taparon con guantes de látex y se sellaron bien los bordes con cinta para evitar contaminaciones.
- 4.- Los frascos se rotularon con números del 1 al 5 y posteriormente se tomarán muestras de estos frascos cada 2 días, empezando con el frasco 1 y concluyendo con el 5 a los 10 días.
- 5.- Se tomó 1ml de fermentado y se realizaron diluciones seriadas del 1 al -6, estas diluciones se sembraron por triplicado en medios V8, PDA y Agar Nutritivo y se realizaron conteos en placa cada 12 y 24 horas.
- 6.- También se realizó una siembra directa sin diluir en placa, donde se tomó 1ml del fermentado y se inoculó en placas de medios V8, PDA y Agar nutritivo, de forma masiva.
- 7.- Se inocularon 3 tubos con caldo V8, Caldo papa dextrosa y caldo nutritivo con 150µl del machacado de ciruela y se dejaron en incubación a 30°C y en agitación por varios días hasta observar turbidez y se tomaron muestras para hacer diluciones del -3 al -6.

Procesamiento de agave espadín

1.-La penca del maguey se cortó en trozos de aproximadamente 1cm por 1cm y se machacaron en un mortero estéril.

2.- Se la muestra coloco en 5 frascos de vidrio estériles aproximadamente 300gr de muestra en cada uno y se les agregaron 50 ml de agua estéril a cada frasco y 20g de azúcar.

3.-Los frascos se taparon con guantes de látex y se sellaron bien los bordes con cinta para evitar contaminaciones.

4.- Los frascos se rotularon con números del 1 al 5 y posteriormente se tomarán muestras de estos frascos cada 2 días, empezando con el frasco 1 y concluyendo con el 5 a los 10 días.

5.- Se tomó 1ml de fermentado y se realizaron diluciones seriadas del 1 al -6, estas diluciones se sembraron por triplicado en medios V8, PDA y Agar Nutritivo y se realizaron conteos en placa cada 12 y 24 horas.

6.- También se realizó una siembra directa sin diluir en placa, donde se tomó 1ml del fermentado y se inoculo en placas de medios V8, PDA y Agar nutritivo, de forma masiva.

7.- Se inocularon 3 tubos con caldo V8, Caldo papa dextrosa y caldo nutritivo con 150µl del machacado de ciruela. Se dejaron en incubación a 30°C y agitación por varios días hasta observar turbidez, en ese momento se tomaron muestras para hacer diluciones del -3 al -6.

Procesamiento de hongos

De los 12 hongos recolectados, se tomaron muestras de los hongos *Trametes versicolor*, *Trametes sp*, *Byssomerulius cerium*, *Bjerkandera adusta* y *Crepidotus applanatus* debido a que se encontraban en mejores condiciones que los demás y se procesaron de la siguiente manera:

- 1.- Se cortó una porción de aproximadamente 3 g de cada hongo y la mitad se colocó en un mortero estéril.
- 2.- Se le agregaron 5ml de caldo PDA y se machacó con el mortero. Esto se repitió para la otra mitad de la porción, pero agregando 5ml de caldo V8.
- 3.- La muestra machacada se colocó en tubos tipo falcon de 40ml donde se le agregaron otros 5ml de medio y 1 gr de azúcar.
- 4.- Los tubos se dejaron incubar a 30°C por 40 minutos
- 5.- Concluido el tiempo se realizaron diluciones seriadas de cada hongo del 0 al -5, utilizando solución de sulfato de magnesio como diluyente y cada dilución se sembró por triplicado en placas con medio PDA y V8 adicionados con cloranfenicol y etanol al 4%.
- 6.- Las placas se dejaron incubar a 30°C y se realizaron conteos a las 24 y 48 horas, además de un análisis microscópico para comprobar que se trate de colonias de levaduras.
- 7.- Los tubos tipo falcon con muestra se dejaron incubando por varios días a 30° C y en agitación por varios días y se inocularon placas con medio v8 y PDA de forma masiva periódicamente.

Anexo 6: Fichas técnicas.



Saflager™ S-189



Originaria de la cervecera Hüflimann en Suiza. El perfil de atenuación de esta cepa lager permite producir cervezas con sabores bastante neutros, de alta "drinkability".

INGREDIENTES: Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), agente emulsionante E491

ESTERES TOTALES

30

ppm a 18P y 12°C durante
las primeras 48 h de fermentación,
luego a 14°C
en tubos EBC

ALCOHOLES SUPERIORES TOTALES

170

ppm a 18P y 12°C durante
las primeras 48 h de fermentación,
luego a 14°C
en tubos EBC

AZUCARES RESIDUALES

4 g/l*

*Corresponde a un atenuación
aparente de 84%

FLOCULACION

alta

TEMPERATURA DE FERMENTACION: 9-22°C (48.2-71.6°F) ideal 12-15°C (53.6-59°F)

DOSIS: 80 a 120 g/hl cuando es inoculada a 12 - 15°C (53-59°F).

Se requiere un incremento de la dosis cuando se inoculan mostos a temperaturas por debajo de los 12°C (53°F) hasta 200 a 300 g/hl a 9°C (48°F).

INSTRUCCIONES DE SIEMBRA:

Previamente a la inoculación, se debe rehidratar la levadura seca en un recipiente con agitación hasta formar una crema. El procedimiento consiste en esparcir la levadura seca en un volumen de agua estéril o mosto 10 veces superior a su propio peso, a una temperatura de 23 °C ± 3 °C (73°F ± 6°F). Una vez que el peso total de la levadura se encuentre reconstituido en forma de crema (esta etapa lleva de 15 a 30 minutos) se mantiene la agitación suave por otros 30 minutos. Posteriormente se siembra la crema obtenida en los fermentadores. Alternativamente, se puede sembrar directamente levadura seca en el fermentador, asegurando que la temperatura del mosto supere los 20 °C (68 °F). Este procedimiento consiste en esparcir la levadura seca en forma progresiva sobre la superficie del mosto, asegurando que la misma cubra toda el área disponible, evitando la formación de grumos. Se deja en reposo por 30 minutos y luego se mezcla el mosto, por ejemplo, utilizando aireación.

ANÁLISIS TÍPICOS:

% peso seco:	94.0 - 96.5
Células viables al envasado:	> 6 x 10 ⁹ /g
Bacterias totales*:	< 5 / ml
Bacterias ácido acéticas*:	< 1 / ml
Lactobacilos*:	< 1 / ml
Pediococcus*:	< 1 / ml
Levaduras salvajes no <i>Saccharomyces</i> *:	< 1 / ml
Microorganismos patógenos:	en acuerdo a la regulación vigente

*Cuando la levadura seca es inoculada a una tasa de 100 g/hl o > 6 x 10⁹ células viables / ml

ALMACENAMIENTO

Durante el transporte: el producto puede ser transportado y almacenado a temperatura ambiente durante 3 meses, sin que sea afectada su performance.

A destino: Conservar en lugar fresco (< 10 °C / 50 °F) y ambiente seco.

VALIDEZ

El producto almacenado bajo condiciones recomendadas posee una validez de 24 meses contando desde la fecha de elaboración. Los sachets abiertos deben ser sellados y almacenados a 4 °C (39 °F) y utilizados dentro de los 7 días siguientes a la apertura. No deben ser utilizados los sachets blandos o que presenten algún tipo de daño.

Se informa que cualquier cambio en el proceso fermentativo puede alterar la calidad final del producto. Por lo tanto, se sugiere realizar ensayos de fermentación antes de utilizar comercialmente nuestra levadura.

TECHNICAL DATA SHEET - Saflager™ S-189 - Rev.:OCT2015

The obvious choice for beverage fermentation



**FICHA
TECNICA**

TRADIPAN

Levadura Seca Instantánea

Tradipan es una levadura seca instantánea seleccionada de *Saccharomyces cerevisiae* elaborada bajo los más estrictos procedimientos de control, asegurando así una calidad constante y una conservación de su alto poder fermentativo. Consiste de pequeños cilindros beige con una superficie porosa.

APLICACION

- Tradipan es una levadura particularmente efectiva en masas azucaradas (más de 5% sobre el peso total de la harina).
- Por otro lado, su perfil de fermentación en una masa con poco contenido de azúcar le permite ser más efectiva en el caso de procesos de fermentación de más de 4 horas.

INGREDIENTES

Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), monoestearato de sorbitán, ácido ascórbico

COMPOSICION

- **Parámetros físico-químicos**

Materia seca	>95%
Proteína	47.8% +/- 5.3
Pentóxido de fósforo (P ₂ O ₅)	2.55% +/- 0.45
- **Parámetros microbiológicos(UFC/g)**

Mesófilas aeróbias	<1 x 10 ⁶
Coliformes totales	<100
E. coli	<10
<u>E. coli</u> (GEI+)	<1

ENVASE

Tradipan es envasada bajo atmósferas controladas en sobres aluminizados. Una vez abierta, la levadura se presenta en forma de polvo.

CARACTERISTICAS DE LA CAJA

Presentación	# de sobres (11 gr)	Dimensiones de la caja	Peso neto (kg)	Peso bruto (kg)
Caja con 56 cajillas	280	33x27x24.5	3.08	5.0

ELABORO:


GERENTE DE CALIDAD

FECHA DE EMISIO

Julio 1º, 2008

MODO DE EMPLEO

- Opción 1: Incorporar Tradipan a la harina en seco.
- Opción 2: Incorporar Tradipan directamente a la masa.
- Opción 3: Rehidratar Tradipan con agua tibia (32°C +/- 2°C).

RECOMENDACION

Evitar el contacto de Tradipan con agua fría y el hielo.

DOSIFICACION

1 kg de levadura Tradipan equivale aproximadamente a 3 kg de levadura prensada. Por su alto contenido de materia seca, es indispensable compensar la diferencia de peso con agua para la masa (para 1 kg de Tradipan, agregar 2 litros de agua).

ALMACENAMIENTO

El envasado especial de Tradipan permite una conservación de hasta 2 años a partir de la fecha de producción. Conservar el producto en un lugar fresco y seco.

CODIFICACION

La fecha de caducidad así como el número de lote de fabricación están impresos en los sobres.

SAFMEX, S.A. DE C.V. / FERMEX, S.A. DE C.V.

km 57.5 Carretera México-Toluca, Estado de México, MEXICO
Tel. (52-722) 216 5600 Fax (52-722) 211 98 78





TECHNICAL DATA SHEET

NOTTINGHAM HIGH PERFORMANCE ALE YEAST

Nottingham is an English style ale yeast selected for its high performance ability and versatility. Traditional styles brewed with this yeast include but are not limited to Pale Ales, Ambers, Porters, Stouts and Barleywines. Furthermore, this highly versatile yeast strain allows for tremendous creativity when brewing beers out of the regular spectrum: in addition to these traditional styles, Nottingham gives the possibility of creating styles such as Golden Ale, Kölsch, Lager-style beers, IPA, and Imperial Stout, among many others.



MICROBIOLOGICAL PROPERTIES

Classified as a *Saccharomyces cerevisiae*, a top fermenting yeast.

Typical Analysis of Nottingham Yeast:

Percent solids 93% - 97%

Living Yeast Cells $\geq 5 \times 10^9$ per gram of dry yeast

Wild Yeast < 1 per 10^6 yeast cells

Bacteria < 1 per 10^6 yeast cells

Finished product is released to the market only after passing a rigorous series of tests

*According to the ASBC and EBC methods of analysis



BREWING PROPERTIES

In Lallemand's Standard Conditions Wort at 20°C (68°F) Nottingham yeast exhibits:

Vigorous fermentation that can be completed in 4 days

High Attenuation and High Flocculation

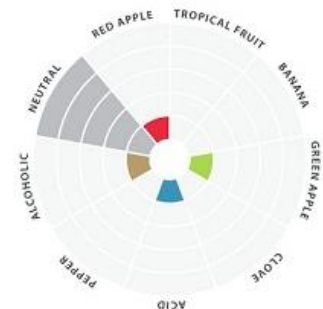
Neutral to slightly fruity and estery flavor and aroma

The optimal temperature range for Nottingham yeast when producing traditional styles is 10°C (50°F) to 22°C (72°F) at lower temperature it is possible to ferment lager-style beers in all-malt wort within 9 days

Fermentation rate, fermentation time and degree of attenuation are dependent on inoculation density, yeast handling, fermentation temperature and nutritional quality of the wort. *If you have questions please do not hesitate to contact us at brewing@lallemand.com*



FLAVOR & AROMA



QUICK FACTS

BEER STYLES

wide variety of ales

AROMA

fruity, estery, neutral

ATTENUATION

high

FERMENTATION RANGE

10 - 22°C (50 - 72°F)

FLOCCULATION

high

ALCOHOL TOLERANCE

14% ABV

PITCHING RATE

50 - 100g/hL to achieve a minimum of 2.5 - 5 million cells/mL

TECH
DATA
SHEET

BREWING
YEASTS

NOTTINGHAM ALE YEAST

