

AISLAMIENTO Y CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE LEVADURAS PRESENTES EN VINAZAS TEQUILERAS^a

ISOLATION AND GROWTH KINETIC OF YEAST PRESENT IN TEQUILA VINASSES

Regalado-Aguirre, J.A.¹; Lona-Elorza, M³.; López-Caamal, F.²; Cea-Barcia, G.
E.^{1,3*}

¹Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida. Universidad de Guanajuato. Ex Hacienda El Copal S/N, El Copal, Irapuato, Guanajuato, México.

²Departamento de Ingeniería Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria alta s/n, Guanajuato, Guanajuato, México. Tel. 473-732-00-06 ext. 1455

³Departamento de Ciencias Ambientales, División de Ciencias de la Vida. Universidad de Guanajuato. Ex Hacienda El Copal S/N, El Copal, Irapuato, Guanajuato, México. Tel. 462-624-18-89 ext.5226 *E-mail: glendacea@ugto.mx (autor por correspondencia)

Fecha de envío: 05, enero, 2023

Fecha de publicación: 30, junio, 2023

Resumen:

Durante la elaboración del tequila, obtenido de la fermentación de jugo de agave, se generan aguas residuales conocidas como vinazas, las cuales contienen elevada carga orgánica, pH ácido, fenoles, furfurales y otros compuestos que en conjunto dificultan su tratamiento y elevan los costos del proceso de producción. Ante esto, la economía circular, funge como una alternativa para la reutilización de las vinazas como materia prima para la producción de etanol por medio de levaduras. Sin embargo, las vinazas contienen compuestos inhibitorios del crecimiento levaduriforme, por lo cual, resulta necesario utilizar levaduras mejor adecuadas a estas condiciones. Debido a esto, la propuesta del presente trabajo consiste en el aislamiento de una levadura presente en vinazas tequileras y determinar su cinética de crecimiento con el fin de evaluar su uso posterior en una biorrefinería para la producción de etanol a partir de vinazas. Las levaduras se aislaron por el método de diluciones seriadas en medio sólido Agar dextrosa Sabouraud (SDA). Posteriormente, el crecimiento celular fue evaluado en un caldo Yeast-extract Peptone Dextrose (YPD) a tres concentraciones de glucosa, 10, 60 y 90 g/L y se determinó el rendimiento de sustrato en masa (Y_x/s) y la tasa específica de crecimiento (μ). La velocidad específica de crecimiento fue similar, $\approx 0.2 \text{ h}^{-1}$, para las concentraciones de glucosa evaluadas. El mayor valor en rendimiento Y_x/s fue de $0.140 \pm 0.025 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{glucosa}}$ a 10 g/L y el mayor porcentaje de remoción de sustrato fue alcanzado a 90 g/L ($99.79 \pm 0.03\%$). Dada la gran capacidad de la levadura para metabolizar el sustrato y convertirlo rápidamente a biomasa resulta ser una levadura apta para su uso en fermentación alcohólica con la proyección a su uso en economía circular de residuos tequileros.

Palabras clave: fermentación alcohólica, vinazas tequileras, valorización de residuos, economía circular, levaduras.

^a Material base de proyecto de tesis de maestría con enfoque en “Economía circular de vinazas tequileras”.

Abstract:

During the production of tequila, obtained from the fermentation of agave juice, wastewater known as vinasse is generated, which contains a high organic load, acid pH, phenols, furfural and other compounds that together hinder the treatment of the wastewaters and increase the production cost. In view of this, the circular economy, is an alternative for the reuse of vinasses as a raw material for ethanol production by means of yeasts. However, stillage contains compounds that inhibit yeast growth, so it is necessary to use yeasts that are better suited to these conditions. Therefore, the proposal of the present work consists of isolating a yeast present in tequila vinasses and determining its growth kinetics in order to evaluate its subsequent use in a biorefinery for the production of ethanol from vinasses. Yeasts were isolated by the method of serial dilutions in solid Sabouraud dextrose agar (SDA) medium. Subsequently, cell growth was evaluated in Yeast-extract Peptone Dextrose (YPD) broth at three glucose concentrations, 10, 60 and 90 g/L and the mass substrate yield ($Y_{x/s}$) and specific growth rate (μ) were determined. The specific growth rate was similar, $\approx 0.2 \text{ h}^{-1}$ for the glucose concentrations evaluated. The highest value in $Y_{x/s}$ yield was $0.140 \pm 0.025 \text{ g}_{\text{biomass}}/\text{g}_{\text{glucose}}$ at 10 g/L and the highest percentage of substrate removal was achieved at 90 g/L ($99.79 \pm 0.03\%$). Due to the high capacity of the yeast to metabolize the substrate and quickly convert it into biomass it is a yeast suitable for use in alcoholic fermentation with the projection of its use in the circular economy of tequila residues.

Keywords: alcoholic fermentation, tequila vinasses, waste valuation, circular economy, yeasts.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la producción de tequila en México se ha elevado drásticamente por una alta demanda en el mercado nacional e internacional (Alcazar-Valle et al., 2019; CRT, 2019). Sin embargo, durante su producción, se obtienen aguas residuales conocidas como vinazas tequileras, las cuales presentan alto contenido de materia orgánica, pH ácido, compuestos orgánicos recalcitrantes y compuestos como fenoles y furfurales que actúan como inhibidores del crecimiento celular de bacterias y levaduras (Dos Reis et al., 2018; Sánchez et al., 2019; Rodríguez-Romero et al., 2020). Además, se ha visto que las vinazas son altamente contaminantes en efluentes acuáticos y en suelos cuando se desechan sin control alguno (Moran-Salazar et al., 2016; Sousa et al., 2019; Martínez-Orozco et al., 2020; Díaz-Vázquez et al., 2022).

No obstante, la mayor parte de los estudios sobre vinazas que se han desarrollado a la fecha presentan una tendencia mayormente limitada a procesos de tratamiento y remediación. Debido a esto, es necesario un abordaje en términos de economía circular para reutilizar estas aguas residuales y obtener otros productos de valor

agregado utilizando levaduras en sistemas conocidos como biorrefinerías, mencionando también una posible disminución del impacto ambiental generado por estos residuos (Alemán-Nava et al., 2017; Cabañas et al., 2019; Sánchez et al., 2019; Rodríguez-Romero et al. 2020; Tsegaye et al., 2020).

Las levaduras son organismos eucariotas unicelulares pertenecientes al filo Ascomycetos, del orden de los *Saccharomycetales* del cual, el género *Saccharomyces* ha resultado de vital importancia desde tiempos remotos (Suh et al., 2006) y en la actualidad son la base de una amplia gama de aplicaciones biotecnológicas e industriales (Suárez-Machín et al., 2016; Parapouli et al., 2020). En la actualidad, *Saccharomyces cerevisiae* se ha definido como el principal modelo de estudio eucariota por su genoma de menor tamaño y baja cantidad génica (Parapouli et al., 2020) y ha sido comúnmente utilizado en la industria alimenticia como levadura para la panificación (Chiva et al., 2020) o en la producción de bebidas (Suh et al., 2006; Parapouli et al., 2020). Por otro lado, se ha diversificado su uso para producción de vitaminas (Perli et al., 2020), producción de moléculas proteínicas con fines nutrimentales (Díaz-Vázquez et al., 2022) o lípidos para producción de biocombustibles (Hoarau et al., 2018; Abeln y Chuck, 2021) y la producción de bioetanol (Basso et al., 2008; Jansen et al., 2017; da Silva Fernandes et al., 2022) entre los más destacados.

Recientemente se han desarrollado diversos procesos de revalorización de residuos por levaduras, dando especial importancia a levaduras silvestres, las cuales se encuentran adecuadas a las condiciones estresantes propias de la naturaleza y además presentan un gran potencial para la conversión de residuos que por su composición compleja resultan difícil de tratar por métodos de tratamiento convencionales. Bajo el mismo tenor, es importante destacar que dependiendo la complejidad de los residuos generados, generalmente se deben utilizar métodos combinados de tratamiento que a su vez encarecen los costos totales del proceso previo a su desecho (Cabañas et al., 2019; Alcazar-Valle et al., 2018).

A pesar de que las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* presentan características favorables para su uso en general como una alta capacidad para soportar concentraciones elevadas de etanol, altas temperaturas, en algunos casos altas concentraciones de azúcares o niveles de pH ácidos (Favaro et al., 2019; Prado et al., 2020; da Silva Fernandes et al., 2022); constantemente se han aislado

cepas silvestres con características fisiológicas similares e incluso superiores a lo observado en levaduras comerciales de uso común. Como menciona Parapouli (2020), el estudio de levaduras silvestres brinda más información acerca de los mecanismos de supervivencia y conductuales que se ponen en funcionamiento bajo las distintas condiciones ambientales presentes en la naturaleza, que las levaduras crecidas en laboratorio bajo condiciones ambientales controladas las cuales a nivel industrial generalmente presentan grandes diferencias respecto a levaduras silvestres (Favaro et al., 2019; da Silva Fernandes et al., 2022).

En este sentido, y con la finalidad de desarrollar un proceso de economía circular como alternativa a los procesos de tratamiento costosos y lentos, el propósito del presente trabajo consiste en el aislamiento de levaduras presentes en vinazas tequileras y la evaluación de su crecimiento en un medio de cultivo estándar mediante la determinación de su tasa de crecimiento y la tendencia en el consumo de sustrato que permitan además, proyectar su uso en biorrefinerías para producción de etanol utilizando vinazas tequileras como medio de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Vinazas tequileras

Las levaduras utilizadas en este trabajo se aislaron de una muestra simple de vinazas colectada en un tanque de decantación de una destiladora tequilera ubicada en Atotonilco el Alto, Jalisco, México.

Las levaduras aisladas fueron caracterizadas macroscópicamente y microscópicamente y se expresaron como morfología colonial y celular respectivamente. Además, la vinaza utilizada se caracterizó fisicoquímicamente determinando pH, azúcares reductores residuales, fenoles y furfurales totales, sólidos suspendidos totales (SST) y volátiles (SSV) y la demanda química de oxígeno (DQO).

Aislamiento y propagación de microorganismos

Para el aislamiento de las levaduras se utilizó medio sólido agar dextrosa sabouraud (MCD Lab, Méx.).

Para la propagación se utilizó caldo de cultivo YEPD Yeast-extract peptone dextrose (BD Bioxon, Méx.).

Para la evaluación de las cinéticas de crecimiento levaduriforme se utilizó caldo de cultivo YEPD Yeast-extract peptone dextrose enriquecido con dextrosa al 1%, 6% y 9% (BD Bioxon, Méx.).

El aislamiento se inició partiendo de 1 ml de vinaza y llevado a 5 diluciones seriadas 1/10 inoculando en nuevas placas de medio sólido SDA, e incubando a 30 °C, durante 48 h. Las sucesivas resiembras en medio sólido SDA se resembraron con un asa metálica por el método de agotamiento de inóculo a 30 °C cada siete días. Para la propagación, se empleó medio de cultivo líquido YPD, en 100 mL se inoculó una colonia de levadura de una placa de medio SDA, se incubó a 30 °C con agitación a 0.7267 g (100 rpm) por 48 h, similar a lo realizado por Hemansi et al. (2022) con algunas modificaciones. Este fue el medio inicial de propagación. Para continuar con la propagación, nuevo medio líquido YPD fue inoculado al 10 % v/v con medio inicial de propagación bajo las mismas condiciones de crecimiento. Este medio sirvió a su vez como inóculo para nuevo medio líquido YPD y de manera similar se desarrollaron las sucesivas resiembras en medio de propagación.

Caracterización macroscópica y microscópica

De una placa con medio SDA, correspondiente a resiembra de la segunda generación de crecimiento, se tomó una colonia y se realizó un frotis fijado con calor y teñido con azul de lactofenol. Se determinó el tamaño celular aproximado mediante el Software libre Zeiss Zen3.4 Blue edition (Zeiss Microscopy, Ger). Asimismo se observó la morfología macroscópica colonial en estereoscopio para la descripción de tamaño, forma, márgenes, propiedades ópticas y elevación.

Monitoreo de las cinéticas de crecimiento

En matraces con caldo YDP (300 mL) con concentración de dextrosa de 10, 60 o 90 g/L se inocularon al 10% w/v con una concentración celular en etapa exponencial (24 h) de 25×10^6 células/mL (conteo en Cámara de Neubauer), a 30 °C, con agitación a 0.7267 g, por 30 h similar a lo desarrollado por Arrizon y Gschaedler (2006). Se tomaron muestreos de 3 mL para medición de etanol, azúcares reductores y biomasa cada 2 h durante las primeras 12 h de fermentación, posteriormente se tomaron muestreos a las 24, 30 y 36 h.

El crecimiento celular inicial y final se determinó por recuento directo en cámara Neubauer. La tasa específica de crecimiento se calculó con la linealización por logaritmo natural de la ecuación de crecimiento exponencial (Ec. 1) ajustada al modelo de Monod tomando el valor de la pendiente de la ecuación de la recta como el valor para μ -velocidad específica de crecimiento (Ec. 2), el porcentaje de sustrato consumido (Ec. 3) y el rendimiento en masa $Y_{x/s}$ (Ec. 4), calculados mediante las siguientes ecuaciones:

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (1)$$

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu t \quad (2)$$

$$\% \text{ Consumo de sustrato} = \frac{(S_i - S_f)}{S_i} * 100 \quad (3)$$

$$Y_{x/s} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad (4)$$

Donde X es la concentración de biomasa, X_0 es la concentración inicial de biomasa, μ es la velocidad específica de crecimiento y t , el tiempo final que delimita la fase exponencial. X_i y X_f corresponden a la concentración inicial y final de biomasa en peso seco mientras tanto S_i y S_f son la concentración de sustrato inicial y final.

Los azúcares se determinaron por el método DNS (reacción azúcar-ácido 3,5-dinitrosalicílico) efectuándose en tubos con 0.5 mL de muestra y 0.5 mL de solución DNS, incubándose a 100 °C durante 5 minutos, enfriando en agua fría por 5 minutos, agregando 4 mL de agua y midiendo absorbancia a 540 nm (Miller, 1959) y se determinó la concentración con una curva de calibración con dextrosa como estándar. El peso seco se determinó acorde a la norma mexicana NMX-034-SCFI-2015 con algunas modificaciones. En tubos eppendorf previamente secados a 105 ± 5 °C y pesados (P_0), se colocaron 2 mL de muestra y se llevaron a centrifugación (1118 g, 10 min). El sobrenadante se retiró y almacenó a -20 °C hasta su uso para determinación de etanol y consumo de sustrato y el pellet celular se lavó en dos ocasiones con solución salina llevándose a incubación a 105 ± 5 °C, 24 h.

Una vez registrado el peso seco del tubo más la muestra (P_1) y el peso seco del tubo (P_0) se determinó el peso seco de la muestra (Ec. 5).

$$\text{Peso seco (105 }^{\circ}\text{C)} = P_1 - P_0 \quad (5)$$

Donde P_1 es el peso del tubo con la muestra después de la deshidratación y P_0 es el peso del tubo después de la deshidratación.

Técnicas analíticas

El pH se determinó con un potenciómetro Hanna HI2020 acorde a las indicaciones del fabricante (Hanna Instruments Inc.) y la demanda química de oxígeno mediante un kit Hach 8000 (COD, Hach Company). Los compuestos fenólicos totales se determinaron por el método Folin-Ciocalteu (Ruíz-Nieto, comunicación personal) en tubos con 187 μL de muestra mezclados con 1406 μL de reactivo Folin-Ciocalteu (10% volumen/volumen) dejándose en reposo por 5 min. Pasado este tiempo se agregaron 1406 μL de carbonato de sodio (20% peso/volumen) dejándose en reposo a temperatura ambiente durante 1 h. Pasado el tiempo se midió absorbancia a 750 nm y se determinó la concentración con una curva de calibración con ácido gálico como estándar. La concentración de sólidos suspendidos totales y volátiles se determinó acorde a los métodos establecidos en la norma mexicana NMX-034-SCFI-2015, y los furfurales se determinaron conforme a lo establecido en la norma mexicana NMX-V-004-NORMEX-2013.

Análisis estadístico

Se realizó un Diseño Completo al Azar variando la concentración de sustrato en 10, 60 y 90 g/L con la velocidad específica de crecimiento (μ), rendimiento en masa Y_x/s (g/g) y el consumo de sustrato (%) como variables de respuesta. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se realizó la prueba Shapiro-Wilks para comprobar la normalidad de los datos, y se realizó un ANOVA y la prueba de Tukey para la Comparación múltiple de medias mediante la herramienta Excel (Office 365, Microsoft, US).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fisicoquímica de la vinaza

Para tener conocimiento de las características químicas de las vinazas tequileras se procedió a la cuantificación de los componentes mencionados en la sección “Materiales y métodos”.

Cuadro 1. Caracterización fisicoquímica de las vinazas utilizada.

Table 1. Physicochemical characterization of vinasses used.

Parámetro	Valor ^c
pH	3.97 ± 0.02
Azúcares reductores residuales (g/L)	4.99 ± 0.65
Fenoles totales (mg/L) ^a	606 ± 15.89
Furfurales (mg/L) ^b	11.08 ± 0.31
DQO (g/L)	32.70 ± 0.28
SST (g/L)	0.49 ± 0.02
SSV (g/L)	≈ 0.49 ± 0.01

^aExpresado como mg de ácido gálico

^bExpresado como mg de furfural

^cValores muestran la media y la desviación estándar de tres réplicas

Las concentraciones observadas de azúcares reductores, pH, demanda química de oxígeno y sólidos suspendidos, son acordes a lo reportado en la literatura (López-López et al., 2010; Moran-Salazar et al., 2016; Martínez-Orozco et al., 2020; Rodríguez-Romero et al., 2020; Jorge et al., 2021; Díaz-Vázquez et al., 2022). De manera similar, las concentraciones de fenol (606 mg/L) y furfural (11 mg/L), compuestos de interés por su efecto inhibitorio del crecimiento, se encontraron dentro del rango reportado en otros trabajos (García-Becerra et al., 2019; Rodríguez-Romero et al., 2020; Jorge et al., 2021) con un valor máximo de fenoles totales reportado para vinazas tequileras de 900 mg/L (García-Becerra et al., 2019) y de furfurales, 285.83 mg/L (Rodríguez-Romero et al., 2020) (Cuadro1).

Con los datos observados, se deduce que el origen de las vinazas tequileras influye en su composición ya que las diferencias en los procesos de producción de tequila causan la generación de vinazas tequileras con una composición química específica.

Aislamiento y caracterización morfológica de la levadura

Las vinazas tequileras presentan diversidad microbiana, tal como detalla Aldrete-Tapia et al. (2020). En este trabajo se observó una gran cantidad de colonias microbianas en una muestra de vinaza cruda (Figura 1a), posiblemente como resultado de las condiciones naturales no estériles de las vinazas y de la zona donde se colectan las mismas (Cabañas et al., 2019) incluso, no se descarta que durante la fermentación del mosto estén involucrados consorcios bacteria-levadura (Aldrete-Tapia et al., 2020).

Asimismo, dentro de las diversas colonias crecidas en el medio de cultivo sólido destacaron dos cepas levaduriformes (Figura 1b), con distinta morfología como se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Características microscópicas y macroscópicas de las levaduras observadas en vinaza tequilerera.

Table 2. Microscopic and macroscopic characteristics of yeast observed in tequila vinasses.

		Cepa 1	Cepa 2
Morfología microscópica^a	Forma	Ovalada alargada	Circular ovalada
	Tamaño	1-2 μm	2-3 μm
Morfología macroscópica^b	Borde	Irregular	Liso
	Textura	Cremosa	Cremosa
	Elevación	Plano	Con elevación
	Color	Blanco opaco	Blanco opaco
	Forma	Ondulada	Circular

^aVisualización al microscopio con aumento de 40x.

^bVisualización al estereoscopio con aumento 8x en medio sólido SDA.

La cepa 2 mostró mayor similitud a las características reportadas para levaduras *Saccharomyces* (Figura 1d) reportada en un estudio (Suh et al., 2006) donde se

analizó filogenéticamente la relación entre diversas levaduras y observando las similitudes morfológicas entre *Saccharomyces cerevisiae* y otras levaduras muy relacionadas entre sí, proponiéndose como característica morfológica primordial la división por gemación y la no formación de ascosporas. Ante esto, y al haber observado la división por gemación en la cepa 2 se procedió con su aislamiento, obteniéndose de la siembra por estría de la dilución 1/10000 donde se observó una concentración de $6 \pm 1.41 (x 10^5)$ UFC/mL, mientras tanto, las resiembras subsecuentes para purificación del cultivo se realizaron mediante siembra por estría en medio sólido SDA (Figura 1c).

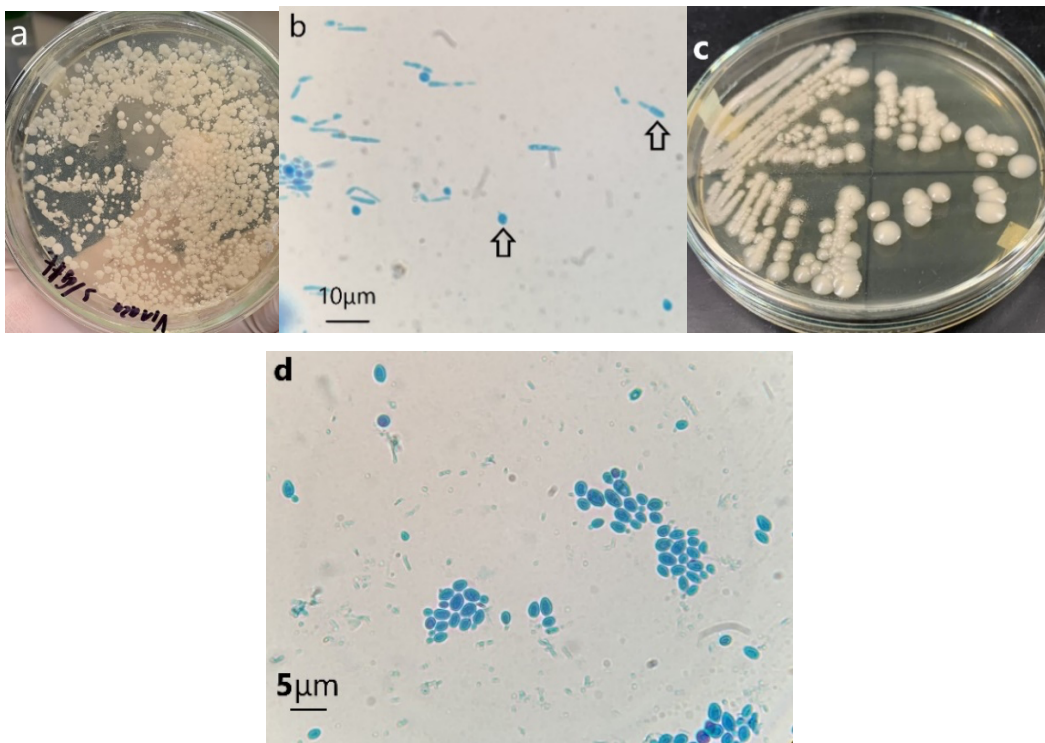


Figura 1. Diversidad microbiana de las vinazas. a) Medio SDA con colonias bacterianas y levaduriformes, b) Morfologías levaduriformes observadas, c) Morfología macroscópica y d) morfología microscópica de la levadura aislada.

Figure 1. Microbial diversity of vinasses. a) SDA medium with bacterial and yeast colonies. b) Observed yeast morphologies, c) Macroscopic and d) microscopic morphology of the isolated yeast.

Con el fin de encontrar cepas de levadura con características de importancia, López-Álvarez et al. (2012) aislaron diversas levaduras y bacterias de bagazo de *Agave tequilana* webber y mosto residual de la destilación observando mayor

osmotolerancia (a 160 y 200 g/L de dextrosa) que levaduras *Saccharomyces cerevisiae* de panadería. Adicional a este trabajo, Šuranská et al. (2016) analizaron distintos mostos de uva y encontraron la presencia de gran cantidad de levaduras del género *Saccharomyces* evaluando además su capacidad de tolerancia al etanol, actividad enzimática y osmotolerancia (a 200 y 400 g/L de dextrosa). En contraste, en este trabajo sólo se evaluó la osmotolerancia a un rango máximo de 90 g/L de dextrosa.

En un trabajo reciente, Chiva et al. (2020) evaluaron masas madre para panificación y lograron aislar levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* evaluando además su actividad enzimática y la capacidad de producción de CO₂. Por otro lado Cabañas et al. (2019) aislaron diversas levaduras de melazas de caña de azúcar con capacidad de crecer en las vinazas obtenidas durante la producción de azúcar de caña y Prado et al. (2020) por su parte, pudieron aislar dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* termotolerantes de tanques de fermentación de melazas de caña de azúcar observando además su capacidad para crecer y fermentar en presencia de condiciones inhibitorias de crecimiento (furfurales y ácidos orgánicos). Análogamente Hemansi et al. (2022) analizaron muestras de suelo, bagazo de caña de azúcar así como muestras de frutas y aislaron diversas levaduras y observaron capacidad termotolerante (42 °C) en algunas cepas.

Cinética de crecimiento levaduriforme

La levadura mostró tendencia similar en el crecimiento celular a 90 y 60 g/L alcanzando 700 millones células/mL a las 12 h, periodo que limitó la fase de crecimiento exponencial, y a 10 g/L el crecimiento máximo llegó a 400 millones células/mL (datos no mostrados). Tendencia similar se observó en la producción de biomasa alcanzando 6 g/L de biomasa celular a las 12 h en el tratamiento a 60 g/L de dextrosa (Figura 2a). Respecto al consumo de sustrato a 10 g/L de dextrosa se observó que a las 6 h la levadura consumió más del 90% del sustrato mientras que a las concentraciones de 60 y 90 g/L un consumo similar se obtuvo hasta las 24 h (Figura 2b).

Esto concuerda con lo observado por Cagnin et al. (2021) quienes usaron concentración de 92 g/L de dextrosa en un medio YNB bajo condiciones similares de crecimiento y observaron un consumo de sustrato por una cepa silvestre

Saccharomyces cerevisiae casi en su totalidad a las 24 h. De manera similar, Prado et al., (2020) evaluaron el crecimiento de una levadura *S. cerevisiae* en un medio YPD enriquecido a 80 g/L de dextrosa y observaron que hasta las 8 h hubo un consumo de sustrato del 62%, por el contrario, en este trabajo se observó un consumo del 52% a las 8h, a una concentración de 90 g/L.

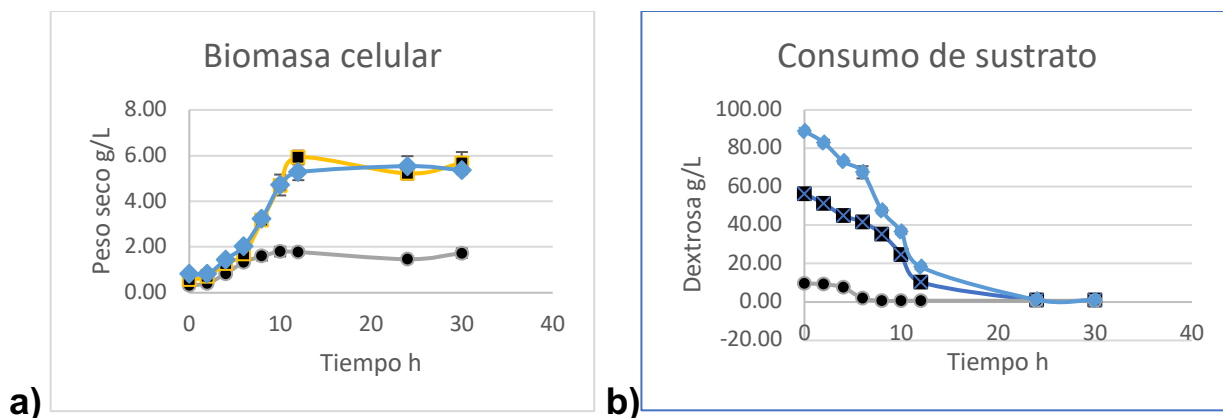


Figura 2. Cinética de crecimiento. Biomasa por peso seco (a) y consumo de sustrato (b) bajo las concentraciones de 10 (●), 60 (■) y 90 g/L (◆) de dextrosa. Las barras verticales indican las desviaciones estándar de la media de las réplicas.

Figure 2. Growth kinetics. Biomass by dry weight (a) and substrate consumption (b) under the concentrations of 10 (●), 60 (■) and 90 g/L (◆) dextrose. Vertical bars indicate standard deviations from the mean of the replicates.

El hecho de que la levadura haya consumido casi la totalidad del sustrato del medio (Cuadro 3) representa un indicativo de robustez metabólica lo que permitió un crecimiento acelerado de la levadura. Por otro lado, es importante mencionar que no se determinó producción de etanol, sin embargo, se observó generación de espuma (datos no mostrados), lo que sugiere que hay formación de CO₂ lo que a su vez se relaciona estequiométricamente con la producción de etanol.

Los datos de la velocidad de crecimiento de la levadura aislada mostraron valores similares entre las tres concentraciones de sustrato evaluadas sin observarse diferencias significativas (Cuadro 3) aunque a 60 g/L la velocidad de crecimiento fue ligeramente mayor. Por lo tanto, los datos proveen la suficiente información para considerar el uso de concentraciones de sustrato de 60 a 90 g/L en futuros ensayos fermentativos sin observar cambios drásticos en el crecimiento.

Cuadro 3. Comparativa de los parámetros cinéticos μ -velocidad específica de crecimiento, consumo de sustrato-%, y rendimiento en masa- $Y_{x/s}$.

Table 3. Comparison of kinetic parameters μ -specific growth rate, substrate consumption-%, and mass yield- $Y_{x/s}$.

Glucosa g/L	$Y_{x/s}$ (g/g)	μ (h^{-1})	Consumo S (%)
10	0.140 ± 0.025^A	0.223 ± 0.014^b	93.310 ± 0.170^C
60	0.052 ± 0.003^a	0.238 ± 0.011^b	98.381 ± 0.031^c
90	0.053 ± 0.001^a	0.220 ± 0.022^b	99.799 ± 0.003^c

Los valores se presentan como media \pm desviación estándar de tres réplicas. Superíndices en mayúscula dentro de la misma columna indican diferencias significativas (Tukey $p < 0.05$).

Cabañas et al. (2019) en un estudio reciente, encontraron valores de la tasa de crecimiento entre 0.09 y 0.24 h^{-1} en diversas cepas de levadura tanto *Saccharomyces* como no-*Saccharomyces* aisladas de mostos de caña de azúcar. Por otro lado, Field et al. (2015) evaluaron una cepa *Saccharomyces cerevisiae* con alta tolerancia al etanol en un medio YNB con condiciones de crecimiento similares a los presentados en este trabajo y observaron un valor de tasa de crecimiento de 0.135 h^{-1} .

Referente al rendimiento en masa $Y_{x/s}$ a la concentración de 10 g/L se obtuvo el mayor rendimiento ($0.144_{g/g}$) y a las concentraciones de 60 y 90 g/L los rendimientos fueron muy similares (Cuadro 2). Esto podría deberse al hecho que a concentraciones bajas de sustrato, la levadura tiende a metabolizarlo para su crecimiento y mantenimiento celular, caso contrario ocurre a concentraciones más altas, donde la levadura ya no sólo utiliza el sustrato para su metabolismo vital sino que redirige el metabolismo del sustrato a otras rutas metabólicas para producción de metabolitos secundarios. Los datos presentan relación a lo observado en otros trabajos que reportaron rendimientos en masa de $0.38_{g/g}$ (Cabañas et al., 2019), $0.15 - 0.56_{g/g}$ (Rodríguez-Romero et al., 2020) y $0.11_{g/g}$ (Prado et al., 2020).

CONCLUSIÓN

Las vinazas utilizadas contienen fenoles, furfurales y pH ácido que en conjunto producen efectos ambientales negativos. Además, los datos observados durante la

caracterización morfológica sugieren que la levadura aislada se asemeja a levaduras del género *Saccharomyces*, sin embargo, resulta necesario llevar a cabo la caracterización e identificación genética de la cepa para corroborar que efectivamente corresponde a una levadura *Saccharomyces*.

Por otro lado, la levadura mostró ser una cepa robusta en cuanto al consumo de sustrato ya que consumió más del 98% del sustrato a concentraciones de sustrato elevadas lo cual la llevó a un mayor crecimiento en un tiempo corto. Si bien, está claro que la levadura debe someterse a nuevos ensayos para determinación de rendimientos fermentativos y producción etanólica, por la rapidez observada en su crecimiento resulta ser una levadura altamente viable para su uso a futuro en otros procesos fermentativos y/o en la fermentación de las mismas vinazas tequileras para la obtención de etanol, biomasa o diversos compuestos de interés económico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dirección de Investigación y Apoyo al Posgrado-DAIP de la Universidad de Guanajuato por el financiamiento del proyecto y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-CONACYT por la beca de Maestría otorgada al Biol. Juan Alberto Regalado-Aguirre.

LITERATURA CITADA

Abeln, F., & Chuck, C. J. (2021). The history, state of the art and future prospects for oleaginous yeast research. *Microbial cell factories*, 20(1), 221. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01712-1>

Alcazar-Valle, M., Gschaedler, A., Gutierrez-Pulido, H., Arana-Sanchez, A. & Arellano-Plaza, M. (2018). Fermentative capabilities of native yeast strains grown on juices from different Agave species used for tequila and mezcal production. *Brazilian Journal of Microbiology* 50:379–388. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00049-7>.

Aldrete-Tapia, J. A., Escalante-Minakata, P., Martínez-Peniche, R. A., Tamplin, M. L., & Hernández-Iturriaga, M. (2020). Yeast and bacterial diversity, dynamics and fermentative kinetics during small-scale tequila spontaneous fermentation. *Food microbiology*, 86, 103339. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103339>



- Alemán-Nava, G. S., Gatti, I. A., Parra-Saldivar, R., Dallemand, J. F., Ritmann, B., & Hafiz M.N. Iqbal. (2017) Biotechnological revalorization of Tequila waste and by-product streams for cleaner production – A review from bio-refinery perspective, *Journal of Cleaner Production*, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.07.134>
- Arrizon, J., & Gschaedler, A. (2006). Effects of the addition of different nitrogen sources in the tequila fermentation process at high sugar concentration. *Journal of Applied Microbiology*, 0(0), 061120055200079–??? doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03142.x
- Basso, L. C., de Amorim, H. V., de Oliveira, A. J., & Lopes, M. L. (2008). Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS yeast research*, 8(7), 1155–1163. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x>
- Cabañas, K. T., Peña-Moreno, I. C., Parente, D. C., García, A. B., Gutiérrez, R. G., & de Morais Jr, M. A. (2019). Selection of *Saccharomyces cerevisiae* isolates for ethanol production in the presence of inhibitors. *3 Biotech*, 9(1). <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1541-3>
- Cagnin, L., Gronchi, N., Basaglia, M., Favaro, L., & Casella, S. (2021). Selection of Superior Yeast Strains for the Fermentation of Lignocellulosic Steam-Exploded Residues. *Frontiers in microbiology*, 12, 756032. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.756032>
- Chiva, R., Celador-Lera, L., Uña, J. A., Jiménez-López, A., Espinosa-Alcantud, M., Mateos-Horganero, E., Vega, S., Santos, M. Á., Velázquez, E., & Tamame, M. (2020). Yeast Biodiversity in Fermented Doughs and Raw Cereal Matrices and the Study of Technological Traits of Selected Strains Isolated in Spain. *Microorganisms*, 9(1), 47. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010047>
- Consejo Regulador del Tequila (CRT). (2019). Análisis estadísticos. Recuperado de: www.crt.org.mx.
- da Silva Fernandes, F., de Souza, É. S., Carneiro, L. M., Alves Silva, J. P., de Souza, J. V. B., & da Silva Batista, J. (2022). Current Ethanol Production Requirements for the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *International journal of microbiology*, 2022, 7878830. <https://doi.org/10.1155/2022/7878830>
- Díaz-Vázquez, Diego & Orozco-Nunnely, Danielle & Yebra-Montes, Carlos & Senés-Guerrero, Carolina & Gradilla-Hernández, Misael. (2022). Using yeast cultures to valorize tequila vinasse waste: An example of a circular bioeconomy approach in the agro-industrial sector. *Biomass and Bioenergy*. 161. 106471. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2022.106471>
- Dos Reis, K. C., Arrizon, J., Amaya-Delgado, L., Gschaedler, A., Schwan, R. F., & Silva, C. F. (2018). Volatile compounds flavoring obtained from Brazilian and

- Mexican spirit wastes by yeasts. *World journal of microbiology & biotechnology*, 34(10), 152. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2535-3>
- Favaro, L., Jansen, T., & van Zyl, W. H. (2019). Exploring industrial and natural *Saccharomyces cerevisiae* strains for the bio-based economy from biomass: the case of bioethanol. *Critical reviews in biotechnology*, 39(6), 800–816. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1619157>
- Field, S. J., Ryden, P., Wilson, D., James, S. A., Roberts, I. N., Richardson, D. J., Waldron, K. W., & Clarke, T. A. (2015). Identification of furfural resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* from a collection of environmental and industrial isolates. *Biotechnology for biofuels*, 8, 33. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0217-z>
- García-Becerra, M., Macías-Muro, M., Arellano-García, L., & Aguilar-Juárez, O. (2019). Bio-hydrogen production from tequila vinasses: Effect of detoxification with activated charcoal on dark fermentation performance. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.10.059>
- Hemansi, Himanshu, Patel, A. K., Saini, J. K., & Singhanian, R. R. (2022). Development of multiple inhibitor tolerant yeast via adaptive laboratory evolution for sustainable bioethanol production. *Bioresource technology*, 344(Pt B), 126247. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126247>
- Hoarau, J.; Grondin, I.; Caro, Y.; Petit, T (2018). Sugarcane Distillery Spent Wash, a New Resource for Third-Generation Biodiesel Production. *Water*, 10, 1623. <https://doi.org/10.3390/w10111623>
- Jansen, M. L. A., Bracher, J. M., Papapetridis, I., Verhoeven, M. D., de Bruijn, H., de Waal, P. P., van Maris, A. J. A., Klaassen, P., & Pronk, J. T. (2017). *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation ethanol production: from academic exploration to industrial implementation. *FEMS yeast research*, 17(5), fox044. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox044>
- Jorge, N., Teixeira, A. R., Matos, C. C., Lucas, M. S., & Peres, J. A. (2021). Combination of Coagulation-Flocculation-Decantation and Ozonation Processes for Winery Wastewater Treatment. *International journal of environmental research and public health*, 18(16), 8882. <https://doi.org/10.3390/ijerph18168882>
- López-Alvarez, A., Díaz-Pérez, A. L., Sosa-Aguirre, C., Macías-Rodríguez, L., & Campos-García, J. (2012). Ethanol yield and volatile compound content in fermentation of agave must by *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 comparing with *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast used in tequila production. *Journal of bioscience and bioengineering*, 113(5), 614–618. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.12.015>



- López-López, A., Davila-Vazquez, G., León-Becerril, E., Villegas-García, E., & Gallardo-Valdez, J. (2010). Tequila vinasses: generation and full scale treatment processes. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 9(2), 109–116. <https://doi.org/10.1007/s11157-010-9204-9>
- Martinez-Orozco, E., Gortares-Moroyoqui, P., Santiago-Olivares, N., Napoles-Armenta, J., Ulloa-Mercado, R. G., De la Mora-Orozco, C., Leyva-Soto, L. A., Alvarez-Valencia, L. H., & Meza-Escalante, E. R. (2020). Tequila Still Distillation Fractioned Residual Streams for Use in Biorefinery. *Energies*, 13(23), 6222. <https://doi.org/10.3390/en13236222>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. doi:10.1021/ac60147a030
- Moran-Salazar, R. G., Sanchez-Lizarraga, A. L., Rodriguez-Campos, J., Davila-Vazquez, G., Marino-Marmolejo, E. N., Dendooven, L., & Contreras-Ramos, S. M. (2016). Utilization of vinasses as soil amendment: consequences and perspectives. *SpringerPlus*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2410-3>
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS microbiology*, 6(1), 1–31. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>
- Perli, T., Wronska, A. K., Ortiz-Merino, R. A., Pronk, J. T., & Daran, J. M. (2020). Vitamin requirements and biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 37(4), 283–304. <https://doi.org/10.1002/yea.3461>
- Prado, C. D., Mandrujano, G. P. L., Souza, J. P., Sgobbi, F. B., Novaes, H. R., da Silva, J. P. M. O., Alves, M. H. R., Eliodório, K. P., Cunha, G. C. G., Giudici, R., Procópio, D. P., Basso, T. O., Malavazi, I., & Cunha, A. F. (2020). Physiological characterization of a new thermotolerant yeast strain isolated during Brazilian ethanol production, and its application in high-temperature fermentation. *Biotechnology for biofuels*, 13, 178. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01817-6>
- Rodríguez-Romero, J. J., Aceves-Lara, C. A., Silva, C. F., Gschaedler, A., Amaya-Delgado, L., & Arrizon, J. (2020). 2-Phenylethanol and 2-phenylethylacetate production by nonconventional yeasts using tequila vinasses as a substrate. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, 25, e00420. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00420>
- Sánchez, A., Sanchez, S., Dueñas, P., Hernandez-Sanchez, P., & Guadalajara, Y. (2019). The Role of Sustainability Analysis in the Revalorization of Tequila Residues and Wastes Using Biorefineries. *Waste and Biomass Valorization*.

Waste Biomass Valor 11, 701–713. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00756-0>

- Sousa, R. M. O. F., Amaral, C., Fernandes, J. M. C., Fraga, I., Semitela, S., Braga, F., Coimbra, A. M., Dias, A. A., Bezerra, R. M., & Sampaio, A. (2019). Hazardous impact of vinasse from distilled winemaking by-products in terrestrial plants and aquatic organisms. *Ecotoxicology and environmental safety*, 183, 109493. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109493>
- Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N. A., & Guevara-Rodríguez, C. A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 50(1), 20–28. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223148420004>
- Suh, S. O., Blackwell, M., Kurtzman, C. P., & Lachance, M. A. (2006). Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts. *Mycologia*, 98(6), 1006–1017. <https://doi.org/10.3852/mycologia.98.6.1006>
- Šuranská, H., Vránová, D., & Omelková, J. (2016). Isolation, identification and characterization of regional indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 47(1), 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.010>
- Tsegaye, B., Jaiswal, S., & Jaiswal, A. K. (2021). Food Waste Biorefinery: Pathway towards Circular Bioeconomy. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(6), 1174. <https://doi.org/10.3390/foods10061174>

