
**ESTUDIO FISIOLÓGICO COMPARATIVO DE DOS CEPAS DE *PICHIA
KLUYVERI* EN LA PRODUCCIÓN DE ÉSTERES.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN
INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA**

PRESENTA

IBT. MÉNDEZ ZAMORA ANDRÉS

DIRECTORA

DRA. LETICIA CASAS GODOY

CO-DIRECTORA

DRA. ILIANA DEL CARMEN BARRERA MARTÍNEZ

ASESORA

DRA. ANNE CHRISTINE GSCHAEDLER MATHIS

ASESOR

DR. ALEJANDRO PEREIRA SANTANA

GUADALAJARA, JALISCO, DICIEMBRE 2020.

Carta Liberación



Guadalajara, Jalisco a 26 de noviembre del 2020

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del (la) estudiante **Andrés Méndez Zamora**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “ESTUDIO FISIOLÓGICO COMPARATIVO DE DOS CEPAS DE PICHIA KLUYVERI EN LA PRODUCCIÓN DE ÉSTERES.” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el estudiante para aspirar al grado de Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica en la opción terminal de Biotecnología Agroalimentaria durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 26 del mes de noviembre del año dos mil veinte.

Dra. Leticia Casas Godoy

Directora de tesis/tutor académico

Dra. Iliana Del Carmen Barrera Martínez

Co-directora de tesis/tutor en planta

Dra. Anne Christine Gschaedler Mathis

Asesora

Dr. Alejandro Pereira Santana

Asesor

Carta de Autorización



Guadalajara, Jalisco, a 7 de diciembre de 2020

CP/1449/2020

ANDRÉS MÉNDEZ ZAMORA

ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA
NÚMERO DE MATRÍCULA 1803MB6411
PRESENTE

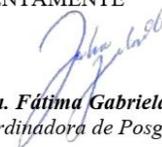
Por este medio le informo que el trabajo de tesis "**Estudio fisiológico comparativo de dos cepas de *Pichia kluyveri* en la producción de ésteres**" desarrollado bajo la dirección del siguiente comité tutorial:

Dra. Leticia Casas Godoy. Directora de tesis
Dra. Iliana del Carmen Barrera Martínez. Co-directora de tesis
Dra. Anne Christine Gshaedler Mathis. Asesora
Dr. Alejandro Pereira Santana. Asesor

ha sido aprobado para su impresión definitiva y defensa correspondiente para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE


Mtra. Fátima Gabriela Ordóñez de la Cruz
Coordinadora de Posgrados



Av. Normalistas No. 800, Colinas de La Normal, CP. 44270, Guadalajara, Jal., México.
Tel: (33) 3345 5200 informes@ciatej.mx www.ciatej.mx



2020
LEONA VICARIO
BENEFICENTIA MAIOR DE LA PATRIA

Junta Directiva

Director de Tesis

Dra. Leticia Casas Godoy

Co-directora de Tesis

Dra. Iliana Del Carmen Barrera Martínez

Asesora

Dra. Anne Christine Gschaedler Mathis

Asesor

Dr. Alejandro Pereira Santana

Agradecimientos

Agradezco y agradeceré infinitamente a mi madre y hermanos por ese apoyo incondicional que siempre me han mostrado en cada aspecto de mi vida, y ahora en esta etapa profesional no es la excepción.

A la Dra. Leticia Casas, por su mentoría y apoyo en cada aspecto que fue necesario para culminar este trabajo. Por compartir conmigo su conocimiento, tiempo y dedicación para mi desarrollo personal y profesional.

A la Dra Anne Gschaedle, por recibirme a medio curso de mi maestría, aun teniendo el tiempo como un reto, pudimos terminar gratamente los objetivos planteados y aún un poco más. Por todo ese apoyo incondicional y humano que siempre me ha mostrado, preguntando no solo por las cuestiones profesionales sino también por las personales.

A la Dra. Iliana del Carmen, por ofrecerme su ayuda y asesoría para poder culminar este trabajo. Por el tiempo dedicado en revisiones de carteles, reportes, tesis, artículo. Por mostrar una cara siempre amable con el ímpetu de ayudar cuando se requiera.

Al Dr. Alejandro Pereira, por compartirme su conocimiento a lo largo de este trabajo y apoyarme con las dudas técnicas en cuestiones de laboratorio y análisis de datos.

Al Dr. Manuel Kirchmayr y al Dr. Melchor, por ese enorme apoyo que me otorgaron en momentos de dudas del manejo técnico del laboratorio. Por brindarme las facilidades de trabajar en las instalaciones de los distintos laboratorios de Biotecnología Industrial de CIATEJ.

A Flor García, por apoyarnos a todos los alumnos por un trabajo organizado, armonioso y ameno en el laboratorio. Por las asesorías técnicas en el manejo de equipos especializados. Por esas comidas en las que compartía su compañía.

A Iliany, Roger, Jesús, Elda, Marco, Andrea y Elizabeth, que fueron mis compañeros y amigos de la maestría, los cuales se volvieron en parte importante de mi vida personal.

A todas las personas que estuvieron por poco o mucho tiempo durante la realización de este trabajo, ya sea en CIATEJ o algún otro lugar y convivieron conmigo.

A CIATEJ y CONACYT por permitirme realizar este posgrado que me permitió crecer en el aspecto profesional y personal.

Finalmente, pero no menos importante a Dios, por darme salud y vida, por permitirme permanecer en este camino y con las personas que estimo y amo.

Dedicatoria

Este trabajo lo dedico a mi héroe y madre, María Gloria Zamora Pérez quien, a pesar de entristecerse por separarnos por mudarme a otra ciudad, siempre me mostro su apoyo y cariño.

Índice General

Carta Liberación	2
Carta de Autorización	3
Junta Directiva	4
Agradecimientos	5
Dedicatoria	7
Índice General	8
Índice de Ilustraciones	11
Índice de Tablas	14
1 Introducción	15
2 Marco teórico	17
2.1 Levaduras.....	17
2.2 Perfiles aromáticos de las bebidas alcohólicas.....	18
2.3 Fermentación Alcohólica.....	19
2.4 Influencia de los factores de cultivo	19
2.5 Bioquímica de la Fermentación	22
2.5.1 Biosíntesis de etanol	22
2.5.2 Biosíntesis de compuestos volátiles	22
2.5.2.1 Biosíntesis de alcoholes superiores.....	24
2.5.2.2 Biosíntesis de ésteres	25
2.5.2.3 Genes y enzimas en la síntesis de ésteres	27
2.6 Levaduras no- <i>Saccharomyces</i> en fermentaciones.....	31
2.6.1 <i>Pichia kluyveri</i> en fermentaciones alcohólicas.....	32
3 Justificación	34
4 Hipótesis	35
5 Objetivos	36
5.1 Objetivo General.....	36

5.2	Objetivos Particulares	36
6	Metodología	37
6.1	Cepas	37
6.2	Formulaciones de Medios.....	38
6.3	Fermentaciones	40
6.3.1	Inóculo	40
6.3.2	Sistemas de fermentación	40
6.4	Cribado de Cepas.....	41
6.5	Diseños Experimentales	41
6.6	Métodos analíticos.....	43
6.7	Análisis Estadístico.....	43
7	Resultados y Discusión	44
7.1	Cribado de Cepas.....	44
7.2	Sistema de micro fermentación	47
7.2.1	Diseño experimental 2 ³	47
7.2.1.1	Crecimiento celular	47
7.2.1.2	Consumo de sustrato y rendimientos.....	49
7.2.1.2	Producción de metabolitos	51
7.2.1.3	Análisis estadístico.....	55
7.2.2	Diseño experimental 2x2x3	59
7.2.2.1	Crecimiento celular	59
7.2.2.2	Consumo de sustrato	60
7.2.2.3	Producción de metabolitos	61
7.2.2.4	Análisis estadístico del segundo diseño experimental.	65
7.2.3	Análisis de Medias.....	70
7.3	Sistema de mini biorreactores.....	74
7.3.1	Efecto de la temperatura.	74
7.3.1.1	Análisis de media	76
7.3.2	Efecto de la velocidad de agitación	77
7.3.2.1	Análisis de medias	79

8	Conclusiones	81
9	Perspectivas	83
10	Referencias	84
11	Anexo Tablas	91
12	Anexo Imágenes	93

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1 Vía metabólica para la síntesis de moléculas volátiles por levadura. Los pasos enzimáticos más importantes son señalados en círculos; 1, piruvato deshidrogenasa; 2, piruvato descarboxilasa; 3, Alcohol deshidrogenasa; 4, Alcohol acil-transferasa; 5, acil-coA: etanol O-aciltransferasa-ceto ácido descarboxilasa; 6, aminoácido transaminasa; 7, α -ceto-ácido descarboxilasa; 8, oxidorreductasa; 9, alcohol aciltransferasa. Los compuestos volátiles finales se muestran en verde. En gris los carbohidratos y ácidos orgánicos cuantificados en el presente trabajo Modificada de Morrissey et al., (2015)	24
Ilustración 2 Mecanismo de esterificación. Modificada de (Wade, 2011).....	26
Ilustración 3. Vía de síntesis de los principales ésteres. A) Ésteres de acetato. B) Étil ésteres de ácidos grasos. Modificado de (Gschaedler <i>et al.</i> , 2015)	28
Ilustración 4 Sistemas de fermentación. a) Tapas con membrana de tubos cónicos de 50 mL del sistema abierto. b) Sistema de mini-biorreactor de 250 mL Applikon®.	40
Ilustración 5 PCA de compuestos volátiles producidos correlacionados con cepas de levadura estudiadas. a) Medio M12 y b) Jugo de agave. Cada color representa un grupo con un alto grado de homogeneidad obtenido mediante UPGA.....	45
Ilustración 6 Niveles de crecimiento celular de ME4a y GRO3 en dos medios de cultivo a dos velocidades de agitación diferentes (100 y 250 rpm) después de 48 h de fermentación del diseño 2 ³	48
Ilustración 7 Sustrato residual de ME4a y GRO3 en dos medios de cultivo a dos velocidades de agitación diferentes (100 y 250 rpm) después de 48 h de fermentación del diseño 2 ³	49
Ilustración 8 Coeficientes de rendimientos metabólicos Y _x s de ME4a y GRO3 en dos medios de cultivo a dos velocidades de agitación diferentes (100 y 250 rpm) después de 48 h de fermentación del diseño 2 ³	50
Ilustración 9 Producción de etanol de ME4a y GRO3 en dos medios de cultivo a dos velocidades de agitación diferentes (100 y 250 rpm) después de 48 h de fermentación del diseño 2 ³ . a) Nivel de producción de etanol, b) Rendimientos específicos de producción de etanol respecto a la cantidad de biomasa.....	51
Ilustración 10 Niveles de producción de ésteres por ME4a y GRO3 en dos medios de cultivo a dos velocidades de agitación diferentes (100 y 250 rpm) después de 48 h de fermentación del diseño 2 ³	53
Ilustración 11 Niveles de producción de alcoholes superiores y acetaldehídos por ME4a y GRO3 en dos medios de cultivo a dos velocidades de agitación diferentes (100 y 250 rpm) después de 48 h de fermentación del diseño 2 ³	54
Ilustración 12 Superficies de respuesta estimada de la síntesis de ésteres a las 48h del diseño experimental 2 ³ . Eje “x” velocidad de agitación (100rpm y 250rpm), el eje “z” es el medio	

de cultivo (M12=químicamente definido y JA=jugo de agave), el eje “y” es el nivel de concentración de cada éster.....	57
Ilustración 13 Niveles de crecimiento celular de ME4a y GRO3 en dos medios de cultivo a tres diferentes temperaturas (20, 25 y 30°C) después de 48 h de fermentación del diseño 2x2x3.	59
Ilustración 14 Niveles de sustrato residual de ME4a y GRO3 en dos medios de cultivo a tres diferentes temperaturas (20, 25 y 30°C) después de 48 h de fermentación del diseño 2x2x3.	60
Ilustración 15 Rendimientos específicos de producción de biomasa por unidad de masa de sustrato (Y _{xs}), de ME4a y GRO3 en dos medios de cultivo a tres diferentes temperaturas (20, 25 y 30°C) después de 48 h de fermentación del diseño 2x2x3.	61
Ilustración 16 Producción de etanol de ME4a y GRO3 en dos medios de cultivo a tres diferentes temperaturas (20, 25 y 30°C) después de 48 h de fermentación del diseño 2x2x3. a) Nivel de producción de etanol, b) Rendimientos específicos de producción de etanol respecto a la cantidad de biomasa.	62
Ilustración 17 Niveles de producción de ésteres por ME4a y GRO3 en dos medios de cultivo a tres diferentes temperaturas (20, 25 y 30°C) después de 48 h de fermentación del diseño 2x2x3.....	63
Ilustración 18 Niveles de producción de alcoholes superiores y acetaldehídos por ME4a y GRO3 en dos medios de cultivo a tres diferentes temperaturas (20, 25 y 30°C) después de 48 h de fermentación del diseño 2x2x3.	64
Ilustración 19 Superficies de respuesta estimada de la producción de ésteres del diseño 2x2x3. ME4a derecha, GRO3 izquierda. Eje "x" Temperatura (° c), eje "z" medio de cultivo (M12 y JA = jugo de agave), eje "y" nivel de concentración estimada de cada éster (mg / L).	68
Ilustración 20 Gráficas de medias del diseño 2 ³ , empleando el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de confianza del 95.0%. En azul el medio M12 en rojo el jugo de agave (JA).....	72
Ilustración 21 Gráficas de medias del diseño 2x2x3, empleando el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de confianza del 95.0%. En azul el medio M12 en rojo el jugo de agave (JA).....	73
Ilustración 22 Cinéticas de crecimiento de GRO3 y ME4a en el sistema de mini biorreactores en jugo de agave a 400 rpm a dos diferentes temperaturas 20°C y 30°C.	75
Ilustración 23 Gráficas de medias de GRO3 y ME4a en el sistema de mini biorreactores, variando la temperatura de fermentación (20 y 30°C). Empleando el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de confianza del 95.0%.....	76
Ilustración 24 Cinéticas de crecimiento de GRO3 y ME4a en el sistema de mini biorreactores en jugo de agave a 30°C a dos diferentes velocidades 400 rpm y 900 rpm.....	78

Ilustración 25 Gráficas de medias de GRO3 y ME4a en el sistema de mini biorreactores, variando la velocidad de agitación (400 y 900 rpm). Empleando el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de confianza del 95.0%.....	79
Ilustración A 1 Cinéticas de crecimiento, sustrato residual y producción de compuestos por GRO3 en el sistema de micro fermentación, con dos diferentes medios y dos diferentes velocidades de agitación 100 y 250 rpm. (Mineral=M12).....	93
Ilustración A 2 Cinéticas de crecimiento, sustrato residual y producción de compuestos por ME4a en el sistema de micro fermentación, con dos diferentes medios y dos diferentes velocidades de agitación 100 y 250 rpm. (Mineral=M12).....	94
Ilustración A 3 Cinéticas de crecimiento, sustrato residual y producción de compuestos por GRO3 en el sistema de micro fermentación, con dos diferentes medios y tres diferentes temperaturas de incubación 20, 25 y 30°C. (Mineral=M12)	95
Ilustración A 4 Cinéticas de crecimiento, sustrato residual y producción de compuestos por ME4a en el sistema de micro fermentación, con dos diferentes medios y tres diferentes temperaturas de incubación 20, 25 y 30°C. (Mineral=M12)	96

Índice de Tablas

Tabla 1 Principales alcoholes superiores producidos por levaduras. Modificado de Swiegers et al. (2005).	25
Tabla 2 Descripción de las cepas de <i>P. kluyveri</i> usadas.....	37
Tabla 3 Composición del medio químicamente definido M12.	39
Tabla 4 Composición de soluciones de vitaminas y oligoelementos	39
Tabla 5 Diseños experimentales realizados en el sistema de micro fermentación.....	42
Tabla 6 Rendimientos específicos (Y_{px}) de GRO3 y ME4a en diferentes condiciones de fermentación a 30 ° C después de 48 h de fermentación del diseño 2 ³	56
Tabla 7 Rendimientos específicos (Y_{px}) de GRO3 y ME4a a diferentes temperaturas a 250 rpm después de 48h de fermentación del diseño 2x2x3.	66
Tabla A 1 Compuestos volátiles producidos por las 21 cepas de <i>Pichia kluyveri</i> después de 8 días de fermentación en medio M12 (mg / L).	91
Tabla A 2 Compuestos volátiles producidos por las 21 cepas de <i>Pichia kluyveri</i> luego de 8 días de fermentación en jugo de agave (mg / L).....	92

1 Introducción

Los microorganismos de interés industrial comparten una serie de características entre las que destaca el tamaño de las células microbianas, debido a que genera a una alta relación de superficie-volumen, lo que facilita el rápido transporte de nutrientes al interior de la célula y, por consiguiente, una elevada tasa metabólica (Lee *et al.*, 2015). Además, los microorganismos utilizados a nivel industrial deben ser genéticamente estables y su escalamiento relativamente fácil. Entre estos microorganismos, las levaduras han sido usadas desde hace miles de años en la fabricación de pan y bebidas alcohólicas.

Específicamente en la industria de las bebidas alcohólicas, las levaduras, son las responsables de llevar a cabo la fermentación, realizando la bioconversión de carbohidratos en alcohol, dióxido de carbono, biomasa y compuestos volátiles. La fermentación está influenciada por diversos factores como la naturaleza y tipo de levadura, la composición y concentración de sustrato, así como las condiciones fisicoquímicas de la fermentación (Bely *et al.*, 2003; Bohlscheid *et al.*, 2007).

La fermentación a nivel industrial es inoculada con levaduras capaces de desarrollarse a altas concentraciones de sustrato y producto (carbohidratos y alcohol), por lo que se usan levaduras comerciales o nativas, a menudo *Saccharomyces cerevisiae* (Lee *et al.*, 2015). Sin embargo, hay un reciente interés por el uso de levaduras no-*Saccharomyces*, debido a que estas proveen a las bebidas una mayor cantidad y variedad de compuestos volátiles, generando bebidas alcohólicas de mejores cualidades organolépticas (Beckner Whitener *et al.*, 2015; Canonico *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2016). Según la literatura, las levaduras no-*Saccharomyces* proliferan en las etapas tempranas de la fermentación, pero su crecimiento se inhibe rápidamente debido a su baja tolerancia al etanol (aproximadamente 30-50 g/L) (Segura-García *et al.*, 2015). A pesar de ello, estas levaduras contribuyen significativamente a la calidad aromática de la bebida final (Romano *et al.*, 2003; Sadoudi *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2014), aumentando el interés por el estudio de las levaduras no-*Saccharomyces* (Canonico *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2010; Ciani *et al.*, 2010; Rêgo *et al.*, 2020; Romano *et al.*, 2003; Segura-García *et al.*, 2015).

En determinadas condiciones de fermentación, estas levaduras compiten favorablemente con levaduras del género *Saccharomyces* en rendimiento y eficiencia de la fermentación (Bely *et al.*, 2003; Lopez-Alvarez *et al.*, 2012), alcanzando niveles de etanol, comparables con los obtenidos a nivel industrial (Segura-García *et al.*, 2015). Además, distintas especies no-*Saccharomyces* podrían usarse para diversificar los perfiles de sabor y aroma en las bebidas alcohólicas, por lo que es necesario buscar compuestos volátiles deseables que sean producidos por nuevas cepas de levadura para aumentar los perfiles sensoriales de las bebidas alcohólicas (Escribano-Viana *et al.*, 2018). Durante la producción de bebidas alcohólicas la modificación de sus características aromáticas es prometedora. Sin embargo, todavía hay pocos datos sobre levaduras no-*Saccharomyces* que otorguen un sabor y aroma específico a cierta bebida alcohólica, por lo que se necesita más investigación para identificar cepas adecuadas para modular el sabor y aroma de determinada bebida alcohólica (Lorenzini *et al.*, 2019). Las características organolépticas de las bebidas alcohólicas son un aspecto esencial en su calidad, siendo los ésteres los principales compuestos que le otorgan dicha calidad. Los esterres son producidos durante la fermentación, principalmente por las actividades de las enzimas acetiltransferasas (EC 2.3.1.84). No obstante, hay reportes de que algunas estererasas (EC 3.1.1.1) también pueden tener capacidad de síntesis de esterres (Parkkinen *et al.*, 1978; Parkkinen *et al.*, 1982).

Por todo lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo analizar los perfiles aromáticos de 21 cepas de *Pichia kluyveri* aisladas de diferentes procesos fermentativos. Además, se estudió la producción de ésteres utilizando dos cepas de *P. kluyveri* en distintas condiciones de operación en dos sistemas de fermentación (micro fermentación y en mini biorreactores). Finalmente, se pretende definir un modelo que describa y mejore la producción de ésteres por este tipo de levaduras, que permita identificar puntos de operación con diferencias significativas en su producción.

2 Marco teórico

2.1 Levaduras

Las levaduras, ya sean ascomicetos o basidiomicetos, pueden definirse como aquellos hongos unicelulares, donde las hifas y/o pseudohifas pueden o no estar presentes, cuyo crecimiento asexual resulta predominantemente de la gemación o fisión, y que no forman sus estados sexuales dentro o sobre un cuerpo fructífero (Kurtzman *et al.*, 2011; Mendoza, 2005). Por lo que las levaduras representan un grupo muy diverso de microorganismos, e incluso las cepas que se clasifican como la misma especie a menudo muestran un alto nivel de divergencia genética y fenotípica (Gschaedler *et al.*, 2015). La biodiversidad de las levaduras está altamente relacionada con su aplicabilidad, durante siglos, hemos explotado su potencial enzimático para la producción de alimentos fermentados como pan y bebidas alcohólicas.

La levadura representa un excelente modelo científico debido a su origen eucariota y al conocimiento de su genética, así como al metabolismo examinado a detalle, por lo menos para *Saccharomyces cerevisiae*. En 1996, se dilucido el genoma de *S. cerevisiae*, lo que permitió el estudio global de la expresión y funcionamiento de su genoma. Hoy en día, la levadura se considera una herramienta versátil con fines biotecnológicos, principalmente en el sector alimenticio (bebidas y panes) y en la producción de biomasa (proteína unicelular, SCP por sus siglas en inglés). Recientemente, también se ha implementado su uso en la industria de los biocombustibles y la producción de compuestos heterólogos (Żyłańczyk-Duda *et al.*, 2017).

En la industria alimentaria, *Saccharomyces* es el género de levadura más usado, mientras que los géneros de *Candida*, *Endomycopsis* y *Kluyveromyces* son comúnmente usados para la producción de SCP. Tanto los enfoques clásicos, como las estrategias modernas de manipulación genética, se enfocan en generar variantes relevantes para trabajar en condiciones industriales específicas (Barnett *et al.*, 2005; Steensels *et al.*, 2014). Se debe de considerar que sean cepas no patógenas con estabilidad genotípica y fenotípica y además deben tener tiempos de duplicación cortos y bajos requerimientos nutricionales (Żyłańczyk-Duda *et al.*, 2017).

Su principal aplicación es en los procesos fermentativos, surge de su alta capacidad metabólica para transformar azúcares en alcohol etílico y dióxido de carbono en condiciones generalmente anaerobias, además de una alta producción de compuestos aromáticos secundarios que proveen atributos organolépticos a determinados productos. *S. cerevisiae* ha sido considerada

como la levadura modelo para el estudio de la biosíntesis de compuestos volátiles, no obstante, actualmente se conoce que son las levaduras no-*Saccharomyces* las que producen las mayores concentraciones y variedades de estos compuestos (Jolly *et al.*, 2014).

2.2 Perfiles aromáticos de las bebidas alcohólicas.

Los perfiles aromáticos de las bebidas alcohólicas se clasifican según las fuentes de los diferentes compuestos que contribuyen en él. Esto incluye el aroma varietal, formado por los compuestos provenientes de la materia prima; el aroma pre-fermentativo, constituido por los compuestos formados durante las operaciones de extracción y acondicionamiento del mosto; el aroma fermentativo, producido por levaduras y bacterias durante la fermentación alcohólica y maloláctica; y por último el aroma pos-fermentativo, que es el que otorgan los compuestos que aparecen durante el proceso de envejecimiento mediante acciones enzimáticas o fisicoquímicas en la maduración de las bebidas (Rapp, 1998; Schreier, 1979). En la etapa fermentativa, los compuestos responsables de estos perfiles aromáticos son los metabolitos secundarios sintetizados principalmente por las levaduras, para lo cual, se requiere de la interacción de diversas rutas biosintéticas del catabolismo y anabolismo (Morrissey *et al.*, 2015).

En las bebidas alcohólicas, los compuestos volátiles dominantes son los productos de la fermentación debido a su alta concentración. Los principales compuestos volátiles que otorgan el sabor y a aroma a las bebidas alcohólicas son los ácidos orgánicos, alcoholes superiores, ésteres y en menor medida, aldehídos. Sin embargo, cuando algunos compuestos están presentes en concentraciones excesivas, también pueden considerarse indeseables, tales como el acetaldehído, ácido acético, acetato de etilo y el diacetilo. Los compuestos aromáticos indeseables son los compuestos de azufre reducido, sulfuro de hidrógeno, sulfuros orgánicos y tioles (Lambrechts *et al.*, 2019).

A pesar de que los ésteres están presentes en las bebidas alcohólicas en concentraciones relativamente bajas, juegan un importante rol en las características organolépticas de estas, debido a que su umbral de detección es bajo. Los principales ésteres presentes en las bebidas son los ésteres de acetato, como el acetato de etilo y el acetato de isoamilo; así como los etil ésteres de ácidos grasos, como el hexanoato de etilo y el octanoato de etilo (Verstrepen *et al.*, 2003a). Presentes en cantidades adecuadas estos compuestos confieren notas frutales y florales a las bebidas.

2.3 Fermentación Alcohólica

La fermentación alcohólica es un proceso biológico que realizan algunos microorganismos en condiciones generalmente anaerobias, el cual consiste en la conversión de carbohidratos en alcohol, dióxido de carbono, biomasa y compuestos aromáticos. Desde una perspectiva bioquímica podemos definir como fermentación al proceso biológico en el que el último receptor de electrones es una molécula orgánica. Los azúcares fermentables son utilizados por las levaduras como fuente de carbono para la obtención de energía por medio de reacciones de óxido reducción. La fermentación puede dividirse en tres etapas principales: el transporte de azúcar al interior de la célula, la transformación de los azúcares a piruvato y la producción de metabolitos.

En la literatura se han reportado 18 genes involucrados en el transporte de monosacáridos, en *S. cerevisiae*, cada uno de estos transportadores tiene una afinidad diferente para cada azúcar (Gschaedler *et al.*, 2015). Una vez que la glucosa ingresa en la célula, inicia un proceso metabólico conocido como glucolisis, del cual el producto final es el piruvato, y gracias a la acción de diez enzimas, el piruvato como nodo, es precursor de distintos metabolitos. Sin embargo, las tasas de producción de estos metabolitos están influenciada por diversos factores.

2.4 Influencia de los factores de cultivo

La etapa de la fermentación es fundamental ya que definirá en gran medida la calidad del producto. Sin embargo, el proceso de fermentación y por ende, la producción de alcoholes y ésteres está influenciada por diferentes factores como el tipo de cepas participantes, composición y concentración del medio, y las condiciones de fermentación (temperatura, presión, velocidad de agitación, oxígeno disuelto) (Arrizon *et al.*, 2002; Bely *et al.*, 2003; Bohlscheid *et al.*, 2007).

Respecto al tipo de microorganismo podemos decir que para que un organismo lleve a cabo el proceso de fermentación, éste debe de tener una capacidad fermentativa, la cual se define como la habilidad que tienen los microorganismos (especialmente levaduras), para consumir carbohidratos y producir etanol en condiciones ambientales y nutricionales controladas (Van Hoek *et al.*, 1998). La capacidad fermentativa varía con respecto a la especie de levadura e incluso existen diferencias considerables entre distintas cepas (Gschaedler *et al.*, 2015). Por otra parte, existen estudios sobre la sucesión de la microbiota nativa durante la fermentación de sustratos no estériles, resaltando la influencia de la capacidad fermentativa de cada uno de los microorganismos en ciertas condiciones (Rainieri *et al.*, 2000).

A nivel industrial, debido a los altos costos de esterilización, ésta no se realiza, por lo que se incrementa el volumen y concentración del inóculo, el cual puede llevar a cabo un proceso eficiente de fermentación, estandarizándolo al usar una misma cepa y promoviendo de esta forma una calidad más consistente de los productos (Bely *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2010). Las cepas participantes se pueden clasificar en tres categorías: (a) fermentación espontánea, (b) cepas comerciales o nativas y (c) cepas de levaduras no-*Saccharomyces*. En la fermentación espontánea participan cepas nativas del sustrato como *Torulaspota delbrueckii*, *Hanseniaspora spp.* y *Kluyveromyces marxianus* que ceden progresivamente a *S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida milleri* y *Brettanomyces spp.*, lo cual provoca una alta variabilidad en la calidad de las bebidas (Lachance, 1995). Las fermentaciones con cultivos de levadura comerciales o nativas, a menudo utilizan *S. cerevisiae* (Díaz-Montaña *et al.*, 2008). En la fermentación con cepas de levaduras no-*Saccharomyces*, destacan los géneros *Brettanomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomycoides*, *Zygosaccharomyces*, *Issatchenkia* y *Torulaspota*.

Con respecto a la composición y concentración del medio, la cantidad de nitrógeno asimilable tiene un rol importante en la duración y desarrollo del proceso. El nitrógeno influye en la velocidad de la fermentación y es precursor de la biosíntesis de algunos compuestos volátiles (Arrizon *et al.*, 2007; Bely *et al.*, 2003; Molina-Guerrero *et al.*, 2007). Por otra parte, la deficiencia de nitrógeno puede causar el aletargamiento o detención de la fermentación.

Así mismo, es importante considerar la naturaleza y concentración de la fuente de carbono en el medio de cultivo, además de la adaptabilidad de los microorganismos al estrés, debido a que la supervivencia celular puede depender de su capacidad de adaptarse rápidamente al entorno cambiante. Cualquier factor ambiental o nutrimental que pueda tener un efecto adverso en el crecimiento celular se considera condición de estrés. Existen diferentes tipos de estrés que afectan a las levaduras durante la fermentación: estrés por choque térmico, estrés por etanol, estrés oxidativo, y estrés osmótico por solo mencionar los más comunes, los cuales tienen una alta correlación con la composición y concentración del medio (Ivorra *et al.*, 1999).

Los mecanismos de protección contra alguna condición de estrés implica la síntesis rápida de moléculas protectoras y la activación de sistemas de transducción de señales que inducen eventos secundarios como el encendido de actividades enzimáticas y la transcripción de genes que codifican factores que tienen funciones protectoras (Ivorra *et al.*, 1999).

Ivorra *et al.* (1999), realizaron un análisis de la expresión génica en condiciones específicas de estrés durante la fermentación, encontrando al gen HSP12 como indicador en las cepas con poca resistencia al estrés, por lo tanto, propensas a fermentaciones deficientes.

Por otra parte, se ha reportado que con concentraciones elevadas de azúcar (>180 g/L), el crecimiento y la viabilidad de la levadura decrece debido al estrés osmótico y a la presencia de algunos inhibidores, tales como el etanol, CO₂ y ácidos grasos saturados de seis, ocho y diez átomos de carbono, los cuales inhiben el transporte de azúcares y nitrógeno (Ivorra *et al.*, 1999; Munoz *et al.*, 1989). Dicha inactivación suele presentarse en las levaduras carentes de amonio (Bohlscheid *et al.*, 2007; Salmon, 1989; Wang *et al.*, 2003). Con el objetivo de evitar los problemas tecnológicos antes mencionados, se adiciona alguna fuente de nitrógeno asimilable, generalmente en forma de sales de amonio o aminoácidos.

Sin embargo, se ha reportado que solo sirve durante la fase temprana de crecimiento (Arrizon *et al.*, 2002; Salmon, 1989). Según el Consejo Regulador del Tequila (2005), las principales fuentes de nitrógeno usadas industrialmente son la urea, el fosfato de amonio, y el sulfato de amonio. Otro ejemplo es que por lo general en la industria, se hace uso de materia prima variable como sustrato, como el jugo de agave, el cual presenta diferencias de composición entre cada lote.

Por otro lado, dentro de las condiciones de cultivo, la temperatura es un factor sumamente significativo, debido a que afecta el metabolismo, promoviendo la formación de metabolitos secundarios como ácidos orgánicos y alcoholes superiores (Torija *et al.*, 2003). En la producción de vino y/o cerveza, por arriba de los 20°C se favorece la producción de alcoholes superiores, esteroides y ácidos grasos, mientras que temperaturas entre 5°C y 15°C se favorece la producción de acetaldehído y diacetilo (Willaert *et al.*, 2006).

La temperatura y el oxígeno son variables importantes para dirigir el metabolismo de las levaduras a procesos anaerobio, aerobio o mixto. En el caso del oxígeno favorecer la síntesis de alcoholes, esteroides y ácidos grasos o a la producción de acetaldehídos y diacetilos en el caso de la temperatura (Willaert *et al.*, 2006).

2.5 Bioquímica de la Fermentación

2.5.1 Biosíntesis de etanol

Uno de los principales metabolitos en la fermentación es el etanol, el cual es sintetizado en la etapa llamada como fermentación alcohólica, la cual consiste en la conversión del piruvato a etanol, mediante dos reacciones consecutivas teniendo como intermediario al acetaldehído. Una de las enzimas involucradas depende de iones Mg_2^+ , y la otra podría requerir una activación de iones de hierro (Gschaedler *et al.*, 2015). Sin embargo, la producción de etanol en levaduras provoca diversos problemas celulares, por ejemplo puede ser un inhibidor del crecimiento celular y de la división celular, asimismo disminuye el volumen celular, mientras que a altas concentraciones reduce la viabilidad y aumentan la muerte celular (Stanley *et al.*, 2010).

El etanol también influye en el metabolismo celular ya que disminuye la tasa de acumulación de ARN y proteínas, aumenta la frecuencia de mutaciones puntuales, y desnaturaliza proteínas intracelulares y enzimas glicolíticas (Stanley *et al.*, 2010). Así mismo, afecta la integridad de la membrana celular, disminuyendo la permeabilidad de las especies iónicas y reduciendo la fluidez de la membrana plasmática, permitiendo la disipación transmembranal del potencial electroquímico provocando un incremento en la acidez intracelular (Gschaedler *et al.*, 2015).

Liang *et al.* (2014) localizaron y clonaron los genes que codifican las cuatro enzimas alcohol deshidrogenasas de *K. marxianus*, esto para tratar de dilucidar el cómo esta levadura puede producir etanol a altas temperaturas. Los resultados mostraron que la capacidad de fermentación de *K. marxianus* a 40°C era la misma que la de *S. cerevisiae* a 34°C de acuerdo a la producción de etanol. Además, reportan que la enzima KmAdh1 (codificada por el gen ADH1) es la principal responsable de la producción de etanol a partir de la reducción de acetaldehído en la levadura *K. marxianus*.

2.5.2 Biosíntesis de compuestos volátiles

Los compuestos volátiles son los responsables del olor y el sabor en las bebidas alcohólicas (Amaya-Delgado *et al.*, 2013). Estos compuestos se clasifican en compuestos con azufre, ácidos orgánicos, alcoholes superiores, compuestos carbonados y ésteres (Morrissey *et al.*, 2015). De entre los cuales, los alcoholes superiores y los ésteres son los principales responsables de dar tonos

aromáticos, aumentando la calidad del producto (Swiegers *et al.*, 2005; Verstrepen *et al.*, 2003c). Por otra parte, los compuestos azufrados y dicetonas vecinales se consideran aromas indeseables.

Todo el perfil sensorial de las bebidas alcohólicas es el resultado de la mezcla de diversos compuestos producidos durante el proceso de elaboración, sin embargo, la mayor parte de estas sustancias son sintetizadas durante la fermentación (Beckner Whitener *et al.*, 2015; Pires *et al.*, 2014). La capacidad de sintetizar compuestos volátiles por una levadura está influenciada por una interacción dinámica entre diferentes componentes como lo es el medio de cultivo, la cepa, las condiciones de operación, así como los microorganismos con los cuales cohabita durante la fermentación (Beckner Whitener *et al.*, 2015). Por ello, la síntesis de volátiles resulta un sistema complejo difícil de predecir; sin embargo, se conocen las rutas metabólicas establecidas para la síntesis de algunos de estos compuestos.

En la Ilustración 1 se muestra un esquema general de las principales vías metabólicas de la levadura involucradas en la síntesis de compuestos volátiles. En la síntesis se requiere la interacción de tres metabolismos centrales carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos, derivados de las vías centrales anabólicas o catabólicas en la levadura (Morrissey *et al.*, 2015). Iniciando con la asimilación de la fuente de carbono disponible en el medio de cultivo, la concentración de la fuente de carbono puede dirigir el metabolismo a la fermentación alcohólica o a la respiración celular (en presencia de oxígeno) (Gschaedler *et al.*, 2015). A ciertas concentraciones es posible que el metabolismo de las levaduras se dirija hacia la fermentación, aunque el medio tenga niveles de oxígeno, a lo que se le conoce como efecto Crabtree (De Deken, 1966).

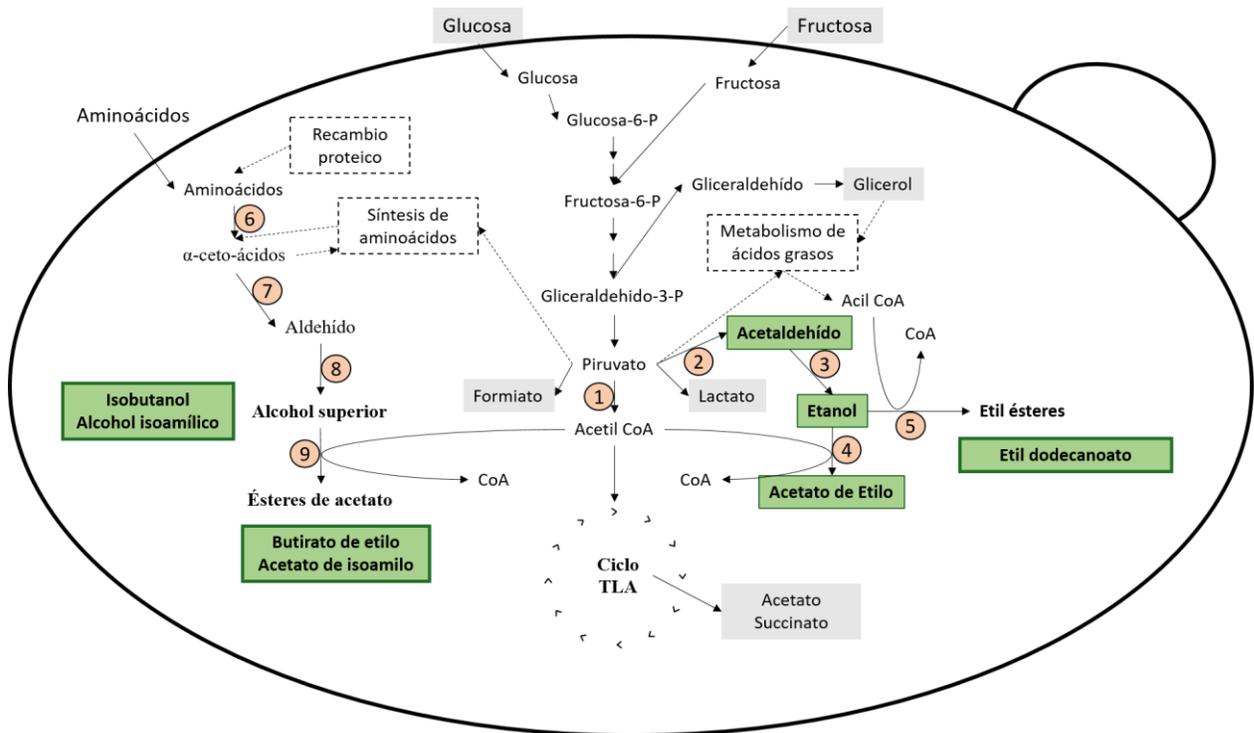


Ilustración 1 Vía metabólica para la síntesis de moléculas volátiles por levadura. Los pasos enzimáticos más importantes son señalados en círculos; 1, piruvato deshidrogenasa; 2, piruvato descarboxilasa; 3, Alcohol deshidrogenasa; 4, Alcohol acil-transferasa; 5, acil-coA: etanol O-aciltransferasa-ceto ácido descarboxilasa; 6, aminoácido transaminasa; 7, α-ceto-ácido descarboxilasa; 8, oxidorreductasa; 9, alcohol aciltransferasa. Los compuestos volátiles finales se muestran en verde. En gris los carbohidratos y ácidos orgánicos cuantificados en el presente trabajo Modificada de Morrissey et al., (2015) .

A continuación, se describe a detalle la biosíntesis de los alcoholes superiores y ésteres, tomando como base la información disponible para la levadura *S. cerevisiae*.

2.5.2.1 Biosíntesis de alcoholes superiores

Cualquier molécula con un grupo hidroxilo unido a hidrocarburo con más de dos átomos de carbono, con un mayor peso molecular que el etanol es considerado un alcohol superior. Dichos alcoholes superiores son generalmente precursores de algunos ésteres de acetato. Los alcoholes superiores se dividen en dos grupos: alifáticos y aromáticos. Los compuestos alifáticos incluyen al propanol, alcohol isobutilo, alcohol amílico y alcohol isoamílico, mientras que en el grupo de los aromáticos, el que el más importante es el 2-fenil etanol (Swiegers *et al.*, 2005).

Las levaduras sintetizan los alcoholes superiores mediante dos reacciones, la primera es una descarboxilación de los cetoácidos, y la segunda una reacción de óxido-reducción, en la cual

el aldehído es reducido al alcohol correspondiente. Los cetoácidos se pueden sintetizar por dos vías: la catabólica y la anabólica. La vía catabólica o vía de Ehrlich consiste en tres reacciones básicas que son catalizadas enzimáticamente.

La primera reacción consiste en la transaminación de los aminoácidos para formar su respectivo α -cetoácido; la segunda reacción se realiza por la descarboxilación del α -cetoácido generando un aldehído; y la tercera reacción es la reducción del aldehído a su correspondiente alcohol superior (Varela *et al.*, 2017). A continuación, en la Tabla 1, se muestran los principales alcoholes superiores producidos por levaduras y los aminoácidos de los cuales se originan.

Tabla 1 Principales alcoholes superiores producidos por levaduras. Modificado de Swiegers et al. (2005).

Alcohol superior	Aminoácido	Concentración en vino (mg/L)	Umbral de detección (mg/L)	Aroma
Propanol	Treonina, metionina, Ac. aspártico, serina	9.0-68	500 ^a	Floral, jabón
Isobutanol	Valina	~140	500 ^a y 200 ^b	Alcohólico
Alcohol isoamilo	Leucina	45-490	300 ^a	Mazapán
Alcohol amílico	Isoleucina	15-150	300 ^a y 65 ^b	Mazapán
2-feniletanol	Fenilalanina	10-100	125 ^b	Floral, rosas
Tirosol	Tirosina	---	---	Miel

^a: en vino, ^b: en cerveza

2.5.2.2 Biosíntesis de ésteres

Los ésteres se encuentran dentro de los compuestos aromáticos que pueden sintetizar de forma natural las levaduras. Los ésteres son compuestos orgánicos derivados de ácidos carboxílicos en los cuales el grupo hidroxilo (-OH) se sustituye por un grupo alcoxilo (-OR) (Wade, 2011). Estos compuestos se asocian a los diferentes aromas, por ejemplo el aroma a plátano maduro proviene principalmente del acetato de isoamilo (Wade, 2011). Los ésteres son sintetizados por un mecanismo de esterificación que consiste en una sustitución nucleofílica sobre el grupo acilo, catalizada por un ácido, una base o una enzima (Ilustración 2) (Wade, 2011). El mecanismo se resume en dos pasos: (1) adición del alcohol al grupo carbonilo (catalizada) y (2) deshidratación catalizada. Por otra parte, los alcoholes pueden formar ésteres inorgánicos con ácidos inorgánicos

como el ácido nítrico, sulfúrico y fosfórico. Así mismo, el grupo alcohol en un éster puede cambiarse por medio de una transesterificación, produciendo un éster y un alcohol distintos.

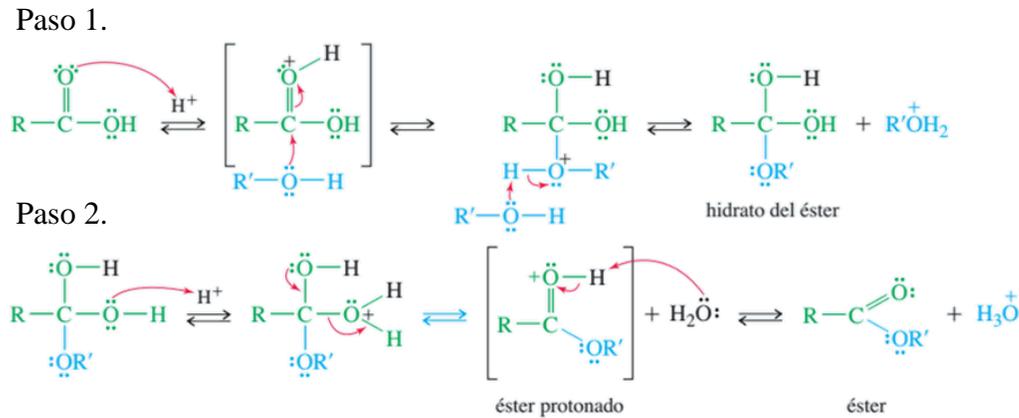


Ilustración 2 Mecanismo de esterificación. Modificada de (Wade, 2011).

Los ésteres presentes en las bebidas alcohólicas son producidos por las levaduras mediante una esterificación enzimática. Para poder llevarse a cabo la síntesis de ésteres, los ácidos orgánicos deben estar ligados a una coenzima-A, formando la acil-CoA. Las acil-CoA son moléculas altamente energéticas, en presencia de oxígeno son β -oxidadas en unidades más pequeñas (acetil-CoA) en la mitocondria (Gschaedler *et al.*, 2015). Esto sucederá cuando el ácido orgánico involucrado sea un ácido acético, ya que éste se volverá acetil-CoA. Sin embargo, la mayoría de la acetil-CoA producida por levaduras provienen de la descarboxilación oxidativa del piruvato.

La producción de éster está influenciada por dos factores: las concentraciones de los co-sustratos y la actividad de la sintasa de éster total. Sin embargo, la influencia relativa de estos dos factores sigue sin estar bien dilucidada (Verstrepen *et al.*, 2003c).

Existen dos grupos principales de ésteres en las bebidas alcohólicas, los ésteres de acetato y los etíl ésteres de ácidos grasos. En el primer grupo, el grupo ácido es el ácido acético y el alcohol es etanol producido durante la fermentación u otros alcoholes superiores derivados del metabolismo de aminoácidos. En el segundo grupo, los etíl ésteres de ácidos grasos, el alcohol es etanol y el grupo ácido es un ácido graso de cadena media o larga (Verstrepen *et al.*, 2003c).

2.5.2.3 Genes y enzimas en la síntesis de ésteres

Las primeras investigaciones sobre la producción de ésteres se enfocaron en la disponibilidad de sustratos como el factor determinante. Estos estudios mostraron un cierto grado de correlación entre las concentraciones de sustrato y la correspondiente producción de ésteres, por lo que se aceptó que las concentraciones de sustrato regulaban la síntesis de ésteres (Calderbank *et al.*, 2018; Thurston *et al.*, 1982). Sin embargo, estudios más recientes en *S. cerevisiae* se han centrado en investigar el impacto de las actividades de la sintasa de éster en las tasas de formación de éster (Malcorps *et al.*, 2018; Verstrepen *et al.*, 2003a; Verstrepen *et al.*, 2003b). Así mismo, se han enfocado en el análisis del efecto de variables físico-químicas en las tasas de formación de ésteres por levaduras no-*Saccharomyces* (Amaya-Delgado *et al.*, 2013; Ciani *et al.*, 2010; Díaz-Montañón *et al.*, 2008; Gschaedler *et al.*, 2015; Morrissey *et al.*, 2015; Sadoudi *et al.*, 2012; Segura-García *et al.*, 2015)

La síntesis de ésteres ha sido mayormente estudiada en *S. cerevisiae*. En esta levadura los ésteres son producidos por acetiltransferasas que catalizan la reacción de condensación entre dos sustratos, una molécula activa de acil/acetil-coenzima A (acil/acetil-CoA) y un alcohol o alcohol superior (Malcorps *et al.*, 2018; Nordström, 1962; Nordström, 1963; Nordström, 1964; Saerens *et al.*, 2006). Las enzimas más estudiadas en la síntesis de ésteres son las llamadas alcohol acetiltransferasas (AATasa; EC 2.3.1.84). Estas enzimas catalizan la formación de ésteres de acetato a partir de un alcohol y acetil-CoA.

Se han identificado tres AATasas: AATasa I, Lg-AATasa I, y AATasa II. Estas enzimas están codificadas por ATF1, ATF1 Lg-ATF1 y ATF2, respectivamente (Fujii *et al.*, 1994; Fujii *et al.*, 1996a; Malcorps *et al.*, 1992; Yoshimoto *et al.*, 1998; Yoshimoto *et al.*, 1999). ATF1 y ATF2 están presentes en las cepas de *S. cerevisiae* y de *Saccharomyces bayanus*, mientras que Lg-ATF1 solo se ha reportado en las cepas de levadura de *S. bayanus* (Yoshimoto *et al.*, 1998). Búsquedas basadas en la homología del genoma de *S. cerevisiae* no han revelado otros genes con homología a ATF1 y/o ATF2. (Malcorps *et al.*, 1992; Mason *et al.*, 2000).

De igual manera la síntesis de etil éster de ácidos grasos es catalizada por dos acil CoA/etanol O-aciltransferasas (AEATasas) Eeb1 y Eht1, codificadas por los genes EEB1 y EHT1 (Pires *et al.*, 2014). Dichas éster sintasas están involucrada en la biosíntesis de los ésteres de ácidos grasos de cadena media (C6 -C10) (Dufour *et al.*, 2003; Saerens *et al.*, 2006). Otros estudios han sugerido la existencia de más AATasas involucradas en la síntesis de ésteres de acetato (Verstrepen

et al., 2003c) y AEATAs involucradas en la síntesis de étil ésteres de ácidos grasos (Saerens *et al.*, 2006).

La Ilustración 3 muestra las reacciones químicas que envuelven la biosíntesis de ésteres de acetato y étil ésteres de ácidos grasos, mostrando sobre las flechas los principales genes implicados en la reacción (Gschaedler *et al.*, 2015).

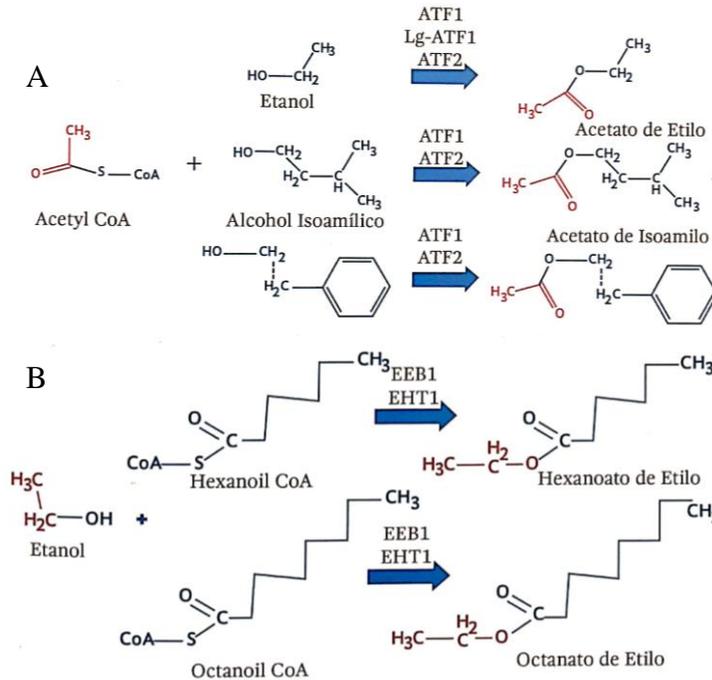


Ilustración 3. Vía de síntesis de los principales ésteres. A) Ésteres de acetato. B) Étil ésteres de ácidos grasos. Modificado de (Gschaedler *et al.*, 2015)

Por otra parte, las esterasas (EC 3.1.1.1.) pueden desempeñar un papel importante en la acumulación de ésteres. Las esterasas representan un grupo diverso de hidrolasas que catalizan la escisión, pero en algunos casos también la formación de enlaces éster. Ciertas esterasas pueden sintetizar acetato de etilo a partir de etanol y ácido acético en una solución tamponada simple sin ningún cofactor (Malcorps *et al.*, 2018; Parkkinen *et al.*, 1978; Parkkinen *et al.*, 1982). En *Acetobacter pasteurianus*, la eliminación del gen EST1 que codifica una esterasa, provoca que no se produzcan el acetato de etilo y ni el acetato de isoamilo (Critiani *et al.*, 2001; Kashima *et al.*, 2000).

La levadura de sake *Hansenula mrakii*, se ha descrito una esterasa que sintetiza acetato de isoamilo (Inoue *et al.*, 1997). Sin embargo, falta evidencia de la capacidad de síntesis de éster de las esterasas de levadura (Kashima *et al.*, 2000; Parkkinen *et al.*, 1978).

La eliminación del gen IAHI que codifica la esterasa previamente conocida como Est2, produce un aumento en la producción de acetato de etilo y acetato de isoamilo, lo que demuestra que la esterasa estudiada hidroliza principalmente estos ésteres y no es responsable de una parte importante de su producción (Fukuda *et al.*, 1998b; Verstrepén *et al.*, 2003c). Por otra parte, el efecto de Iah1p en otros ésteres, como el grupo de ésteres etílicos, aún no se ha estudiado a fondo (Verstrepén *et al.*, 2003c).

La purificación parcial de las actividades esterasa en *S. cerevisiae* ha demostrado que existen al menos dos fracciones diferentes con actividad esterasa, lo que indica que el proteoma puede contener más esterases aún no identificadas (Fukuda *et al.*, 1998b; Verstrepén *et al.*, 2003c). El aceto de isoamilo se sintetiza a partir del alcohol isoamílico y acetyl-CoA por la ATF1 y se hidroliza por la esterasa Iah1 en *S. cerevisiae* (Fukuda *et al.*, 1998a). Fukuda *et al.* (1998a) compararon las actividades de Iah1 y Atf1, encontrando que la cantidad de isoamilo aumenta con una proporción creciente de la actividad Atf1/Iah1, por lo que el equilibrio de estas dos actividades enzimáticas es importante para la acumulación de acetato de isoamilo en el metabolismo de esta levadura.

En el estudio realizado por Fujii *et al.* (1996b) encontraron que en las cepas haploides de *S. cerevisiae* atf1 Δ , las actividades de la isoamil acetato transferasa y la etanol-acetato-transferasa fueron 80 y 20% más bajas, respectivamente, que en la levadura nativa. Esto dio como resultado una disminución del 80% en la producción de acetato de isoamilo y del 30% en la producción de acetato de etilo en comparación con la levadura nativa.

En otro estudio, la sobreexpresión de ATF1 de una cepa de levadura de cerveza, aumentó 27 veces la producción de acetato de isoamilo y 9 veces la producción de acetato de etilo en comparación con las transformantes de vector vacío (Fujii *et al.*, 1994; Fukuda *et al.*, 1998a). De manera similar, la sobreexpresión de Lg-ATF1 mostró un aumento de siete veces en el acetato de isoamilo y un aumento de dos veces en las concentraciones de acetato de etilo (Fujii *et al.*, 1994).

Por otra parte, se han realizado otras investigaciones utilizando mosto de uva o mosto de cebada como medio de fermentación y cepas industriales que sobreexpresan ATF1. La sobreexpresión de ATF1 en las levaduras de vino comerciales VIN7 y VIN13, aumentan de 3 a 10 veces las concentraciones de acetato de etilo y de 4 a 12 veces las concentraciones de acetato de isoamilo en los vinos producidos (Lilly *et al.*, 2000).

Del mismo modo, se ha demostrado que la sobreexpresión de ATF1 en una cepa de cerveza comercial produce concentraciones significativamente mayores de acetato de isoamilo y acetato de etilo en las cervezas producidas (Verstrepen *et al.*, 2003b). Esto indica que el nivel de expresión de ATF1 es un factor limitante para la síntesis de ésteres (Verstrepen *et al.*, 2003c).

Tanto Nagasawa *et al.* (1998) como Yoshimoto *et al.* (1999) sugirieron que Atf2p podría ser responsable del 20% de la producción de acetato de isoamilo en una cepa Δ atf1. Además, no queda claro si las proteínas Atf también son responsables de la formación de otros ésteres (Verstrepen *et al.*, 2003c). Por otra parte, Verstrepen *et al.* (2003c) reportó que la cepa de *S. cerevisiae* atf1 Δ atf2 Δ , no mostró síntesis residual de acetato de isoamilo, acetato de pentilo, acetato de hexilo, acetato de heptilo, acetato de octilo o acetato de fenil etilo. Cabe destacar que la producción de acetato de etilo, acetato de propilo y acetato de isobutilo se redujo solo en un 50% en la cepa atf1 Δ atf2 Δ . Esto demuestra que existe al menos otra enzima aún no identificada con actividad AATasa en *S. cerevisiae* (Malcorps *et al.*, 2018; Malcorps *et al.*, 1992).

Además de estas cinco enzimas, recientemente se describió una nueva enzima (Eat1) de la levadura *Wickerhamomyces anomalus*, responsable de las altas producciones de acetato de etilo (Kruis *et al.*, 2017). Se han reportado altas producciones de acetato de etilo mediante la enzima Eat1 de *W. anomalus* y *K. marxianus* expresada en *E. coli* (Kruis *et al.*, 2020; Kruis *et al.*, 2017). Eat1 se encuentra en las mitocondrias y se han encontrado homólogos en cepas de *S. cerevisiae*, *Cyberlindnera jadinii*, *Cyberlindera fabianii*, *Kluyveromyces lactis*, *Wickerhamomyces ciferrii*, *Hanseniaspora uvarum* y *Eremothecium cymbalariae* (Kruis *et al.*, 2017; Kruis *et al.*, 2018b). La interrupción de Eat1 y cinco alcoholes acil transferasas (AATasas) (Atf1, Atf2, Eht1, Eeb1, Imo32) de *S. cerevisiae*, mostró que la cepa Δ Atf1 Δ Atf2 Δ Eat1 todavía producía acetato de etilo, y la interrupción adicional de Imo32 (homólogo de Eat1) no podía explicar esta producción (Kruis *et al.*, 2018a). Por lo tanto, *S. cerevisiae* tiene otros mecanismos para la producción de acetato de etilo y acetato de isoamilo, que podrían incluir AATasas desconocidos o diferentes reacciones enzimáticas (Kruis *et al.*, 2018a).

Por otro lado, van Rijswijck *et al.* (2019) encontraron que *C. fabianii* carece de un homólogo de Atf1, mientras que *Pichia kudriavzevii* carecía de homólogos de Atf1 y Atf2, siendo Eat1 el único miembro conocido de la familia ATT en esta última especie.

Así mismo, se ha reportado que la reducción de la actividad de la AATasa está estrechamente relacionada con el grado de represión del ARNm de ATF1, lo que sugiere que la represión del gen es el principal medio para reducir la actividad de la AATasa in vivo (Fujii *et al.*, 1997; Verstrepen *et al.*, 2003c). Sin embargo, la mayoría de los estudios de sobreexpresión se basaron en plásmidos multicopia, por lo que algunas diferencias entre las cepas pueden deberse a diferencias en el número de copias del plásmido, sin embargo, se tiene poco conocimiento de la posible contribución de otras enzimas en la actividad de síntesis de ésteres por lo que se define que los resultados no son concluyentes con respecto a los trabajos con cepas transformadas con vectores multicopia.

2.6 Levaduras no-*Saccharomyces* en fermentaciones.

Durante la fermentación alcohólica las levaduras producen principalmente etanol, CO₂ y compuestos de sabor y aroma como productos secundarios. En el proceso de fabricación de tequila, se han detectado diferentes géneros de levaduras no-*Saccharomyces*, tales como *Brettanomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomycoides*, *Zygosaccharomyces*, *Issatchenkia* y *Torulaspota* (Lachance, 1995), las cuales han sido identificados en otras bebidas alcohólicas, como el vino. Sin embargo, en la industria de las bebidas alcohólicas se tiene un conocimiento limitado de los parámetros que afectan la fermentación del jugo de agave (Pinal *et al.*, 1997) y la caracterización de la levadura (Flores-Berrios *et al.*, 2005).

El uso de levaduras no-*Saccharomyces* para la producción de bebidas alcohólicas ha sido documentada desde los 1990's (Bilbao *et al.*, 1997; Cabranes *et al.*, 1997; Ciani *et al.*, 1998; Ciani *et al.*, 1995; Lachance, 1995) enfocándose principalmente en la producción de vino y sidra. Recientemente se han evaluado diferentes géneros de levaduras no-*Saccharomyces*, tales como *Brettanomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomycoides*, *Zygosaccharomyces*, *Issatchenkia*, *Torulaspota*, *Metchnikowia* y *Oenococcus*, como cultivos individuales o en co-cultivos con *S. cerevisiae*, por su capacidad para aumentar la complejidad del sabor y aroma de las bebidas alcohólicas (Beckner Whitener *et al.*, 2015; Canonico *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2010; Ciani *et al.*, 2010; Escribano-Viana *et al.*, 2018; Kong *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2016; Sadoudi *et al.*, 2012; Saerens *et al.*, 2008; Segura-García *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2014).

Existen diversos reportes del perfil aromático de las bebidas alcohólicas (Aguilera-Rojo *et al.*, 2003; Kong *et al.*, 2019; Lachenmeier *et al.*, 2006; Sadoudi *et al.*, 2012; Vallejo-Cordoba *et al.*, 2004). Benn *et al.* (1996) distinguieron más de 175 compuestos volátiles en tres tipos de tequila, reportando altas concentraciones de alcoholes superiores y bajas concentraciones de ésteres, acetatos, terpenos, furanos, ácidos, aldehídos, cetonas, fenoles y sulfuros. La mayoría de estos compuestos se producen durante la fermentación, por lo que la composición de la comunidad microbiana es un factor clave en la calidad aromática de las bebidas fermentadas (Beckner Whitener *et al.*, 2015; Canonico *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2016).

Por otra parte, Rojas *et al.* (2001) evaluaron 11 cepas de los géneros *Candida*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces* y *Saccharomyces*, encontrando que las cepas de *Hanseniaspora guilliermondii* y *Pichia anomala* mostraban las mayores tasas de producción de ésteres de acetato. La evaluación de *H. guilliermondii*, *P. anomala* y *S. cerevisiae* en dos condiciones de aireación, mostró que un ambiente aeróbico promovía la síntesis de ésteres para las cepas no-*Saccharomyces*, pero afectaba la producción de *S. cerevisiae* en el medio sintético (Rojas *et al.*, 2001).

Por otro lado, Kong y Col. (2019), evaluaron una cepa de *Pichia fermentans*, en fermentación mixta con *S. cerevisiae*, para la producción de vino de uva espiga China, encontrando que el contenido de alcoholes superiores y ésteres aumenta de manera significativa con fermentación mixta, mejorando los rasgos frutales y florales de dicho vino. Así mismo, se ha reportado que algunas levaduras no-*Saccharomyces* producen una concentración baja de alcoholes superiores en el jugo de Sauvignon Blanc para la producción de vino (Sadoudi *et al.*, 2012). Sin embargo, Segura-García *et al.* (2015) reportan producciones mayores de alcoholes superiores con *K. marxianus* que con *S. cerevisiae* en jugo de agave.

2.6.1 *Pichia kluyveri* en fermentaciones alcohólicas

Actualmente, son escasos los trabajos publicados sobre *P. kluyveri* en fermentaciones alcohólicas. Sin embargo, esta levadura ha mostrado un interesante potencial en la producción de ésteres, a pesar de sus relativas bajas producciones de etanol comparadas con levaduras del género *Saccharomyces*. De hecho, esta cualidad fue aprovechada por Saerens *et al.* (2017), quienes generaron las distintas versiones de la patente WO2014135673 (US 9580675), para la producción de cerveza baja en alcohol o sin alcohol con *P. kluyveri*.

Por otra parte, *P. kluyveri* ha sido usada en fermentaciones de cacao (Batista *et al.*, 2015), de café (Feng *et al.*, 2016), así como en fermentaciones mixtas con *Saccharomyces* para la producción de vino (Lu *et al.*, 2016; Rojas *et al.*, 2001; Whitener *et al.*, 2017) y cerveza (Michel *et al.*, 2016).

Así mismo, Segura-García *et al.* (2015), evaluaron a *P. kluyveri* en dos medios de cultivo (jugo de agave y medio mineral), encontrando que *P. kluyveri* mostró un mayor crecimiento que *S. cerevisiae* y *K. marxianus* en ambos medios. Estos resultados señalan que el crecimiento de esta levadura no-*Saccharomyces* es similar o mayor que el de *S. cerevisiae*.

Por lo tanto, si el medio es adecuado las levaduras no-*Saccharomyces* pueden consumir azúcar y producir niveles de etanol (30 g/L) similares a los obtenidos en la industria (Segura-García *et al.*, 2015). En el mismo estudio se reporta una gran producción de ésteres (acetato de etilo y acetato de isoamilo) por *P. kluyveri* y *K. marxianus* en comparación con *S. cerevisiae*. Además, solo se detectó la presencia de acetato de isoamilo en fermentaciones de *P. kluyveri*.

Por otra parte, Amaya-Delgado *et al.* (2013) encontraron que éstas dos cepas no-*Saccharomyces* produjeron hasta 130 veces más acetato de etilo que *S. cerevisiae* en las mismas condiciones de fermentación. Mediante un análisis de componentes principales, se clasificó a *K. marxianus* y *S. cerevisiae* en un grupo distinto que a *P. kluyveri*, identificando en esta última cepa una correlación entre la alta población celular y la alta concentración de ésteres e isobutanol. *P. kluyveri*, fue más eficiente para la producción de alcohol y etil lactato que *S. cerevisiae*, en las mismas condiciones de fermentación a escala industrial (Amaya-Delgado *et al.*, 2013).

3 Justificación

En la industria de las bebidas alcohólicas, la etapa de la fermentación es fundamental ya que ésta definirá en gran medida la calidad del producto, sin embargo, se encuentra influenciada por diferentes factores, que impactan en las producciones de los compuestos volátiles sintetizados en la fermentación (Arrizon *et al.*, 2002; Bely *et al.*, 2003; Bohlscheid *et al.*, 2007). Algunos de los factores más importantes son la naturaleza y tipo de levadura(s) usada(s), así como la composición y/o concentración del medio de cultivo, y las condiciones físico-químicas de la fermentación.

Debido a estos factores y a una falta de estandarización en los procesos, existe una amplia variabilidad en la producción de alcoholes y ésteres. Además, no se tiene totalmente descrita la influencia de los factores que afectan la biosíntesis de ésteres. Por otro lado, los estudios de la producción de ésteres se han enfocado en las producciones de *S. cerevisiae*, a pesar de reportes que indican que la mayor cantidad y diversidad de estos compuestos es realizada por cepas no-*Saccharomyces* (Jolly *et al.*, 2014).

De igual manera, antecedentes de investigaciones realizadas por el grupo de trabajo y las referencias en la literatura resaltan el potencial uso de levaduras no-*Saccharomyces* en las fermentaciones alcohólicas. Sin embargo, ni la capacidad metabólica ni las vías de síntesis de ésteres están ampliamente descritas para este tipo de levaduras, además de que existe un limitado conocimiento de los parámetros que afectan la síntesis de ésteres por cepas no-*Saccharomyces* en la fermentación.

Esta situación ha promovido la investigación y estandarización de procesos fermentativos, por lo que el presente trabajo ayudará a entender y caracterizar la producción de ésteres por las levaduras no-*Saccharomyces* de *Pichia kluyveri*, así como fundamentar las bases de un análisis de expresión diferencial de la biosíntesis de ésteres bajo distintas operaciones de fermentación a escala laboratorio.

Así mismo, el presente trabajo proporcionará las bases para la fermentación en condiciones de mini biorreactores y mejorará la producción de ésteres por levaduras *Pichia kluyveri* identificando su posible correlación con algunos parámetros de la fermentación.

4 Hipótesis

La producción de ésteres varía considerablemente entre cepas del mismo género y especie (*Pichia kluyveri*), y la modificación de ciertas condiciones de fermentación pueden aumentar la producción de ésteres, así como reducir los tiempos de cultivo.

5 Objetivos

5.1 Objetivo General

- ✓ Estudiar la producción de ésteres por diferentes cepas de *Pichia kluyveri* bajo distintas condiciones de operación y dos sistemas de fermentación.

5.2 Objetivos Particulares

- ✓ Realizar un análisis estadístico de los perfiles aromáticos producidos por 21 cepas de *P. kluyveri* para identificar y seleccionar cepas con características significativamente diferentes.
- ✓ Caracterizar a nivel laboratorio y de mini biorreactor el crecimiento y la producción de esterres con las cepas de *P. kluyveri* seleccionadas.
- ✓ Identificar las variables con las mayores diferencias en la producción de ésteres.

6 Metodología

6.1 Cepas

Las veintiún cepas de *P. kluyveri* pertenecen a la colección del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C (CIATEJ). Todas las cepas fueron previamente aisladas de diferentes procesos fermentativos, como mezcal, raicilla, tejuino y cacao (Tabla 2).

Tabla 2 Descripción de las cepas de *P. kluyveri* usadas.

Nombre	Código	Proceso	Estado	Región	Año de aislamiento
GRO3	1	Mezcal	Guerrero	Chilpancingo	2002
MG2	2	Mezcal	Guerrero	Eduardo Neri	2014
MG3	3	Mezcal	Guerrero	Eduardo Neri	2014
ME1d	4	Mezcal	Estado de México	Malinalco	2016
ME2b	5	Mezcal	Estado de México	Malinalco	2016
ME3b	6	Mezcal	Estado de México	Malinalco	2016
ME1c	7	Mezcal	Estado de México	Malinalco	2016
ME4a	8	Mezcal	Estado de México	Malinalco	2016
KH1b	9	Cacao	Chiapas	Tapachula 1	2016
KH1a	10	Cacao	Chiapas	Tapachula 1	2016
KB1h	11	Cacao	Chiapas	Tapachula 2	2016
KB1c	12	Cacao	Chiapas	Tapachula 2	2016
KB1f	13	Cacao	Chiapas	Tapachula 2	2016
KB1e	14	Cacao	Chiapas	Tapachula 2	2016
KB3g	15	Cacao	Chiapas	Tapachula 2	2016
KB1b	16	Cacao	Chiapas	Tapachula 2	2016
KB2a	17	Cacao	Chiapas	Tapachula 2	2016
KB2d	18	Cacao	Chiapas	Tapachula 2	2016
KN23	19	Cacao	Tabasco	Cunduacan	2009
RJC	20	Raicilla	Jalisco	Cabo Corrientes	2017
TZB	21	Tejuino	Jalisco	Zapopan	2016

6.2 Formulaciones de Medios.

El medio YPD (extracto de levadura 10g/L, peptona 20g/L y glucosa 20g/L) fue usado para la reactivación y el crecimiento de las cepas. Para su preparación se mezclaron todos los componentes, disolviendo en agua y esterilizando en autoclave a 121°C por 15 min.

El medio con jugo de agave cocido de *Agave tequiliana* var. azul, fue proporcionado por una tequilera, ajustando a 100 g/L de azúcares totales y adicionando fosfato de amonio (0.5 g/L) y sulfato de magnesio (0.05 g/L). El jugo de agave paso por varias filtraciones, primero con un colador de cocina, posteriormente con papel filtro en dos ocasiones, seguida de una filtración tangencial con membrana de 0.45 micras, y por último una filtración en campana de flujo laminar con una unidad de filtración estéril de 0.22 micras.

Para la preparación del medio sintético (Tabla 3) se prepararon soluciones separadas debido a que algunos compuestos no son termoestables y algunas soluciones no pueden ser almacenadas por lapsos mayores a 24 horas. Todas las soluciones se mezclaron antes de la fermentación. Las soluciones preparadas fueron:

- Fuente de carbono: Se prepararon soluciones separadas de fructosa (500 g/L) y glucosa (750 g/L) disolviendo los azúcares en agua destilada. Se esterilizaron por autoclave a 121°C por 15 min.
- Preparación de vitaminas: las vitaminas se prepararon en una sola solución con un volumen final de 250 ml, con las concentraciones mostradas en la Tabla 4. Se disolvieron las vitaminas y se ajustó el pH de la mezcla a 6.5 con NaOH 1M. Se aforó la solución a 250 mL en matraz volumétrico y se esterilizó por filtración. Almacenando a 4°C.
- Oligoelementos: Cada oligoelemento se preparó individualmente, a un volumen de 100 mL como se muestra en la Tabla 4. Se disolvió cada oligoelemento sin calentar, por separado en vasos precipitados, una vez disuelto se aforó cada uno a un volumen de 100 ml. El FeCl₂ es fotosensible. Se esterilizaron por filtración en campana y se almacenaron a 4°C.
- Macronutrientes: los macronutrientes y fuentes de nitrógeno se prepararon de manera conjunta (Ver Tabla 3). Las sales se disolvieron con agitador magnético, se ajustó el pH a 4.5, y se esterilizó a 121°C por 15 min.

Por cada litro de medio sintético se agregaron 2.5 mL de solución de vitaminas, 1mL de cada oligoelemento, 180 mL de solución de fructosa, 14 mL de solución de glucosa y 794.5 mL de agua con las sales disueltas (macronutrientes).

Tabla 3 Composición del medio químicamente definido M12.

Clasificación	Compuesto	Concentración (g/L)
Fuente de Carbono	Glucosa	10
	Fructosa	90
Fuente de Nitrógeno	(NH ₄) ₂ SO ₄	3
Macronutrientes	KH ₂ PO ₄	3
	NaHPO ₄ 2H ₂ O	1.49
	Ácido Glutámico	1
Oligo elementos	MgCl ₂ 6H ₂ O	0.4122
	ZnCl ₂	0.0192
	CuCl ₂ 2H ₂ O	0.00061
	MnCl ₂ 4H ₂ O	0.00445
	CoCl ₂ 6H ₂ O	0.0005
	CaCl ₂	0.01736
	FeCl ₂ 4H ₂ O	0.01166
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0.00036
	H ₃ BO ₃	0.003
	Ácido aminobenzoico	0.001
Vitaminas	Myo-inositol	0.125
	Ácido nicotínico (B3)	0.005
	Ácido pantoténico (B5)	0.005
	Piridoxina (B6)	0.005
	Tiamina HCl (B1)	0.005
	Biotina (B7, B8)	0.000024

Tabla 4 Composición de soluciones de vitaminas y oligoelementos

Solución	Compuesto	Concentración (g/mL)
Vitaminas	Ácido aminobenzoico	0.1
	Myo-inositol	12.5
	Ácido nicotínico (B3)	0.5
	Ácido pantoténico (B5)	0.5
	Piridoxina (B6)	0.5
	Tiamina HCl (B1)	0.5
	Biotina (B7, B8)	0.0024
Oligoelementos	MgCl ₂ 6H ₂ O	41.22
	ZnCl ₂	1.92
	CuCl ₂ 2H ₂ O	0.061
	MnCl ₂ 4H ₂ O	0.445
	CoCl ₂ 6H ₂ O	0.05
	CaCl ₂	1.736
	FeCl ₂ 4H ₂ O	1.166
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0.036
	H ₃ BO ₃	0.3

6.3 Fermentaciones

6.3.1 Inóculo

Para la reactivación de las cepas se inóculo la muestra crio preservada en una placa de YPD solido por 24h. Posteriormente se tomó una colonia y se inocularon 50 mL de medio YPD líquido, en matraces de 250 mL con agitación de 250 rpm a 30°C por 24h para generar el inóculo. Las fermentaciones se desarrollaron en dos sistemas de fermentación (Ilustración 4).

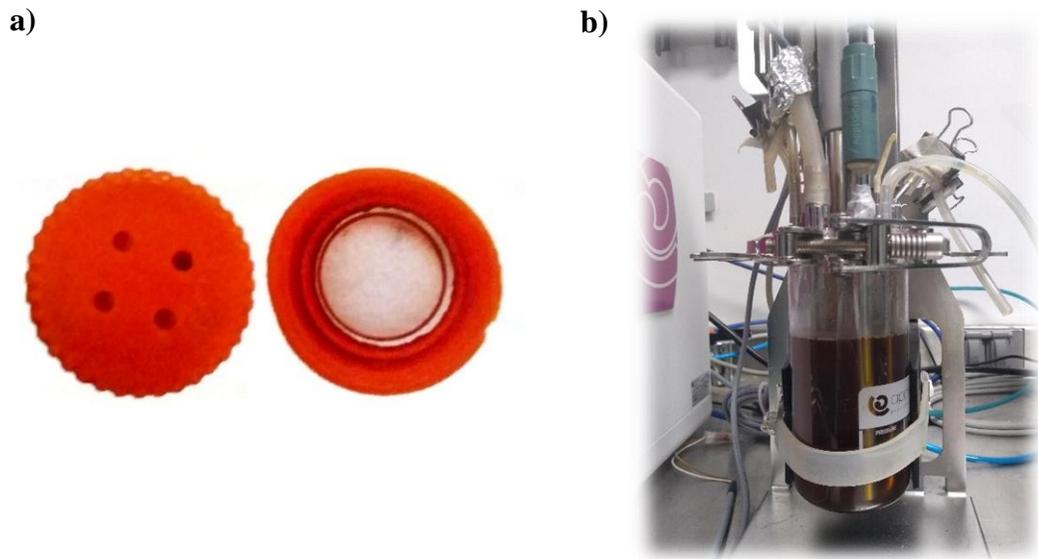


Ilustración 4 Sistemas de fermentación. a) Tapas con membrana de tubos cónicos de 50 mL del sistema abierto. b) Sistema de mini-biorreactor de 250 mL Applikon®.

6.3.2 Sistemas de fermentación

El primer sistema fue un sistema de micro fermentación que constaba de tubos cónicos de 50 mL marca Corning®, los cuales cuentan con una membrana para el intercambio gaseoso con el ambiente (Ilustración 4a), realizando cada fermentación por duplicado con una concentración inicial de células de 2.5×10^8 cel/mL en un volumen de operación de 20 mL de medio a 30°C. Con el objetivo de afectar lo menos posible los sistemas de fermentación abierta se sacrificó todo el sistema por cada toma de muestra, los muestreos fueron realizados a las 0, 24, 48 y 120 h de la fermentación.

El segundo sistema es un sistema de mini biorreactores Applikon® de tipo tanque agitado de 250 mL con un volumen de operación de 200 mL (Ilustración 4b). Cada fermentación se realizó por duplicado, igualmente se inocularon con una concentración inicial de células de 2.5×10^8 cel/mL. Los muestreos fueron realizados a las 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 39, 48, 60 y 72 horas después de la fermentación.

La agitación fue mediante dos impulsores de tipo Rushton, la cual pertenece al grupo de agitadores de flujo radial. El sensor de oxígeno disuelto fue calibrado al 100%, después de dejar el sistema estéril agitando en la configuración correspondiente al diseño experimental por toda la noche. Por otra parte, los sensores de pH fueron calibrados a dos puntos, y la cuantificación de biomasa fue realizada por peso seco y densidad óptica de manera “*ex situ*”.

6.4 Cribado de Cepas

La cuantificación de los compuestos volátiles producidos por 21 cepas de *P. kluyveri* en jugo de *A. tequilana* var. azul y medio químicamente definido M12 fue realizada por Gutiérrez-Avendaño en la tesis titulada “Estudio de la influencia de condiciones de fermentación sobre la producción de compuestos aromáticos por *Pichia kluyveri*”.

A partir de estos datos se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés) para la evaluación de la producción de los diferentes compuestos volátiles generados por las 21 cepas de *P. kluyveri*. Posteriormente se realizó un análisis de conglomerados basados en el método de conglomerados aplicados a la matriz de distancias calculadas con UPGMA (Método de grupos pares no ponderados con media aritmética). Dicho análisis fue realizado en MATLAB R2018a (MathWorks, Natick, MA, EE. UU.).

6.5 Diseños Experimentales

Se realizaron tres diseños experimentales, con el objetivo de caracterizar y establecer las mejores condiciones que permitan realizar un análisis de expresión diferencial de las cepas seleccionadas con el análisis de componentes principales.

Los dos primeros diseños experimentales fueron realizados en el sistema de micro fermentación y se muestran en la Tabla 5. Para el primer diseño experimental (2³), se usaron las dos cepas con mejores producciones seleccionadas mediante el PCA de compuestos aromáticos, se evaluaron dos medios de cultivo (M12 y jugo de agave) y dos velocidades de agitación (100 y

250 rpm). Se tuvieron dos factores con dos niveles independientes para cada factor, y para cada cepa. Se realizaron 8 fermentaciones, y con el fin de verificar replicabilidad cada fermentación se realizó por duplicado, dando un total de 16 fermentaciones a 30 °C para el primer diseño experimental. Posteriormente, se seleccionó la variable con mayor impacto en la síntesis de ésteres (la velocidad de 250 rpm), y se realizó un segundo diseño experimental (2x2x3), utilizando ambos medios de cultivo y cepas, así como tres diferentes temperaturas (20, 25, 30°C), esto con la finalidad de poder mejorar la producción de ésteres, así como encontrar condiciones con un alto margen de diferencia para poder establecer las bases para realizar un análisis de expresión diferencial. El segundo diseño consistió en 12 fermentaciones, y de igual manera con el fin de verificar replicabilidad se realizaron por duplicado, teniendo un total de 24 fermentaciones a 250 rpm.

Tabla 5 Diseños experimentales realizados en el sistema de micro fermentación.

Factores y Niveles					
1er diseño 2³			2do diseño 2x2x3		
Cepa	Medio	Velocidad (rpm)	Cepa	Medio	Temperatura (°C)
ME4a	M12	100	ME4a	M12	20
		250			25
		250			30
	Jugo de Agave	100		Jugo de Agave	20
		250			25
		250			30
GRO3	M12	100	GRO3	M12	20
		250			25
		250			30
	Jugo de Agave	100		Jugo de Agave	20
		250			25
		250			30

Cada fermentación fue realizada por duplicado.

Para la segunda etapa, las fermentaciones fueron llevadas a cabo en el segundo sistema de fermentación (los mini-biorreactores Applikon® de 250 mL). En esta etapa, se realizó un tercer diseño experimental en el que se seleccionaron los niveles de las variables independientes de los primeros diseños experimentales, que tuvieron un mayor impacto en la síntesis de ésteres. Para todos los diseños experimentales las variables de respuesta fueron el consumo de carbohidratos, la producción de biomasa y la producción de compuestos aromáticos (ésteres y alcoholes superiores).

6.6 Métodos analíticos

La densidad celular de las muestras se cuantificó por medio de densidad óptica a 600nm, así como por peso seco, mientras que los azúcares reductores se evaluaron de acuerdo con la técnica establecida con el reactivo DNS (ácido dinitrosalicílico) (Miller, 1959).

Los compuestos volátiles producidos durante la fermentación se cuantificaron por cromatografía de gases (CG). Se usó un Hewlett Packard Head-space 7694E conectado a un cromatógrafo de gases de la serie HP 6890 equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna HP-INNOWAX (60 m×0,32 mm×0,25 μm). Se usó helio como acarreador del gas. El programa de temperatura del horno se ajustó a 45°C durante 7 min, luego se aumentó a 160°C a una velocidad de 10°C / min y finalmente se aumentó a 220°C a una velocidad de 20°C / min. La temperatura del detector FID fue de 250°C. Las temperaturas del horno vial, circuito cerrado y línea de transferencia fueron 80, 110 y 115°C, respectivamente. Los tiempos de calentamiento, la presurización y la extracción se ajustaron a 40, 0.2 y 0.2 min, respectivamente. El tiempo de equilibrio del vial y la agitación de la muestra fue de 5 y 1 min respectivamente (Arellano et al., 2012; Iñiguez-Muñoz et al., 2019).

Los carbohidratos se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se usó un HPLC AGILENT® con detector UV e IR. Acoplado a una columna Bio-Rad® 87H a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min, a 50°C, y una fase móvil de H₂SO₄ 5 mM durante 30 minutos de tiempo de análisis por muestra.

6.7 Análisis Estadístico

Para los diseños experimentales se realizaron análisis multivariantes de uno y varios factores, así mismo como análisis de pruebas de rango múltiple, haciendo uso del procedimiento de Diferencia Mínima de Fisher (LSD), para finalmente realizar un análisis de superficie de los diseños experimentales. Para cada modelo, se realizó un análisis de la normalidad de errores con un nivel de significancia de 0.05. Esta segunda parte estadística se realizó con ayuda del software *Statgraphics Centurion XVI.I*.

7 Resultados y Discusión

7.1 Cribado de Cepas

Los niveles de producción de los compuestos volátiles producidos después de 8 días de fermentación por las 21 cepas de *P. kluyveri* se presenta en la Tabla A 1 y Tabla A 2 (Ver Anexo Tablas). A partir de estos datos se realizó el análisis de los quince compuestos volátiles utilizando un Análisis de Componentes Principales (PCA) para ambos medios de cultivo (M12 y jugo de *A. tequilana*) (Ilustración 5).

En el PCA del medio M12, el 99,18% de la varianza total se explica con los dos primeros componentes principales (PC), PC1 (96,83%) y PC2 (2,34%) (Ilustración 5a). Los compuestos que más contribuyeron en PC1 fueron 1-propanol, etanol, butirato de etilo y acetato de isoamilo, mientras que los componentes que más contribuyeron en PC2 fueron lactato de etilo, dodecanoato de etilo y hexanoato de etilo. Del PCA del medio M12, se diferencian tres cepas de todo el grupo, GRO3, RJC y TZB. La cepa GRO3 se distingue como la cepa con mejor capacidad de síntesis de butirato de etilo y hexanoato de etilo. Por otra parte, en este mismo medio, la cepa RJC se identifica como la cepa con mayor producción de propionato de etilo y acetato de isoamilo y por último la cepa TZB se diferencia por su capacidad para sintetizar lactato de etilo y dodecanoato de etilo.

Para el PCA del jugo de agave, el 98.8% de explicación de la variabilidad se obtiene con dos primeros componentes principales, donde PC1 y PC2 representaron 97.63% y 1.17%, respectivamente (Ilustración 5b). Los compuestos con mayor aporte en PC1 fueron etanol, propionato de etilo y acetato de etilo, mientras que para PC2 los compuestos que más contribuyeron fueron hexanoato de etilo, lactato de etilo y dodecanoato de etilo. Del PCA del jugo de agave, destacan dos cepas GRO3 y ME4a. GRO3 se caracteriza por su alta producción de etanol y ésteres (lactato de etilo y dodecanoato de etilo). Y en el caso de ME4a, se distingue por su alta producción de ésteres (acetato de etilo, propionato de etilo y hexanoato de etilo).

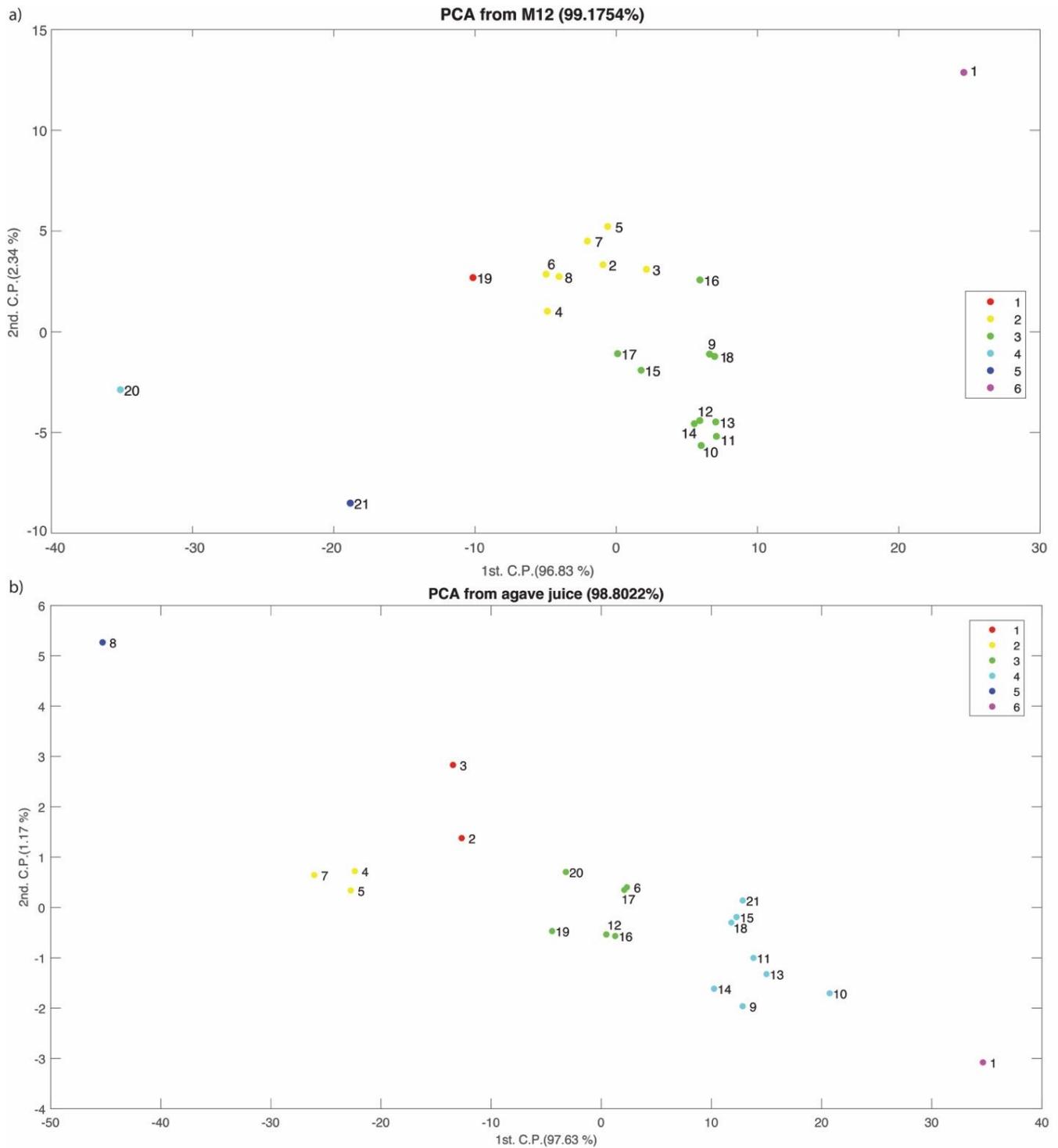


Ilustración 5 PCA de compuestos volátiles producidos correlacionados con cepas de levadura estudiadas. a) Medio M12 y b) Jugo de agave. Cada color representa un grupo con un alto grado de homogeneidad obtenido mediante UPGA.

Se realizó un análisis numérico UPGA de los PCA's, identificando seis grupos con diferentes grados de similitud para el medio M12 y el jugo de agave. Para el medio M12 (Ilustración 5a), se identificó una alta homogeneidad entre las diferentes cepas, en términos de un mismo proceso de fermentación, a excepción de las cepas 1 y 19 que se ubicaron fuera del grupo de su proceso. La alta homogeneidad con respecto al proceso de origen es consistente con la clasificación basada en los perfiles MALDI-TOF MS de estas cepas crecidas en YPD (De la Torre Gonzalez et al., 2018). En este medio, los grupos 1, 2, 3 y 6 constan de una sola cepa cada uno, cepa 20 (RJC), cepa 21 (TZB), cepa 19 (NK23) y cepa 1 (GRO3) que son cepas obtenidas de raicilla, tejuino, cacao y mezcal, respectivamente. Las cepas del proceso del mezcal se agruparon en un solo grupo, a excepción de la cepa 1, esta diferencia podría atribuirse a su alta producción de etanol, un origen geográfico diferente y período de aislamiento distinto. El grupo 3 está formado por la cepa 19, aislada de una fermentación de cacao en Tabasco, a diferencia de las cepas del grupo 5 (cepas 9 a 18) que también fueron aisladas de procesos de fermentación del cacao, pero de diferente origen geográfico (Chiapas). El grupo 4 consta de 7 cepas (cepa 2 a 8) aisladas de procesos del mezcal.

Por otro lado, para el jugo de agave (Ilustración 5b) se observaron diferencias en la correlación entre las cepas con respecto a la región y proceso de origen, a diferencia de lo observado con el medio M12 y a lo reportado por De la Torre Gonzalez *et al.* (2018) al utilizar YPD. Estas diferencias pueden deberse a que el jugo de agave es un medio más complejo que podría cambiar el metabolismo de estas cepas. En este medio se destacan las cepas 1 (GRO3) y 8 (ME4a) al agruparse solas en grupos distintos, 6 y 5 respectivamente. La cepa 1 (GRO3) y la cepa 8 (ME4a) fueron aisladas de Chilpancingo en Guerrero y Malinalco en el Estado de México, respectivamente. El grupo 1 consta de dos cepas (2 y 3) aisladas de Eduardo Neri en Guerrero, mientras que el grupo 2 consta de las cepas 4, 5 y 7, aisladas de Malinalco en el Estado de México. Los grupos 3 y 4 incluyen todas las cepas de Chiapas (9 a 18) más las cepas 20 y 21 aisladas del estado de Jalisco, la cepa 19 de Tabasco y la cepa 6 del Estado de México. La cepa 6 mostró una gran diferencias con respecto a la clasificación obtenida en el medio M12 y la reportada por De la Torre Gonzalez *et al.* (2018), ya que paso de agruparse con cepas aisladas del mezcal en el Estado de México a agruparse con cepas aisladas principalmente de la fermentación del cacao.

A partir del análisis de PCA, se distingue una amplia variedad metabólica entre cepas de la misma especie, determinando que no solo por ser del mismo género y especie, o lugar de origen,

las cepas deben tener el mismo comportamiento celular y metabólico, sino que puede haber excepciones entre el comportamiento de estas. Los ejemplos más claros fueron las cuatro cepas identificadas de *P. kluyveri* (GRO3, ME4a, RJC y TZB) que se distinguen por su alta capacidad de producir elevadas cantidades de compuestos volátiles. En ambos medios, GRO3 se clasificó como un solo grupo, ya que su perfil de compuestos volátiles difería de todas las cepas evaluadas. Además, dado que GRO3 y ME4a, mostraron un comportamiento sobresaliente en la producción de ésteres al utilizar jugo de agave, el cual es un medio comúnmente utilizado en la elaboración de varias bebidas alcohólicas a nivel industrial, estas dos cepas fueron seleccionadas para realizar los diseños experimentales para mejorar la producción de ésteres.

7.2 Sistema de micro fermentación

A continuación, se presentarán los dos primeros diseños experimentales mencionados previamente en la metodología, los cuales fueron llevados a cabo en el sistema de micro fermentación descrito previamente. El uso de este sistema de micro fermentación, nos permitió estandarizar el anejo de las cepas, así como reducir los volúmenes de medio requeridos para llevar a cabo todas las fermentaciones. Así como permitimos identificar los niveles de las variables de los diseños, que más influyen en la síntesis de ésteres, con el objetivo de reproducir esos resultados en el sistema de los mini bioreactores.

7.2.1 Diseño experimental 2³

7.2.1.1 Crecimiento celular

Las cepas, la agitación y los medios de cultivo fueron evaluados en el primer diseño experimental (2³). Las muestras se tomaron a las 0, 24, 48 y 120 h de fermentación. Los resultados mostraron que los mejores niveles de producción se obtuvieron a las 48 h de fermentación en las fermentaciones a 250 rpm. Además, en cuanto al crecimiento se observó un estado estacionario a 250 rpm después de este tiempo de fermentación. Igualmente, en algunos casos se consumió la totalidad del sustrato a este tiempo de fermentación (Ver Anexo Imágenes). Por lo tanto, se procedió a realizar el análisis de las producciones a las 48 h de fermentación.

En la mayoría de los reportes, la producción de ésteres en las fermentaciones alcohólicas esta reportado al final de la fermentación, con tiempos de fermentación desde tres días hasta varias semanas en algunos casos (Amaya-Delgado *et al.*, 2013; Beckner Whitener *et al.*, 2015; Kong *et*

al., 2019; Liu *et al.*, 2016; Lorenzini *et al.*, 2019). Esta diferencia podría atribuirse a que en estos estudios las fermentaciones alcohólicas se realizan sin agitación, únicamente Segura-García *et al.* (2015) realizaron sus fermentaciones a 100 rpm durante 72 h.

La Ilustración 6 muestra los niveles de crecimiento celular. Se observa el impacto de la velocidad de agitación, alcanzando aumentos en algunos casos de casi el doble de la biomasa en la velocidad de 250 rpm con respecto a las fermentaciones a 100 rpm. Debido al aumento de agitación del medio, se incrementa la oxigenación y homogeneidad del sistema, lo cual favorece el metabolismo oxidativo y por consecuencia el crecimiento celular (Gao *et al.*, 2015a; Rojas *et al.*, 2001).

Por otra parte, la influencia del medio es notable, teniendo un mayor crecimiento de biomasa en el medio mineral comparado con el jugo de agave. Este comportamiento podría deberse a un posible déficit nutricional (Arrizon *et al.*, 2007) y/o a la posible presencia de componentes inhibidores en el jugo de agave, como por ejemplo, furfurales (Segura-García *et al.*, 2015).

Para ambas cepas, no se observa una clara diferencia en cuanto a la generación de biomasa. El mayor crecimiento celular se obtuvo con la cepa GRO3 en medio M12 a 250rpm.

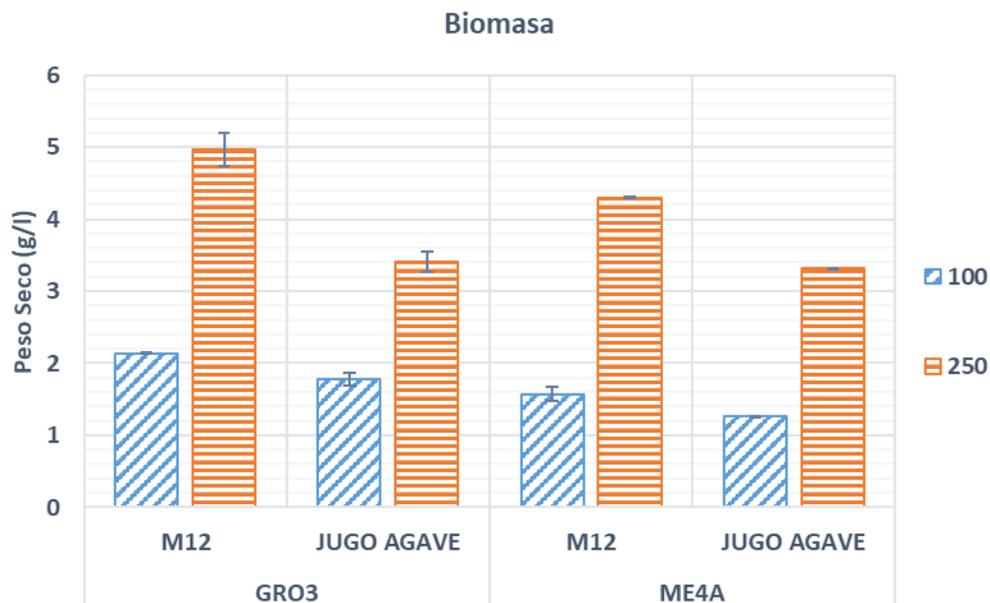


Ilustración 6 Niveles de crecimiento celular de ME4a y GRO3 en dos medios de cultivo a dos velocidades de agitación diferentes (100 y 250 rpm) después de 48 h de fermentación del diseño 2³.

7.2.1.2 Consumo de sustrato y rendimientos

La Ilustración 7 muestra los niveles de sustrato residual en el diseño experimental 2³. En ella se confirma lo observado en los niveles de crecimiento celular, con respecto a la velocidad de agitación, es decir, a mayor velocidad de agitación aumenta la biomasa y por lo tanto aumenta el consumo de sustrato. Destaca el caso de la cepa GRO3 a 250 rpm en jugo de agave, donde hubo un consumo total de sustrato. En los casos de GRO3 a 250 rpm en medio químicamente definido y ME4A a 250 rpm en jugo de agave, se consumió el total del sustrato a las 120h de fermentación. Por otra parte, las fermentaciones con una agitación de 100 rpm muestran los menores consumos de sustrato. Estos resultados resaltan la influencia de la velocidad de agitación en el consumo de azúcar, ya que a 250 rpm el azúcar residual fue la mitad de la concentración inicial para ME4a, y en el caso de GRO3, no había azúcar residual en el medio de jugo de agave.

Para ambas cepas y en ambos medios de cultivo, la velocidad de 250 rpm aumentó la producción de biomasa más del doble en comparación con 100 rpm. El mismo efecto se observó en la síntesis de etanol, con la excepción de GRO3 en medio M12, donde no se detectó efecto de la velocidad de agitación.

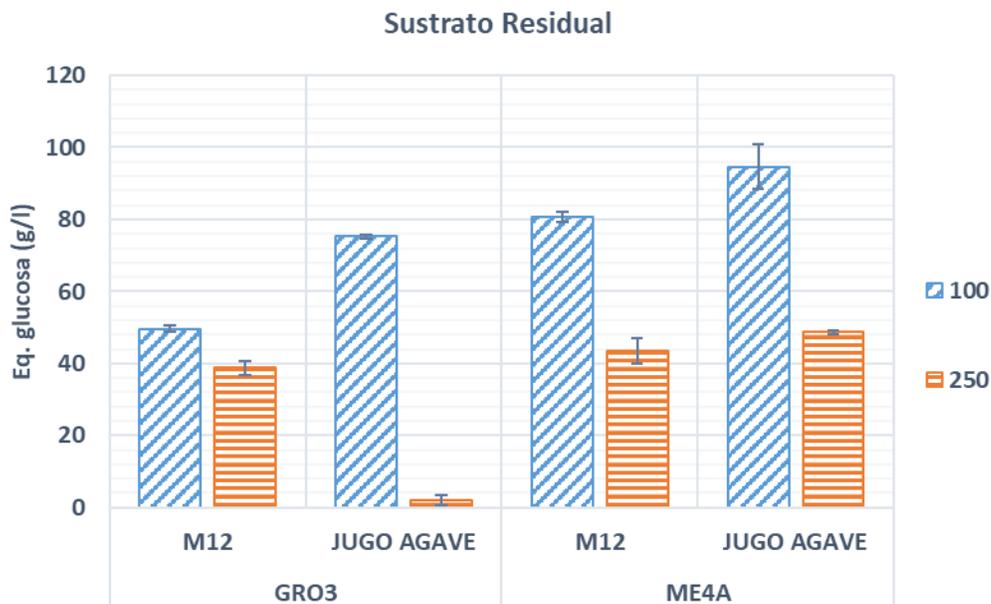


Ilustración 7 Sustrato residual de ME4a y GRO3 en dos medios de cultivo a dos velocidades de agitación diferentes (100 y 250 rpm) después de 48 h de fermentación del diseño 2³.

Para el análisis del consumo de sustrato y producción de biomasa, se presentan los coeficientes de rendimientos Y_{xs} (masa de biomasa producida por unidad de masa de sustrato consumido) a las 48 h de fermentación del diseño experimental 2³ en la Ilustración 8.

Observado los rendimientos para ambas cepas con respecto a los medios de cultivo, se observa que para el jugo de agave se tienen mayores rendimientos a una velocidad de 100 rpm, mientras que para el medio M12, los mayores rendimientos se tienen a una velocidad de 250 rpm con GRO3. Con estos resultados podríamos hipotetizar que debido a que el jugo de agave dificulta en mayor medida el crecimiento y que una baja velocidad también reduce el crecimiento, se genera un estrés celular, que dirige el metabolismo meramente al crecimiento celular.

La condición con mejores rendimientos de producción de biomasa Y_{xs} fueron la cepa ME4a a 100 rpm en jugo de agave. Esta velocidad de agitación fue con la que hubo un menor nivel de crecimiento y de consumo de sustrato, lo cual sugiere que estas condiciones dirigieron el metabolismo meramente al crecimiento celular.

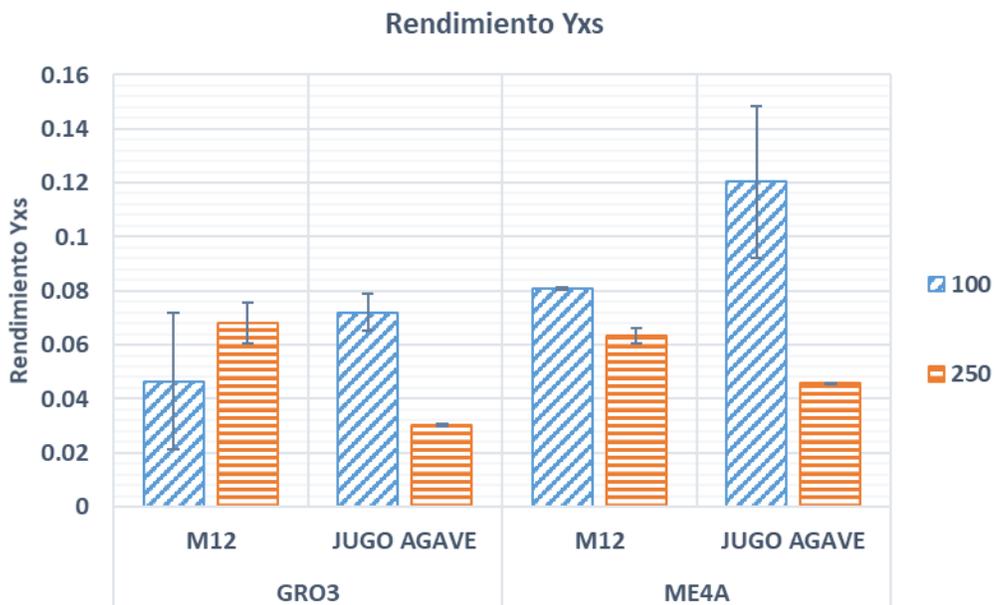


Ilustración 8 Coeficientes de rendimientos metabólicos Y_{xs} de ME4a y GRO3 en dos medios de cultivo a dos velocidades de agitación diferentes (100 y 250 rpm) después de 48 h de fermentación del diseño 2³.

Debido a que el objetivo del presente trabajo no es aumentar la producción de biomasa sino de metabolitos, específicamente ésteres, se presentan los resultados de los niveles de producción y rendimientos de algunos productos de las fermentaciones.

7.2.1.2 Producción de metabolitos

La Ilustración 9a muestra los niveles de producción de etanol del diseño experimental 2³. Para este caso, observamos la misma tendencia que con las previas variables de respuesta analizadas, obteniendo los mayores niveles de producción de etanol a una velocidad de agitación de 250 rpm. La mayor producción de etanol se obtuvo con la cepa GRO3 a 250 rpm en jugo de agave, alcanzando un máximo de 38.64 ± 0.39 g/L de etanol, niveles de producción de etanol similares a los reportados por Amaya-Delgado y col. (2013).

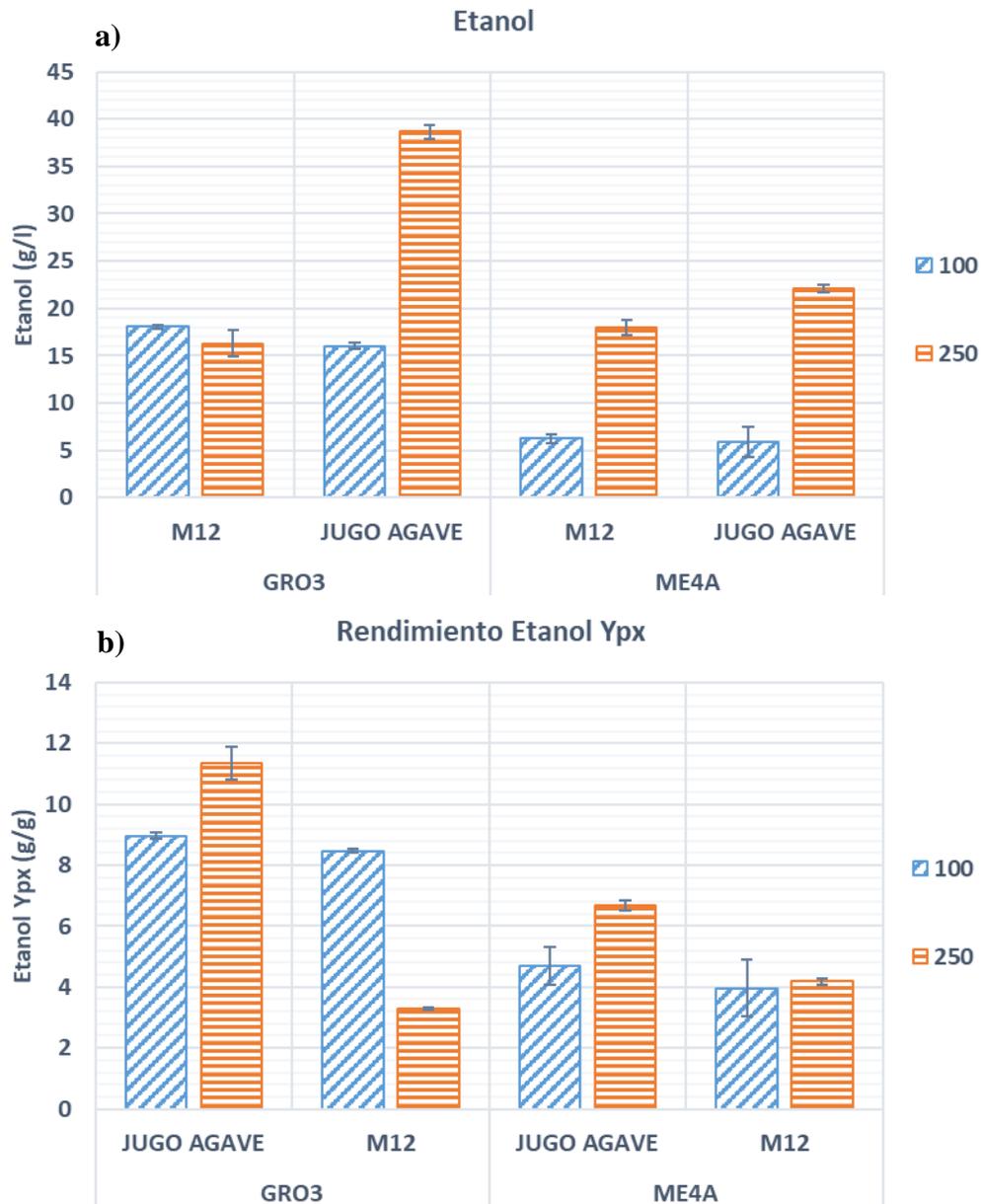


Ilustración 9 Producción de etanol de ME4a y GRO3 en dos medios de cultivo a dos velocidades de agitación diferentes (100 y 250 rpm) después de 48 h de fermentación del diseño 2³. a) Nivel de producción de etanol, b) Rendimientos específicos de producción de etanol respecto a la cantidad de biomasa.

Por otra parte, en la Ilustración 9b, se muestran los coeficientes de rendimientos de producción de etanol con respecto a biomasa (Y_{px}). Se observa que con el jugo de agave hay un incremento de más del 25% el rendimiento a la velocidad de 250 rpm con respecto a la velocidad de 100 rpm. Con el medio M12 las cepas tienen un comportamiento diferente entre ellas, ya que para ME4a no hay una influencia de la velocidad de agitación, pero para GRO3 si hay un incremento de más del doble a una velocidad de 100 rpm, esto probablemente debido a que a bajas velocidades se disminuye la micro aireación provocada por la agitación, lo que influye en la producción de etanol (Stanley et al., 2010).

Las diferencias entre rendimientos de biomasa y etanol, en las demás configuraciones del diseño, sugieren la producción de otros metabolitos, por lo que a continuación se presentan los niveles de producción de los principales alcoholes superiores y ésteres cuantificados en las cinéticas.

La Ilustración 10 muestra los niveles de producción de los principales ésteres cuantificados en el diseño 2³. En el caso de la producción de acetato de etilo, aumentó más del doble a 250 rpm en el jugo de agave, mientras que en el medio M12 se observaron concentraciones más altas a 100 rpm. Se identificaron los mayores niveles de producción de acetato de etilo con la cepa ME4a a una velocidad de agitación de 250 rpm en el jugo de agave.

Sin embargo, altas concentraciones de acetato de etilo ($\geq 150\text{mg/L}$), pueden llegar a ser perjudiciales en el caso de bebidas alcohólicas, adjudicándoles un aroma y sabor a solvente (Beckner Whitener *et al.*, 2015).

Tanto para el acetato de isoamilo, el butirato de etilo y el dodecanoato de etilo, los mayores niveles de producción se obtienen con la cepa ME4a a 250 rpm, para el acetato de isoamilo en el jugo de agave, para el butirato de etilo en el medio M12a, mientras que en el caso del dodecanoato de etilo no se observa una diferencia entre ambos medios de cultivo. Además, se destaca la nula producción de acetato de isoamilo a 100 rpm en M12. En el caso del dodecanoato de etilo hay un aumento de más del doble con una velocidad de agitación de 250 rpm, observándose producción solo a esta velocidad en el jugo de agave.

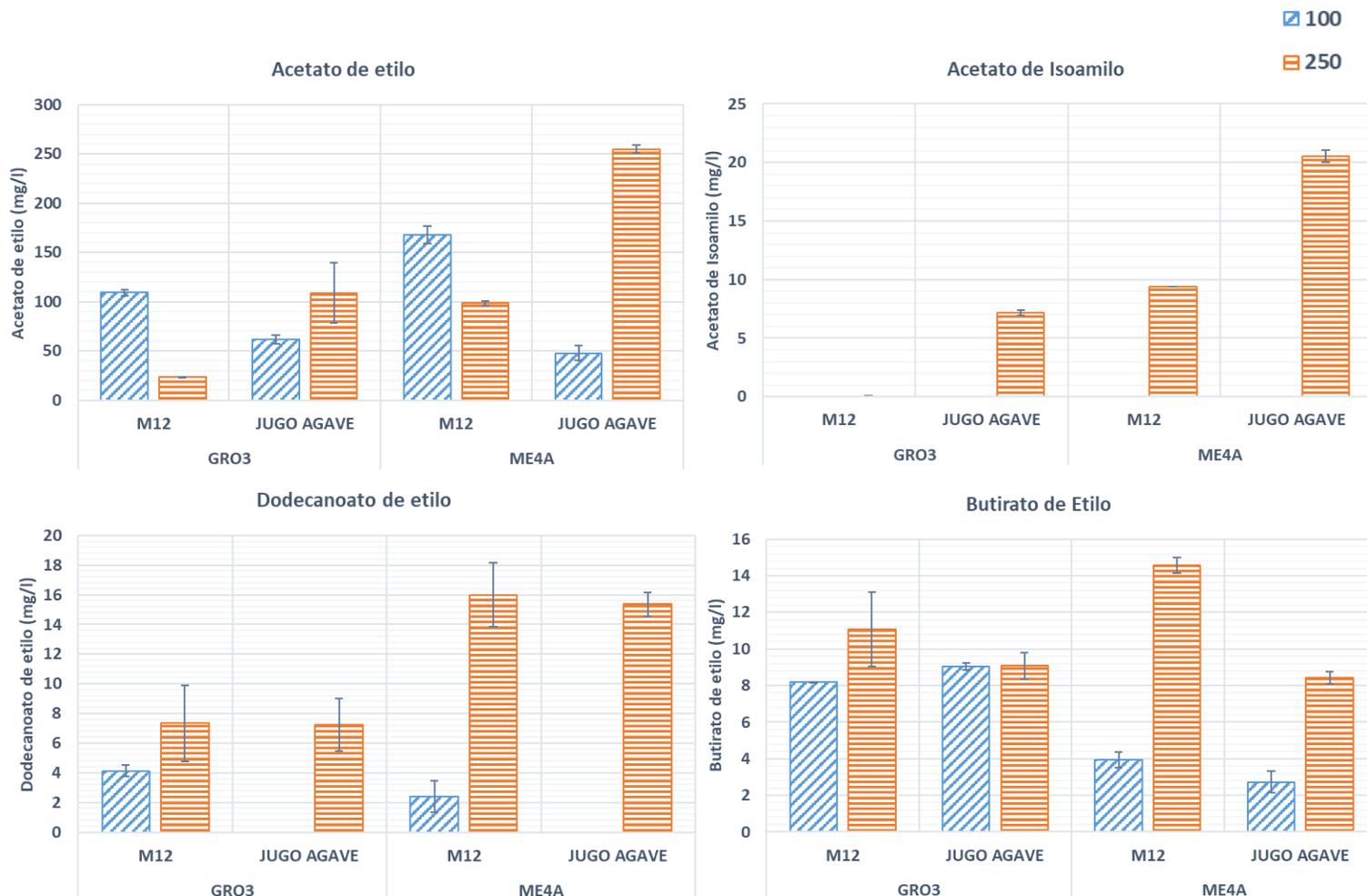


Ilustración 10 Niveles de producción de ésteres por ME4a y GRO3 en dos medios de cultivo a dos velocidades de agitación diferentes (100 y 250 rpm) después de 48 h de fermentación del diseño 2³.

Se obtuvo un comportamiento similar con los alcoholes superiores (Ilustración 11), isobutanol y alcohol isoamílico, mostraron los máximos de producción a 250 rpm. Ambas cepas mostraron un incremento de más de un 75% en el jugo de agave. Por otra parte, el máximo de alcohol isoamílico (sustrato de acetato de isoamilo), coincide con el máximo de acetato de isoamilo para la cepa ME4a. En ambos casos la cepa ME4a alcanza los mayores niveles de producción.

El acetaldehído que es intermediario de la síntesis de etanol (Ver Ilustración 1), muestra su máximo con la cepa ME4a a 250 rpm en el jugo de agave, alcanzando casi 2.5 veces más de producción que su segundo más cercano (Ilustración 11). Esta máxima producción de acetaldehído, sugiere una síntesis deficiente de etanol. Por lo que para mejorar este paso y aumentar la síntesis

de etanol en futuros trabajos podría adicionarse una fuente de magnesio y hierro, debido a que las enzimas involucradas en este paso dependen de estos iones (Gschaedler *et al.*, 2015).

En el caso del isobutanol se observa que en el medio M12 hay un ligero aumento de su producción a 250 rpm con ambas cepas, mientras que en el jugo de agave el efecto de la velocidad es distinto en cada cepa. La cepa GRO3 muestra un incremento con el aumento de velocidad a 250 rpm, mientras que con la cepa ME4a disminuye su producción cuando se incrementa la velocidad.

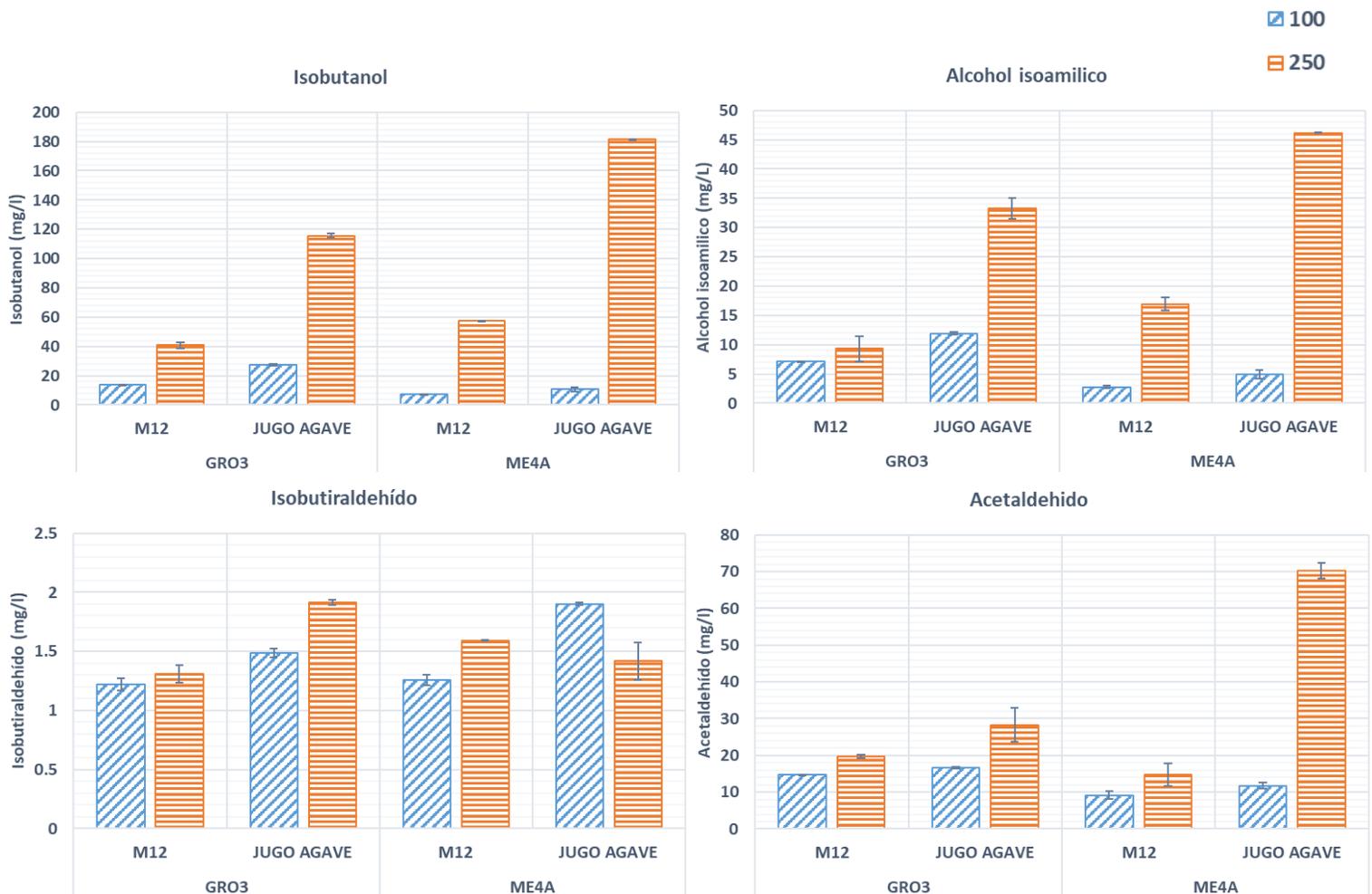


Ilustración 11 Niveles de producción de alcoholes superiores y acetaldehídos por ME4a y GRO3 en dos medios de cultivo a dos velocidades de agitación diferentes (100 y 250 rpm) después de 48 h de fermentación del diseño 2³.

7.2.1.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico del primer diseño experimental se llevó a cabo haciendo uso del software *Statgraphics Centurion XVII*, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de uno y varios factores, así como un análisis de prueba múltiple de rangos mediante el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher y por último un análisis de superficie de respuesta para las variables de respuesta. Se analizó la normalidad de los errores con un nivel de significancia de 0.05.

La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestra los rendimientos específicos (Y_{px}) de algunos compuestos volátiles cuantificados en el diseño 2^3 a las 48 h de fermentación. El superíndice indica grupos con diferencias significativas para cada compuesto con un valor de $p < 0,05$. Los datos son medias \pm desviación estándar de réplicas independientes. La mayor parte de la producción de alcoholes y ésteres presentó un aumento considerable en el jugo de agave a 250 rpm. Solo la producción de acetaldehído y acetato de etilo con GRO3 fue ligeramente superior a 100 rpm en jugo de agave sin mostrar una diferencia estadísticamente significativa entre ambas velocidades. En este medio, el acetato de isoamilo y el dodecanoato de etilo solo se detectaron al aumentar la velocidad de agitación. Con respecto al medio M12, a 100 rpm se observó una mayor producción de acetaldehído y acetato de etilo con ambas cepas y se detectó una mayor producción de etanol y dodecanoato de etilo con GRO3.

Tabla 6 Rendimientos específicos (Y_{px}) de GRO3 y ME4a en diferentes condiciones de fermentación a 30 ° C después de 48 h de fermentación del diseño 2³.

Rendimientos Específicos (Y_{px})							
Alcoholes							
Medios	Velocidad	Etanol (g/g)		Acetaldehído (mg/g)		Isobutanol (mg/g)	
		GRO3	ME4a	GRO3	ME4a	GRO3	ME4a
Jugo	100 rpm	8.97±0.92 ^c	4.71±0.07 ^a	9.34±0.45 ^c	9.41±0.90 ^c	15.48±0.4 ^c	8.53±0.15 ^b
Agave	250 rpm	11.34±0.1 ^d	6.66±0.05 ^b	8.32±0.63 ^c	21.14±0.5 ^d	33.96±0.0 ^d	54.67±1.9 ^e
M12	100 rpm	8.47±0.62 ^c	3.97±0.12 ^a	6.86±0.20 ^b	5.84±0.07 ^b	6.37±0.33 ^b	4.52±0.12 ^a
	250 rpm	3.28±0.16 ^a	4.18±0.55 ^a	3.96±0.63 ^a	3.41±0.06 ^a	8.23±0.06 ^b	13.35±0.20 ^c
Ésteres							
Medios	Velocidad	Acetato de Etilo (mg/g)		Acetato de isoamilo (mg/g)		Etil dodecanoate (mg/g)	
		GRO3	ME4a	GRO3	ME4a	GRO3	ME4a
Jugo	100 rpm	34.53±4.42 ^c	37.99±0.84 ^c	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Agave	250 rpm	31.96±1.13 ^c	77.1±12.5 ^e	2.11±0.2 ^b	6.19±0.2 ^c	2.13±0.24 ^c	4.62±0.33 ^d
M12	100 rpm	51.21±6.59 ^d	106.99±2.5 ^f	0 ^a	0 ^a	1.95±0.60 ^b	1.52±0.26 ^b
	250 rpm	4.70±0.47 ^a	22.92±1.3 ^b	0 ^a	2.19±0.14 ^b	1.48±0.44 ^b	3.74±0.79 ^d

Con estos resultados se procedió a realizar un análisis de superficie de respuesta de los cuatro ésteres con mayor presencia en las fermentaciones del primer diseño experimental (Ilustración 12).

En la Ilustración 12, se muestran las diferentes superficies de respuesta obtenidas para los ésteres producidos por cada una de las cepas de *P. kluyveri*. En cada respuesta estimada por la cepa GRO3, se observa un menor efecto de las variables independientes con respecto a los niveles de producción de los distintos ésteres cuantificados ya que no muestran variabilidad con respecto al medio de cultivo y la velocidad de agitación.

Por otra parte, la cepa ME4a muestra una mayor influencia en los niveles de producción de ésteres con respecto a la velocidad de agitación y tipo de medio de cultivo. En el caso del jugo de agave, se observa una mejor producción de acetato de etilo y acetato de isoamilo, mientras que para el medio M12 se observa que hay una mejor producción del butirato de etilo. Específicamente en el caso del dodecanoato de etilo, no se observan diferencias significativas con respecto a los medios de cultivo.

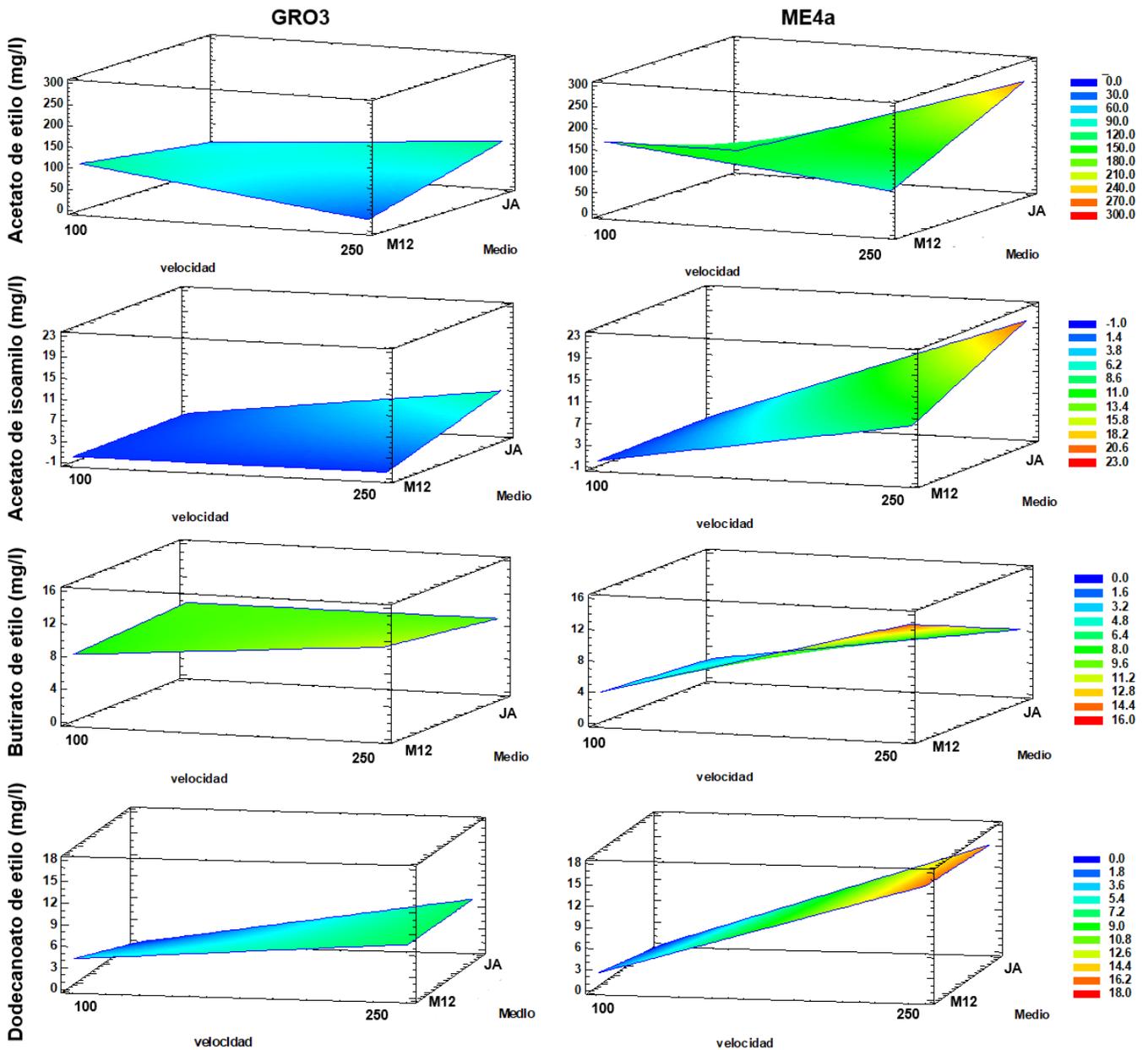


Ilustración 12 Superficies de respuesta estimada de la síntesis de ésteres a las 48h del diseño experimental 2^3 . Eje “x” velocidad de agitación (100rpm y 250rpm), el eje “z” es el medio de cultivo (M12=químicamente definido y JA=jugo de agave), el eje “y” es el nivel de concentración de cada éster.

El aumento de producción de ésteres en el jugo de agave puede deberse a condiciones estresantes, ya que se ha reportado que diversas condiciones de estrés, pueden promover la síntesis de ésteres (Beltran *et al.*, 2008; Christiaens *et al.*, 2014; Molina-Guerrero *et al.*, 2007), y en el caso del jugo de agave hay presencia de furfurales (Segura-García *et al.*, 2015), los cuales podrían influir en dicho estrés.

El papel del metabolismo del oxígeno en la síntesis de ésteres sigue siendo controvertido, algunos autores han encontrado que las condiciones aeróbicas favorecen la síntesis de algunos ésteres (Gao *et al.*, 2015b; Rojas *et al.*, 2001), mientras que otros han descrito que las condiciones semianaeróbicas maximizan la expresión de genes involucrados en la síntesis de ésteres (Verstrepen *et al.*, 2003c). Sin embargo, algunos otros han informado que la formación de ésteres etílicos y acetatos es inhibida por el oxígeno, en cepas de *S. cerevisiae* (Saerens *et al.*, 2010; Sumbly *et al.*, 2010). En las superficies de respuesta, se observó un aumento considerable en la producción de éster al aumentar la velocidad de agitación, los ejemplos más claros son las concentraciones de acetato de etilo, acetato de isoamilo y dodecanoato de etilo. Este comportamiento concuerda con reportes anteriores, donde la producción de ésteres en *K. marxianus* se ve favorecida en condiciones de micro aireación, las cuales son promovidas por la velocidad de agitación (Gao *et al.*, 2015b; Rojas *et al.*, 2001).

En algunas cepas de *S. cerevisiae*, se ha informado que las condiciones aeróbicas pueden estimular la fermentación alcohólica, al promover el crecimiento celular, la viabilidad y la actividad fermentativa a través de la biosíntesis de esteroides y ácidos grasos insaturados (UFA) (Blateyron *et al.*, 2001; Fornairon-Bonnefond *et al.*, 2003). Este metabolismo oxidativo da como resultado una mayor formación de los principales metabolitos producidos durante la fermentación (Contreras *et al.*, 2015; Morales *et al.*, 2015). Por ejemplo, Canonico *et al.* (2019) reportaron una mayor producción de compuestos volátiles en fermentaciones de vino aireadas y secuenciales usando levaduras no-*Saccharomyces* con *S. cerevisiae*, especificando que el efecto de la aireación en los perfiles aromáticos depende de la cepa de levadura. Asimismo, Shekhawat *et al.* (2017) reportaron un aumento en la viabilidad de levaduras no-*Saccharomyces* en cultivos mixtos con *S. cerevisiae*, cuando se airearon las fermentaciones del vino. Por lo cual, se seleccionó la velocidad de 250 rpm como parámetro, para el siguiente diseño experimental.

7.2.2 Diseño experimental 2x2x3

El objetivo del segundo diseño experimental fue evaluar la influencia de la temperatura en la fermentación, ya que el papel de la temperatura en la síntesis de ésteres aún no está claro. Los factores para el segundo diseño experimental (2x2x3) fueron: cepas, medios de cultivo y tres temperaturas de fermentación. Al igual que en el primer diseño experimental, las muestras se tomaron a las 0, 24, 48 y 120 h. Del mismo modo que en el primer diseño experimental, en algunas configuraciones del segundo diseño se alcanzó a consumir la totalidad del sustrato en 48h, y en este tiempo se observó el máximo de algunos de los compuestos volátiles cuantificados (Ver anexo Imágenes), por lo que se procederá a mostrar los resultados de este diseño también a las 48 h de fermentación.

7.2.2.1 Crecimiento celular

En la Ilustración 13, se muestran los niveles de crecimiento celular del segundo diseño experimental 2x2x3. Se observa que los mayores crecimientos de ambas cepas se obtuvieron en el medio M12 en las 3 temperaturas. En promedio, la biomasa fue 38,9% y 29,4% mayor en el medio M12 que en el jugo de agave para GRO3 y ME4a respectivamente.

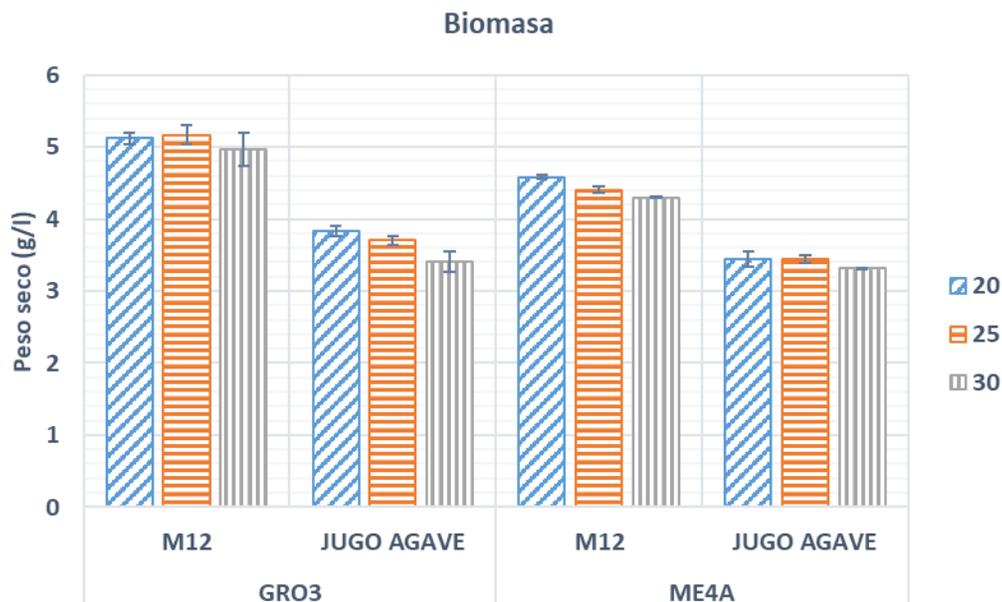


Ilustración 13 Niveles de crecimiento celular de ME4a y GRO3 en dos medios de cultivo a tres diferentes temperaturas (20, 25 y 30°C) después de 48 h de fermentación del diseño 2x2x3.

La mayor producción de biomasa fue de 5.37 ± 0.09 g/L para GRO3 a 20°C y 25°C, mientras que para ME4a, se obtuvieron 4.58 ± 0.09 g/L a 20°C. Además, se observa una ligera tendencia de incremento en la producción de biomasa conforme disminuye la temperatura en ambos medios de cultivo y con ambas cepas.

7.2.2.2 Consumo de sustrato

La Ilustración 14 muestra los niveles de consumo de sustrato del diseño experimental 2x2x3. El punto de mayor interés, son los consumos de GRO3 en el jugo de agave a 30 y 25°C, debido que son las únicas condiciones a las que se consume la totalidad de la fuente carbón del medio a las 48 h, y no corresponden a las condiciones con el mayor crecimiento celular, lo cual sugiere una desviación del metabolismo hacia alguna otra ruta metabólica. De igual manera, solo ME4a en jugo de agave a 30 y 25°C, y GRO3 en jugo de agave a 20°C y en medio M12 a 30°C, consumen la totalidad de la fuente de carbono a las 120 h. Todas las demás condiciones de cultivo presentaron sustrato residual.

En general, se observó un menor consumo de sustrato cuando la temperatura en el jugo de agave disminuyó para ambas cepas, mientras que para el medio M12 se observó un ligero aumento en el consumo al disminuir la temperatura.

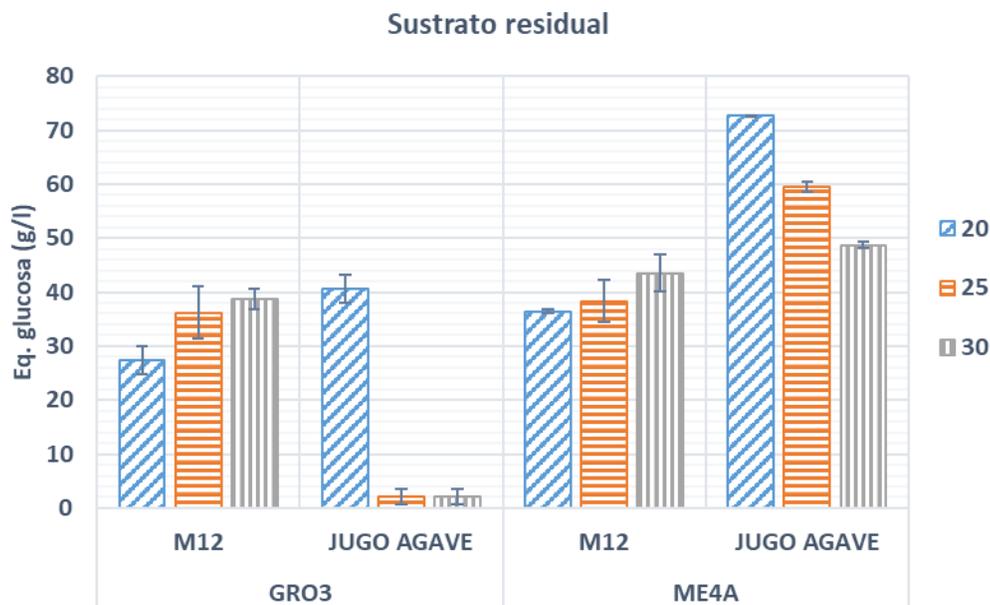


Ilustración 14 Niveles de sustrato residual de ME4a y GRO3 en dos medios de cultivo a tres diferentes temperaturas (20, 25 y 30°C) después de 48 h de fermentación del diseño 2x2x3.

La relación de los niveles de crecimiento y consumo de sustrato se observa en la Ilustración 15, la cual muestra los rendimientos de producción de biomasa por unidad de masa de sustrato consumida (Y_{xs}) del diseño experimental $2 \times 2 \times 3$. Se observa una leve tendencia para ambas cepas y medios debido a que a medida que incrementa la temperatura disminuye el rendimiento de producción de biomasa. Distinguiéndose los mayores rendimientos para la cepa ME4a en jugo de agave a 20°C . En el medio M12 para ambas cepas no se alcanza a percibir una influencia de la temperatura en los rendimientos.

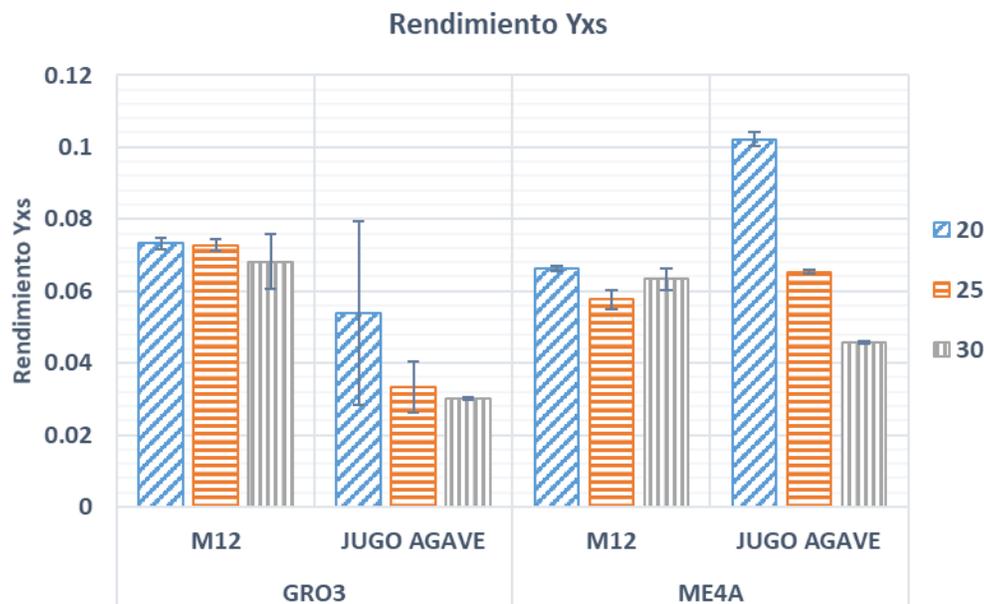


Ilustración 15 Rendimientos específicos de producción de biomasa por unidad de masa de sustrato (Y_{xs}), de ME4a y GRO3 en dos medios de cultivo a tres diferentes temperaturas (20°C , 25°C y 30°C) después de 48 h de fermentación del diseño $2 \times 2 \times 3$.

7.2.2.3 Producción de metabolitos

La Ilustración 16a muestra la producción de etanol, observando que los mayores niveles de producción se obtuvieron con la cepa GRO3 en jugo de agave a 30°C , esta producción es casi un cuarto más que la obtenida con la misma cepa y medio, pero a 25°C . Estos puntos concuerdan con la cinética del consumo de sustrato, en las que se identificó que se había consumido la totalidad del sustrato. Enfocando el análisis en estos casos donde la única variable es la temperatura, se observa una clara diferencia en la producción de etanol, pero no en el consumo de sustrato, por lo que podríamos suponer que la temperatura puede dirigir el metabolismo a la producción de ciertos

compuestos volátiles. Para GRO3 y ME4a, la mayor producción de etanol se observó en el medio de jugo de agave a 30°C, 38.64±0.39 g/L y 22,12±0.78 g/L, respectivamente.

La producción de etanol por GRO3 fue superior a la obtenida con *S. cerevisiae*, y algunas otras levaduras no-*Saccharomyces* como *Kazachstania gamospora*, *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Lachancea thermotolerans* en la fermentación de Sauvignon Blanc y mosto Syrah, en el mismo tiempo de fermentación (Beckner Whitener *et al.*, 2015). Asimismo, esta concentración fue superior a la obtenida con *Hanseniaspora jacobsenii* y *Candida ethanolica* en monocultivo y co-cultivo de jugo de mango y en la producción de vino de arándano por *S. cerevisiae* al mismo tiempo de fermentación, respectivamente (Coulibaly *et al.*, 2020). También, esta concentración es 2.4 veces más elevada que la máxima producción obtenida por *S. cerevisiae* en fermentación continua en jugo de agave (Iñiguez-Muñoz *et al.*, 2019), y solo 14% menor que la obtenida por Amaya-Delgado *et al.* (2013), con la misma cepa GRO3 en jugo de agave pero en una fermentación en un biorreactor nivel industrial.

La producción específica de etanol se presenta la Ilustración 16b. Se puede observar un mayor rendimiento en el jugo de agave para ambas cepas, y una ligera tendencia de aumento con respecto al incremento en la temperatura. Por otra parte, para el medio M12 no se distingue ningún patrón con respecto a la temperatura con ambas cepas.

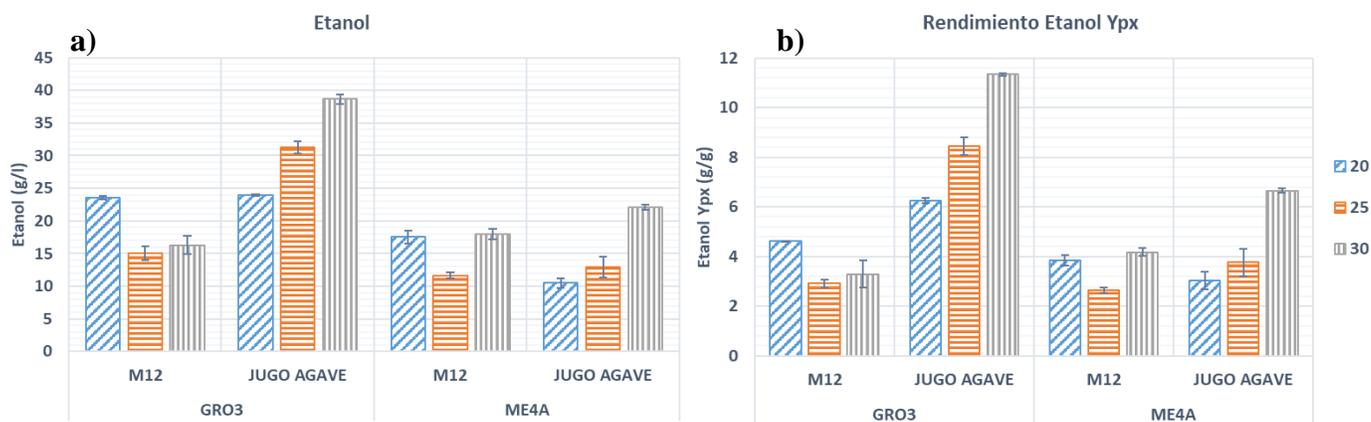


Ilustración 16 Producción de etanol de ME4a y GRO3 en dos medios de cultivo a tres diferentes temperaturas (20, 25 y 30°C) después de 48 h de fermentación del diseño 2x2x3. a) Nivel de producción de etanol, b) Rendimientos específicos de producción de etanol respecto a la cantidad de biomasa.

En producción y rendimiento de etanol se observa un comportamiento similar en todos los casos del diseño experimental, con lo que podríamos suponer que la producción de etanol es directamente proporcional al rendimiento específico de etanol con respecto a la cantidad de biomasa.

Los niveles de producción de los ésteres con mayores niveles detectados en el diseño experimental 2x2x3 se presentan en la Ilustración 17. Observando la producción de cada uno de los ésteres, es complicado determinar cuál es el efecto de la temperatura en la síntesis de cada uno, por lo que primeramente se identificaron los puntos máximos de producción para cada compuesto.

El acetato de etilo tiene su máximo nivel de producción con la cepa GRO3 a 20°C en jugo de agave. Por otra parte, el acetato de isoamilo, tiene su máximo nivel de producción con la cepa ME4a a 30°C en jugo de agave, alcanzando niveles de más del 25% que los obtenidos con las demás temperaturas en estas mismas condiciones (cepa y medio).

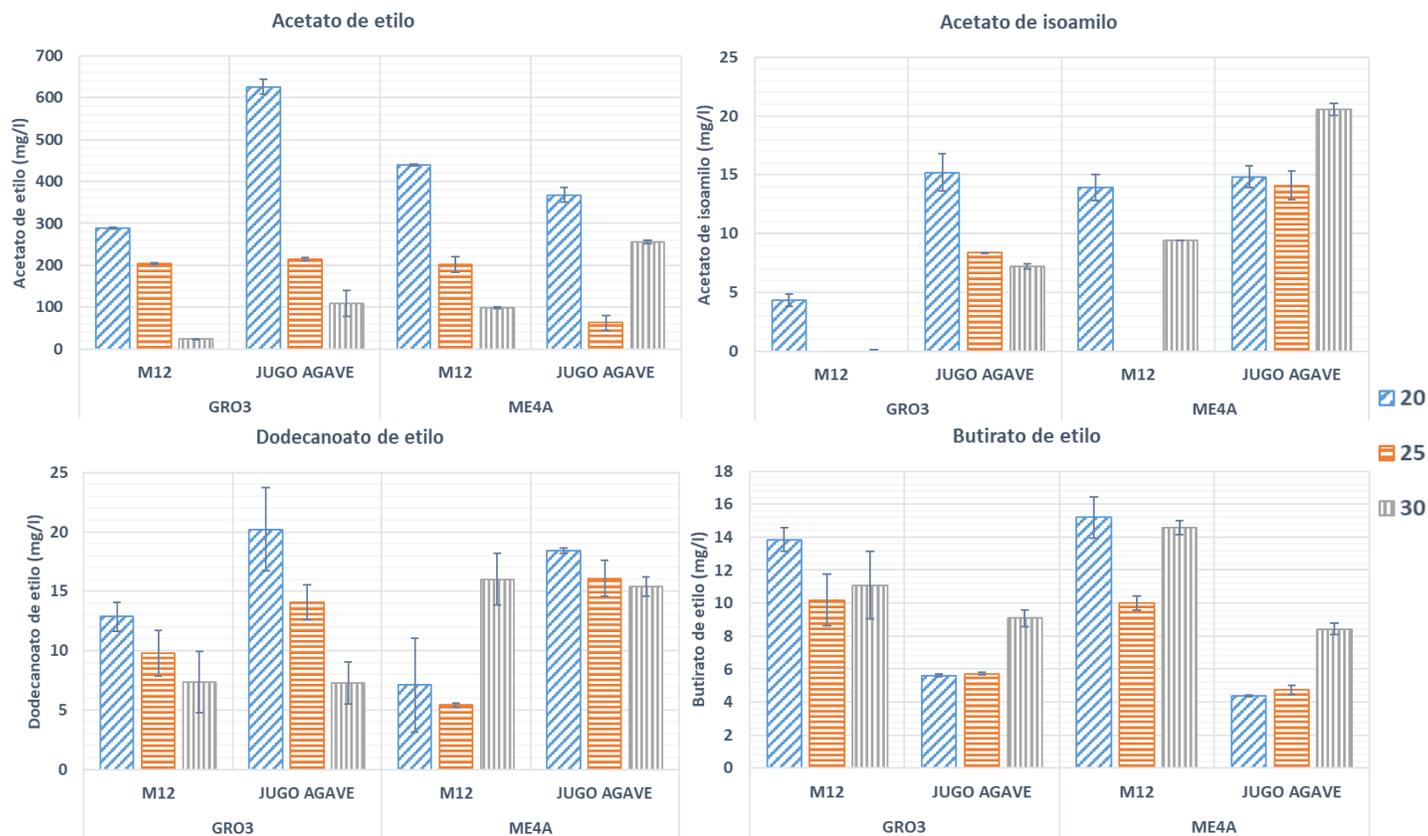


Ilustración 17 Niveles de producción de ésteres por ME4a y GRO3 en dos medios de cultivo a tres diferentes temperaturas (20, 25 y 30°C) después de 48 h de fermentación del diseño 2x2x3.

El único etil éster de ácido graso que se detectó, fue el dodecanoato de etilo, el cual, no alcanza un máximo a lo largo de la cinética, sino que se observa una tendencia a incrementar su producción con la cepa ME4a en jugo de agave a 25°C hasta las 120h, sin embargo, solo a esta temperatura muestra esta tendencia y para las demás temperaturas se alcanza el máximo de producción a las 48 horas de fermentación.

El último éster que se detectó en altas concentraciones fue el butirato de etilo, el cual es el único que incrementa su producción en el medio M12 para ambas cepas. Para este éster se alcanzó su máximo nivel a las 48 horas con ambas cepas a 30°C y 20°C para ME4a y solo a 20°C para GRO3.

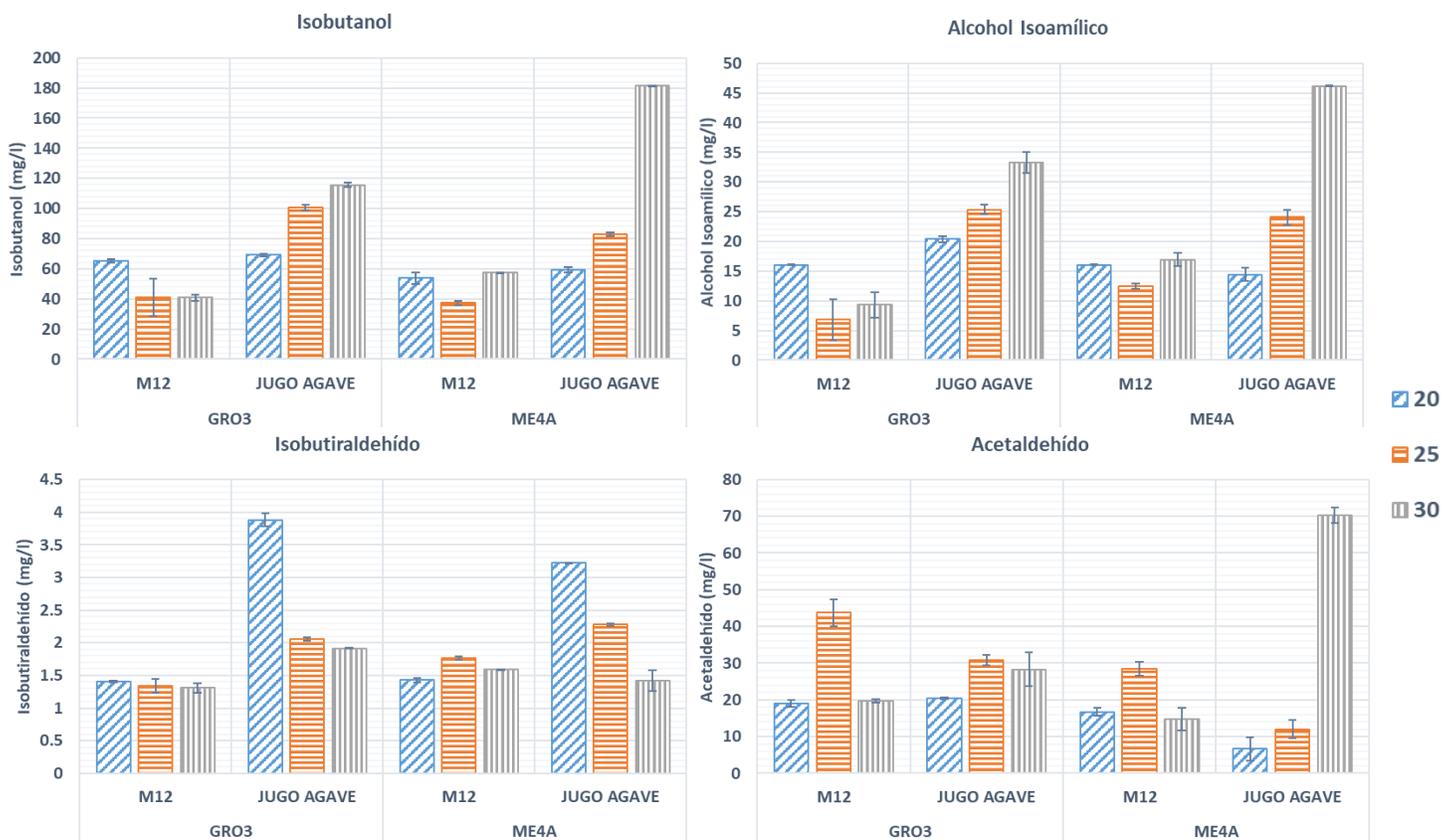


Ilustración 18 Niveles de producción de alcoholes superiores y acetaldehídos por ME4a y GRO3 en dos medios de cultivo a tres diferentes temperaturas (20, 25 y 30°C) después de 48 h de fermentación del diseño 2x2x3.

Con respecto a los alcoholes superiores y acetaldehídos (Ilustración 18), tanto el alcohol isoamílico y como el isobutanol, muestran sus mayores niveles de producción con la cepa ME4a a 30°C en el jugo de agave.

Se observa un crecimiento lineal de producción de ambos alcoholes con respecto al aumento de temperatura en ambas cepas, mientras que en el medio M12 no se distingue el posible efecto de la temperatura.

En el caso del acetaldehído, se tiene la máxima concentración con la cepa ME4a en jugo de agave a 30°C, alcanzando una concentración de 70.23 ± 3.2 mg/l, este punto coincide con el la producción máxima obtenida en el primer diseño experimental, reafirmando que se requieren adicionar nutrientes como fierro y magnesio como estrategia para aumentar la síntesis de etanol con ME4a.

Por último, el isobutiraldehído, un metabolito río abajo en la síntesis de isobutanol, solo en las fermentaciones en jugo de agave se detectan cambios en su concentración, siendo a 20°C donde se obtienen las mayores concentraciones para ambas cepas.

Posteriormente se realizó un análisis de superficie para identificar el tipo de efecto que tiene la temperatura en la producción de los diferentes ésteres.

7.2.2.4 Análisis estadístico del segundo diseño experimental.

Para el análisis estadístico de los resultados del segundo diseño experimental se realizaron los análisis de varianza, normalidad y superficie como se menciona en la sección de Métodos. Se presenta el análisis de los datos a las 48h de fermentación del segundo diseño experimental (2x2x3). Los rendimientos específicos (Y_{px}) de los volátiles con mayor presencia de las cepas de *P. kluyveri* en el segundo diseño 2x2x3 se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7 Rendimientos específicos (Y_{px}) de GRO3 y ME4a a diferentes temperaturas a 250 rpm después de 48h de fermentación del diseño 2x2x3.

		Rendimiento específico (Y_{px})					
		Alcoholes					
		Etanol (g/g)		Acetaldehído (mg/g)		Isobutanol (mg/g)	
		GRO3	ME4a	GRO3	ME4a	GRO3	ME4a
Jugo Agave	20°C	6.27±0.4 ^f	3.05±0.1 ^{a,b}	5.33±1.0 ^c	1.92±0.1 ^a	18.05±1.0 ^c	17.19±0.1 ^c
	25°C	8.45±0.6 ^g	3.76±0.4 ^{c,d}	8.31±0.5 ^d	3.49±0.5 ^b	27.25±0.1 ^e	24.15±1.0 ^d
	30°C	11.34±0.1 ^h	6.66±0.1 ^f	8.32±0.6 ^d	21.14±0.4 ^e	33.96±0.0 ^f	54.67±1.9 ^g
M12	20°C	4.61±0.2 ^e	3.83±0.0 ^{c,d}	3.73±0.2 ^b	3.66±0.3 ^b	12.75±0.8 ^b	11.75±0.0 ^b
	25°C	2.92±0.1 ^{a,b}	2.64±0.2 ^a	8.47±0.3 ^d	6.43±0.6 ^c	7.94±0.3 ^a	8.4±2.6 ^a
	30°C	3.28±0.2 ^{b,c}	4.18±0.6 ^{d,e}	3.96±0.6 ^b	3.41±0.1 ^b	8.23±0.1 ^a	13.35±0.2 ^b
		Ésteres					
		Acetato de etilo (mg/g)		Acetato de isoamilo (mg/g)		Etil dodecanoato (mg/g)	
		GRO3	ME4a	GRO3	ME4a	GRO3	ME4a
Jugo Agave	20°C	163.5±0.3 ⁱ	106.77±2.7 ^h	3.97±0.3 ^e	4.31±0.6 ^e	5.28±0.2 ^d	5.34±0.9 ^d
	25°C	57.7±3.8 ^e	18.11±0.9 ^b	2.26±0.4 ^c	4.09±0.1 ^e	3.8±0.5 ^c	4.68±0.5 ^{c,d}
	30°C	31.96±1.1 ^c	77.05±12.5 ^f	2.11±0.2 ^c	6.19±0.2 ^f	2.13±0.2 ^{a,b}	4.62±0.3 ^{c,d}
M12	20°C	56.24±0.2 ^e	96.06±1.3 ^g	0.85±0.2 ^b	3.04±0.1 ^d	2.51±0.8 ^b	1.55±0.2 ^{a,b}
	25°C	39.54±3.8 ^{c,d}	45.74±1.0 ^d	0 ^a	0 ^a	1.9±0.0 ^{a,b}	1.219±0.4 ^a
	30°C	4.70±0.5 ^a	22.92±1.3 ^b	0 ^a	2.19±0.1 ^c	1.48±0.4 ^{a,b}	3.74±0.8 ^c

El superíndice indica grupos con diferencias significativas para cada compuesto con un valor de $p < 0,05$. Los datos son medias \pm desviación estándar de réplicas independientes.

En general, ambas cepas aumentaron la producción de alcoholes a 30°C con el jugo de agave. Sin embargo, en este mismo medio, la producción de ésteres fue mayor a 20°C, siendo la producción de acetato de isoamilo con ME4a la única excepción.

Por otro lado, en el medio M12 los rendimientos de ésteres producidos por ME4a fueron superiores a los obtenidos por la cepa GRO3, encontrándose así diferencias significativas entre cepas de la misma especie en las mismas condiciones de fermentación.

Los mayores rendimientos en la producción de ésteres se obtuvieron en el jugo de agave. En todos los casos la biomasa aumentó con temperaturas más bajas por lo que debería haber un mayor consumo de sustrato a esta temperatura, lo que se confirmó en el medio M12, pero no en el jugo de agave.

Esto sugiere que el jugo de agave favorece un metabolismo secundario, lo cual se corrobora con los niveles de producción de los compuestos volátiles, por lo tanto, podríamos suponer que los inhibidores y componentes que no fueron caracterizados en el jugo de agave inducen el metabolismo secundario de estas cepas.

Por otro lado, los medios naturales y sintéticos se han evaluado en otros tipos de fermentaciones, encontrando que el uso de fuentes complejas de nitrógeno hace que la producción de aromas sea impredecible (Fairbairn *et al.*, 2017; Gschaedler *et al.*, 2015). Sin embargo, los cambios en las concentraciones relativas de ciertos aminoácidos pueden afectar directamente la formación de compuestos aromáticos, independientemente de la complejidad de las interacciones metabólicas entre el metabolismo del carbono y el nitrógeno (Fairbairn *et al.*, 2017).

Los mayores rendimientos de isobutanol, alcohol isoamílico y acetaldehído, coinciden con los máximos niveles de producción. Con lo cual, podemos suponer que el aumento del nivel de producción de determinados volátiles es directamente proporcional al rendimiento específico de producción de éste. Para comprender mejor los efectos de los medios de cultivo y la temperatura sobre la producción de ésteres, se llevó a cabo un análisis de superficie de respuesta. En la Ilustración 19 se muestran las superficies de respuesta estimadas de la producción de ésteres por las cepas de *P. kluyveri* GRO3 y ME4a, del diseño 2x2x3.

La influencia de la temperatura de fermentación para la cepa GRO3 muestra una tendencia lineal en ambos medios de cultivo. Es decir, la síntesis de ésteres aumenta significativamente con una tendencia lineal al disminuir la temperatura de fermentación. Esto concuerda con el efecto de la temperatura sobre la síntesis de ésteres por las cepas de *S. cerevisiae* y *Kloeckera apiculata* reportado previamente (Beltran *et al.*, 2008; Erten, 2002; Iñiguez-Muñoz *et al.*, 2019; Molina *et al.*, 2007). Por otro lado, para la cepa ME4a se observó un efecto de curvatura con respecto a la temperatura, mostrando una respuesta similar a una función de tipo cóncavo hacia arriba.

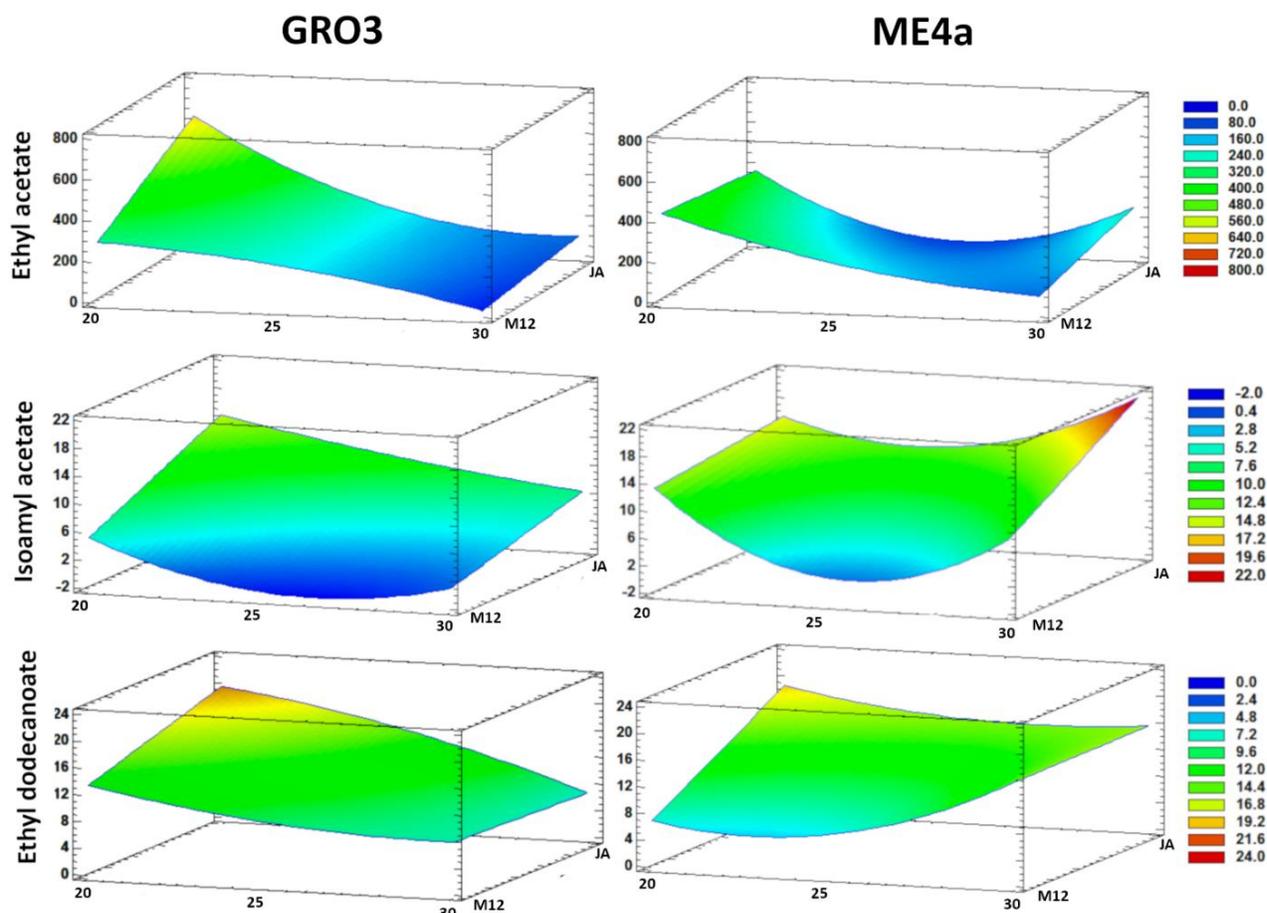


Ilustración 19 Superficies de respuesta estimada de la producción de ésteres del diseño 2x2x3. ME4a derecha, GRO3 izquierda. Eje "x" Temperatura (° c), eje "z" medio de cultivo (M12 y JA = jugo de agave), eje "y" nivel de concentración estimada de cada éster (mg / L).

El acetato de isoamilo, es el único éster que aumenta su concentración con el aumento de temperatura en el jugo de agave utilizando ME4a, lo que concuerda con las condiciones de producción de éster reportadas por Saerens *et al.* (2008). Para este éster se obtuvo una concentración máxima de 20.54 ± 0.23 mg/L con ME4a a 30°C. El nivel de producción fue tres órdenes de magnitud superior a las concentraciones reportadas con diferentes levaduras en diferentes fermentaciones alcohólicas (Beckner Whitener *et al.*, 2015; Kong *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2016; Lorenzini *et al.*, 2019; Sadoudi *et al.*, 2012; Segura-García *et al.*, 2015), y el doble de producción que *P. anomala* en medio sintético (Rojas *et al.*, 2001).

Por otra parte, el acetato de etilo alcanzó la máxima producción con la cepa GRO3 en jugo de agave a 20°C (626.01 ± 16.95 mg/L). Este nivel de producción fue cuatro órdenes de magnitud superior a las concentraciones reportadas con otras levaduras no-*Saccharomyces* en diferentes

fermentaciones alcohólicas (Beckner Whitener *et al.*, 2015; Kong *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019; Moreira *et al.*, 2005) y similar a los niveles de producción de *P. kluyveri* en medio sintético (Segura-García *et al.*, 2015) y fermentación maloláctica con *Oenococcus oeni* (Knoll *et al.*, 2011). Sin embargo, no se recomienda utilizar cepas con altos niveles de producción de acetato de etilo en las bebidas alcohólicas (Rêgo *et al.*, 2020), debido a que pueden afectar negativamente al aroma y sabor. Para el caso del dodecanoato de etilo, la mayor producción fue de 20.2 ± 4.16 mg/L a 20°C en jugo de agave, sin tener una diferencia significativa entre cepas. Esta concentración es tres órdenes de magnitud superior a las obtenidas por *P. fermentans* y *S. cerevisiae* en la fermentación mixta de uva espina china (Kong *et al.*, 2019) y casi 10 veces más que la producida en la fermentación mixta de jugo de manzana de anarcado con *Hanseniaspora opuntiae* y *S. cerevisiae* (Rêgo *et al.*, 2020). Estos resultados sobresalientes en la producción de ésteres, especialmente de acetato de isoamilo y dodecanoato de etilo, combinados con una fermentación eficiente y una producción de etanol relativamente alta, potencian estas cepas de *P. kluyveri* como candidatas para estudios fisiológicos, genéticos y de biosíntesis de ésteres de acetato y etil ésteres de ácidos grasos.

Algunos autores han informado que la síntesis de ésteres aumenta con la disminución de la temperatura de fermentación (Beltran *et al.*, 2008; Erten, 2002; Iñiguez-Muñoz *et al.*, 2019; Molina *et al.*, 2007) y algunos otros han descrito un efecto negativo sobre síntesis de ésteres derivados de una baja temperatura de fermentación (Llaurado *et al.*, 2002; Saerens *et al.*, 2008). En el presente trabajo hemos encontrado que la temperatura juega un papel importante en la síntesis de ésteres, sin embargo, depende de la cepa y condición de fermentación, por lo tanto, se debe especificar el éster de interés para poder seleccionar la cepa y condiciones de fermentación adecuadas.

Por otra parte, las diferencias en la producción de ésteres entre las cepas mostradas en el presente trabajo podrían explicarse por los niveles de sobreexpresión de genes clave, ésta idea se basa en trasladar los resultados publicados en otros estudios donde se ha realizado la sobreexpresión y delección de algunos genes implicados en la síntesis de ésteres (Fujii *et al.*, 1996b; Fukuda *et al.*, 1998b; Lilly *et al.*, 2000; Verstrepen *et al.*, 2003c). Por ejemplo, Verstrepen *et al.* (2003c) encontraron que en *S. cerevisiae* los genes ATF1 y ATF2 son los responsables de la síntesis total de acetato de isoamilo, acetato de pentilo, acetato de hexilo, acetato de heptilo y acetato de feniletilo, pero solo responsables del 50% de producción de acetato de etilo, acetato de propilo y acetato de isobutilo, suponiendo en su tiempo de la presencia de otros genes implicados en la síntesis de éstos ésteres.

Por otra parte, Kruis *et al.* (2018a), encontraron que en una cepa de *S. cerevisiae* con los seis genes deletados que se conocen de la síntesis de ésteres (ATF1, ATF2, EHT1, EEB1, EAT1, IMO32), aún presentaba producción de acetato de etilo, concluyendo que posiblemente *S. cerevisiae* tiene otros mecanismos para la producción de acetato de etilo y acetato de isoamilo, que podrían incluir AAT desconocidos o diferentes reacciones enzimáticas. Así mismo, van Rijswijck *et al.* (2019) encontraron que *C. fabianii* carece de un homólogo de Atf1, mientras que *P. kudriavzevii* carecía de homólogos de ATF1 y ATF2, siendo EAT1 el único miembro conocido de la familia ATT en la especie de *P. kudriavzevii*.

Sin embargo, los resultados hasta el momento del presente trabajo nos muestran que el metabolismo de *P. kluyveri* es bastante diferente al de otras cepas, por lo que se requieren análisis genómicos y transcriptómicos para comprender mejor su comportamiento

Una vez identificadas las condiciones que aumentan las producciones de ésteres, se realizó un análisis de medias para identificar los niveles con mayores diferencias en la producción de ésteres. Este análisis permitirá seleccionar las condiciones que se usarán en el sistema de mini biorreactores.

7.2.3 Análisis de Medias

Para el análisis de medias se procedió a realizar el análisis de la influencia de cada factor para cada cepa. En la Ilustración 20, se muestra la interacción de las variables independientes del diseño experimental 2^3 con respecto a la producción de ésteres para ambas cepas de *P. Kluyveri*. En el caso de la producción de acetato de etilo se distingue el mismo efecto de la velocidad y medios. Se observó un efecto positivo en su producción al utilizar jugo de agave y aumentar la velocidad, y un efecto negativo en el medio M12 al aumentar la velocidad. El mayor impacto se obtuvo en el jugo de agave utilizando la cepa ME4a, con un incremento en la producción de aproximadamente 5 veces más a 250 rpm que a 100 rpm.

Por otra parte, la producción de acetato de isoamilo muestra la mayor diferencia de todas las condiciones del diseño en el jugo de agave con la cepa ME4a, aumentando de cero a más de 20 mg/l a 250 rpm. El butirato de etilo es el único éster en el que el aumento de su producción es mayor en el medio M12, incrementando la producción con ME4a poco más de 5 veces a 250 rpm que a 100 rpm.

Así mismo para el dodecanoato de etilo, no se observan diferencias significativas entre los medios para ambas cepas, pero si un incremento de su producción de casi 15 veces más con ME4a a 250 rpm que a 100 rpm.

Para el segundo diseño experimental se realizó el mismo análisis de medias. En la Ilustración 21, se observa que el mayor incremento de producción de acetato de etilo fue de 6 veces con la cepa GRO3 en jugo de agave a 20°C.

Por otra parte, las mayores concentraciones de aceto de isoamilo para ambas cepas fueron con el jugo de agave, teniendo un incremento de poco más del doble al disminuir la temperatura de 30°C a 20°C con GRO3, mientras que ME4a tiene un aumento de un 30% de su producción al incrementar la temperatura de 20°C a 30°C.

Para el butirato de etilo se corrobora que su producción es mayor en el medio M12, que en el jugo de agave. Para GRO3 hay un aumento al disminuir la temperatura en este medio, sin embargo, pasa lo contrario con el jugo de agave. En el caso del dodecanoato de etilo, la producción se incrementa 2.5 veces con GRO3 en el jugo de agave, al disminuir la temperatura de 30°C a 20°C.

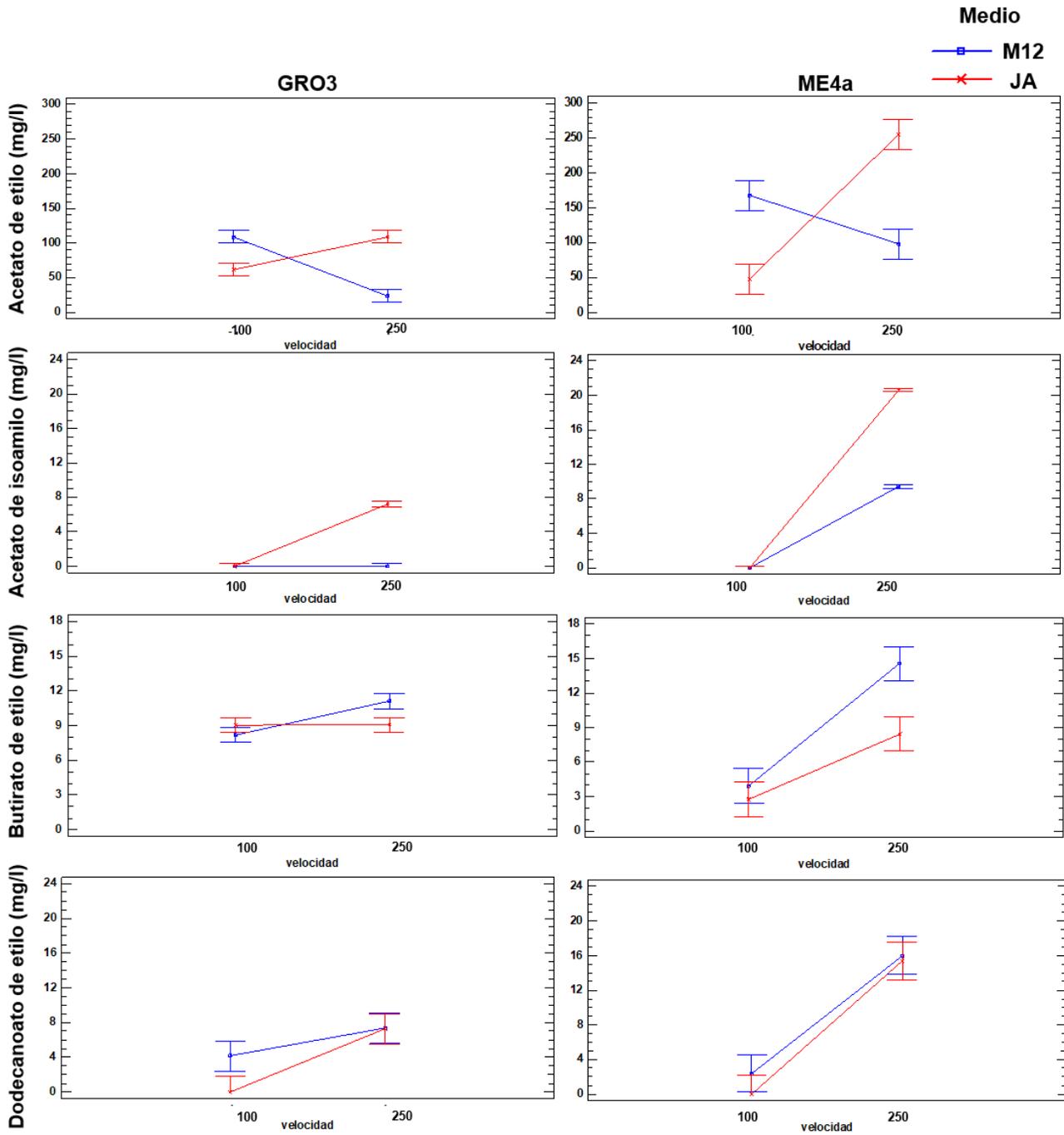


Ilustración 20 Gráficas de medias del diseño 2^3 , empleando el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de confianza del 95.0%. En azul el medio M12 en rojo el jugo de agave (JA)

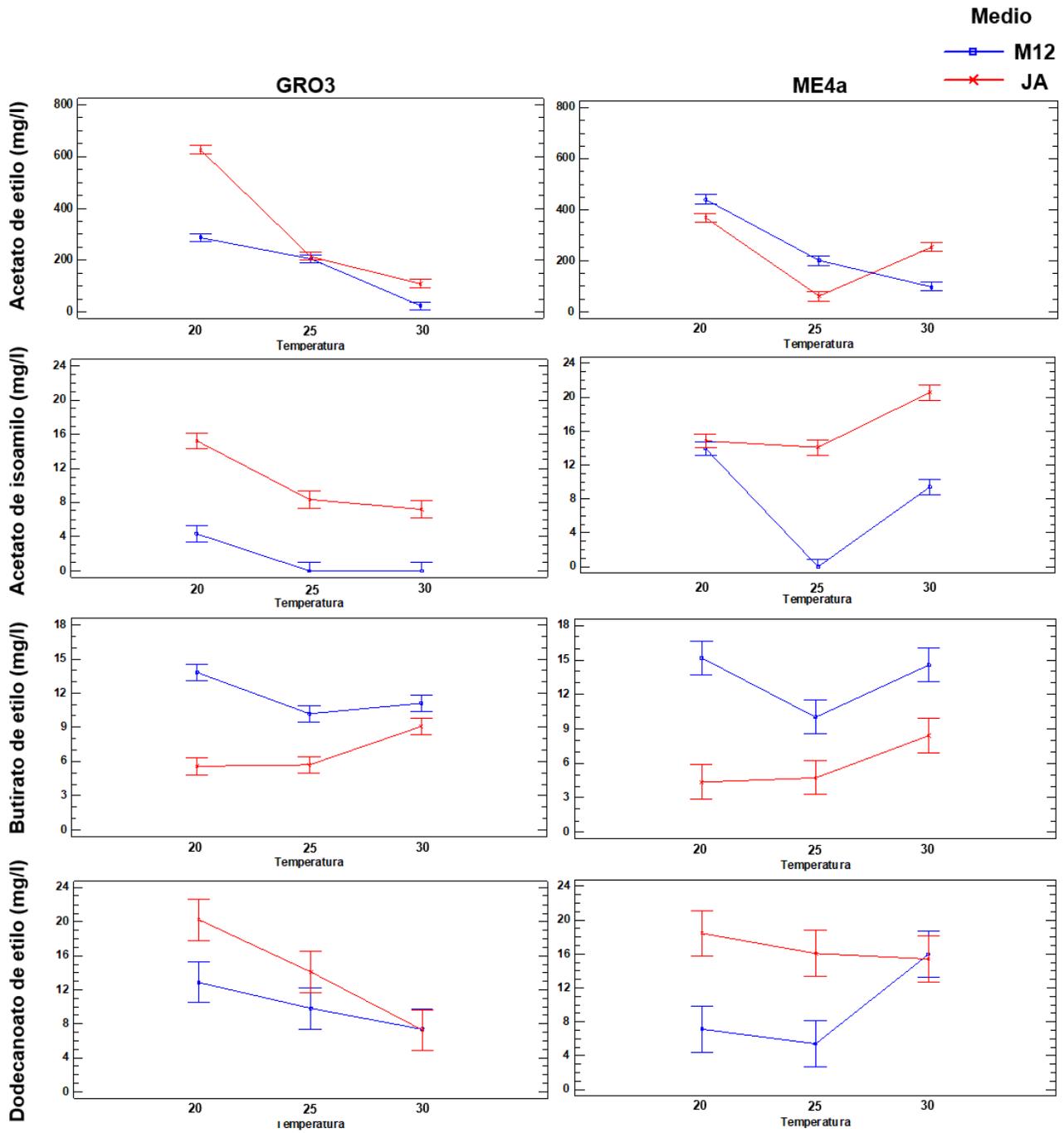


Ilustración 21 Gráficas de medias del diseño 2x2x3, empleando el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de confianza del 95.0%. En azul el medio M12 en rojo el jugo de agave (JA)

Debido a que los mayores incrementos de producción fueron dados por el cambio de velocidad y con el cambio de temperatura de 20 y 30°C, se procedió a realizar las cinéticas en los mini biorreactores Applikon® usando estos niveles. Así mismo, debido a que las mayores producciones fueron en el jugo de agave este medio fue el utilizado, como único medio de cultivo.

7.3 Sistema de mini biorreactores.

Las cinéticas en los mini biorreactores, fueron llevada a cabo como se menciona en la sección de metodología del presente trabajo. Considerando que los sistemas de fermentación son completamente distintos, se procedió primeramente a realizar cinéticas por 72h variando la temperatura y posteriormente la velocidad de agitación, con el objetivo de identificar qué condición influye en mayor medida la producción de ésteres en este sistema.

7.3.1 Efecto de la temperatura.

En la Ilustración 22 que muestran las cinéticas de ambas cepas a diferentes temperaturas, con una agitación de 400 rpm. Se observa una fase “lag” más larga en las cinéticas a 20°C, llegando hasta 8 horas de fermentación, mientras que en las cinéticas a 30°C esta etapa se reduce, en la mayoría de los casos a 4 horas. Por otra parte, en las fermentaciones a 20°C no se alcanza a observar un estado estacionario, mientras que en las cinéticas a 30°C este nivel se alcanza aproximadamente a las 39 horas de fermentación. Aunque se tiene un crecimiento más lento a 20°C, a esta temperatura se alcanzan concentraciones mayores de biomasa que a 30°C, con un incremento del 35.3% y 53.3% para GRO3 y ME4a respectivamente. Este efecto también fue observado en las micro fermentaciones, sin embargo, en el primer sistema la cantidad de biomasa fue casi el doble.

Para el caso del etanol, no se alcanza un máximo de producción a 20°C, sino que muestra un incremento casi lineal a lo largo de la fermentación. Por otra parte, las fermentaciones a 30°C alcanzan un máximo a las 48 horas, manteniéndose casi constante en las horas posteriores.

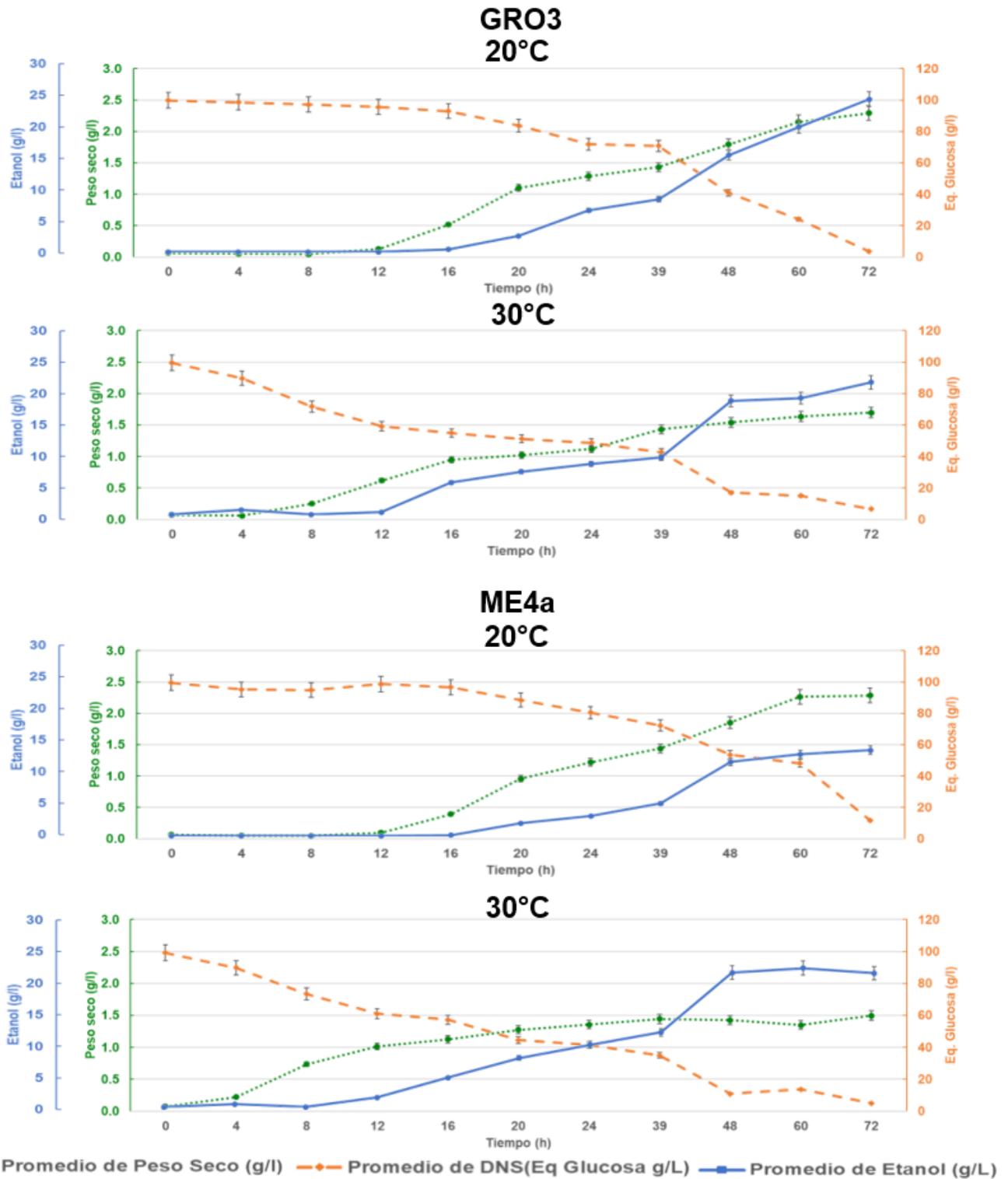


Ilustración 22 Cinéticas de crecimiento de GRO3 y ME4a en el sistema de mini biorreactores en jugo de agave a 400 rpm a dos diferentes temperaturas 20°C y 30°C.

Con respecto a las producciones de ésteres, en ninguna de las dos temperaturas se alcanzó el 50% de la producción máxima obtenida para acetato de isoamilo, ni dodecanoato de etilo que la obtenida en el sistema micro fermentativo. Sin embargo, las producciones de acetato de etilo y butirato de etilo a 30°C fueron similares. Por estas diferencias, se procedió a realizar el análisis de medias de estas variables.

7.3.1.1 Análisis de media

El análisis de medias se muestra en la Ilustración 23. Se observa una diferencia significativa de la temperatura de fermentación únicamente para la síntesis de butirato de etilo con la cepa ME4a, con un cambio de 1.5 veces más a 30°C que a 20°C. Este efecto de incremento en la producción de butirato de etilo con respecto al incremento de la temperatura se observó con esta misma cepa en las micro fermentaciones.

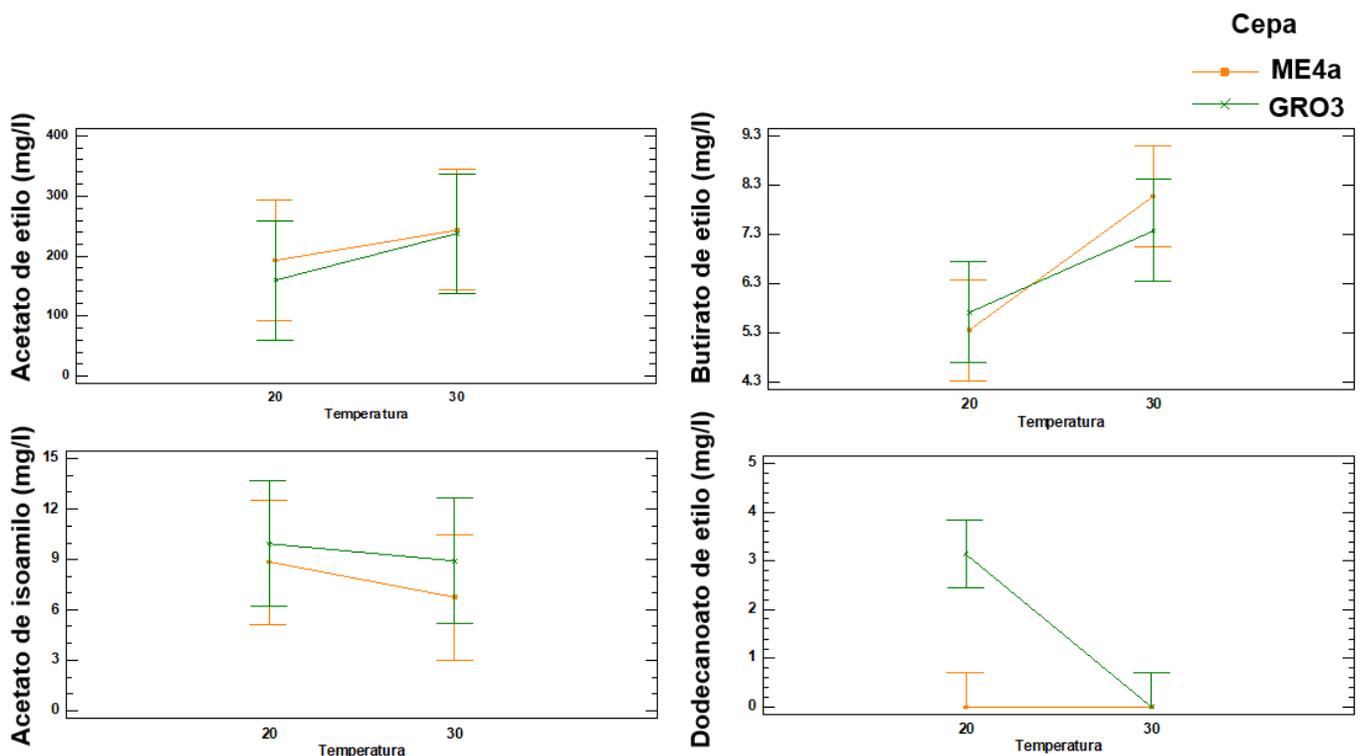


Ilustración 23 Gráficas de medias de GRO3 y ME4a en el sistema de mini biorreactores, variando la temperatura de fermentación (20 y 30°C). Empleando el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de confianza del 95.0%

De igual manera, para el dodecanoato de etilo se observa un incremento de 3.3 veces más a 20°C que a 30°C con la cepa GRO3, también este efecto de incremento con respecto a la disminución de la temperatura se corrobora con los resultados obtenidos en las micro fermentaciones, sin embargo, teniendo un menor efecto en este sistema.

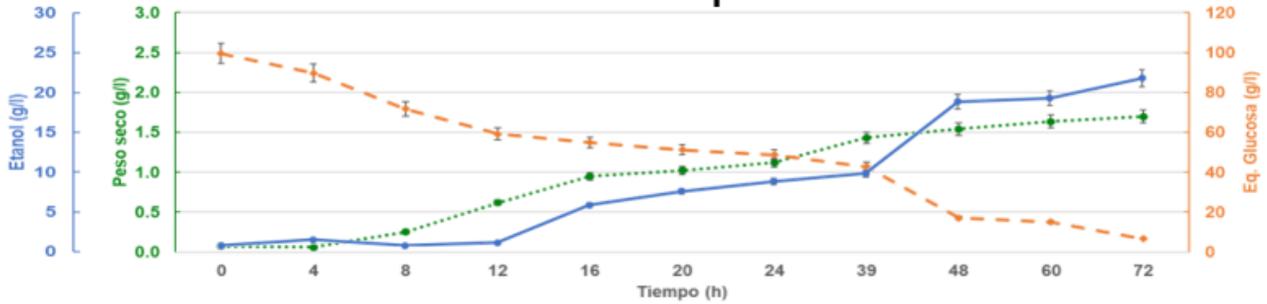
7.3.2 Efecto de la velocidad de agitación

En la Ilustración 24 se presentan las cinéticas de crecimiento de ambas cepas de *P. kluyveri* a 30°C a dos diferentes velocidades de agitación. Se observa un incremento de producción de biomasa y consumo de sustrato por ambas cepas, al aumentar la velocidad a 900 rpm, alcanzando a consumir casi la totalidad del sustrato a las 48 horas de fermentación. Así mismo se observa un estado estacionario después de 39 horas de fermentación.

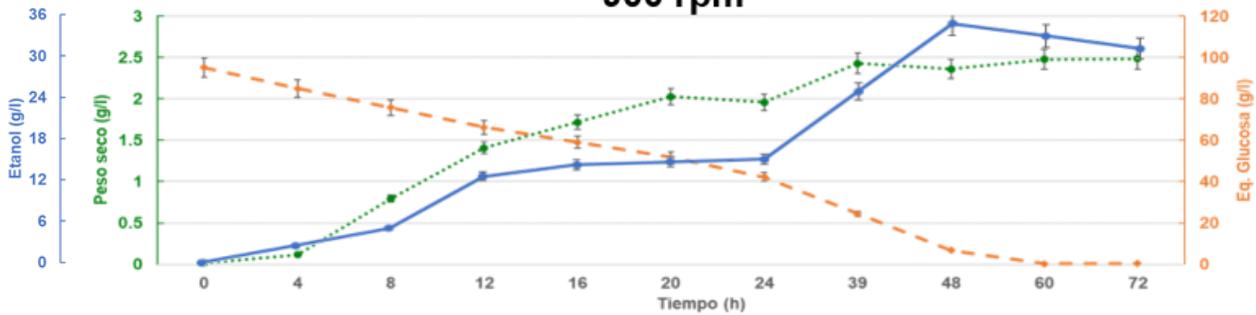
Por otra parte, ambas cepas alcanzan su punto máximo de producción de etanol al aumentar la velocidad de agitación a 900 rpm, obteniendo 29.0 ± 0.35 g/l y 25.95 ± 0.6 g/l para GRO3 y ME4a, respectivamente a las 48 horas de fermentación.

Dichos niveles máximos de producción de etanol corresponden a una producción de 25% menos y 17.3% más, que las producciones de etanol obtenidas en el sistema de micro fermentación con GRO3 y ME4a, respectivamente. Estas diferencias de pueden relacionarse a otros factores presentes en los reactores, por ejemplo, el estrés por corte debido a la agitación mecánica con un impulsor (Stoupis *et al.*, 2018).

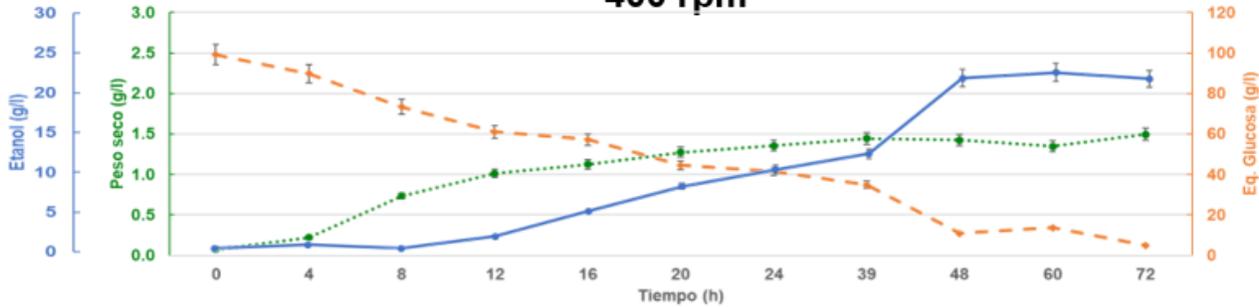
GRO3 400 rpm



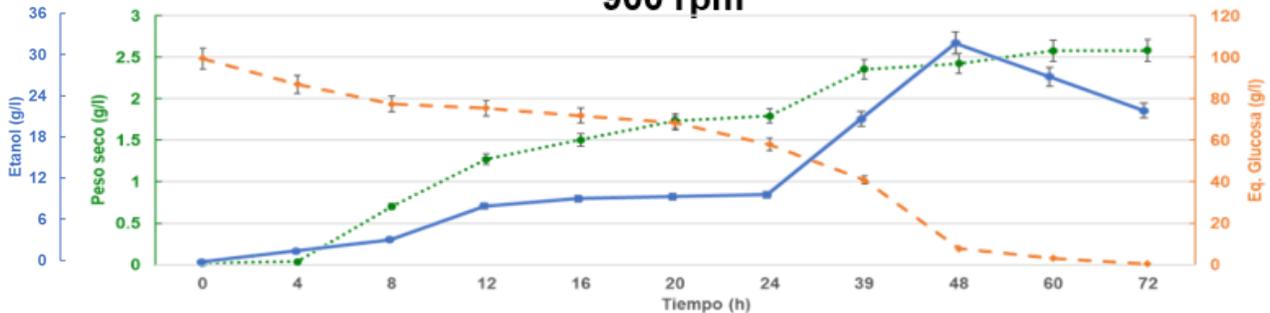
900 rpm



ME4a 400 rpm



900 rpm



●●● Promedio de Peso Seco (g/l) - - - Promedio de DNS(Eq Glucosa g/L) — Promedio de Etanol (g/L)

Ilustración 24 Cinéticas de crecimiento de GRO3 y ME4a en el sistema de mini biorreactores en jugo de agave a 30°C a dos diferentes velocidades 400 rpm y 900 rpm.

7.3.2.1 Análisis de medias

El análisis de medias del cambio de velocidad de agitación para ambas cepas en el sistema de mini biorreactores se presenta en la Ilustración 25. Se pueden observar que la velocidad de agitación influye más en la síntesis de ésteres que la temperatura.

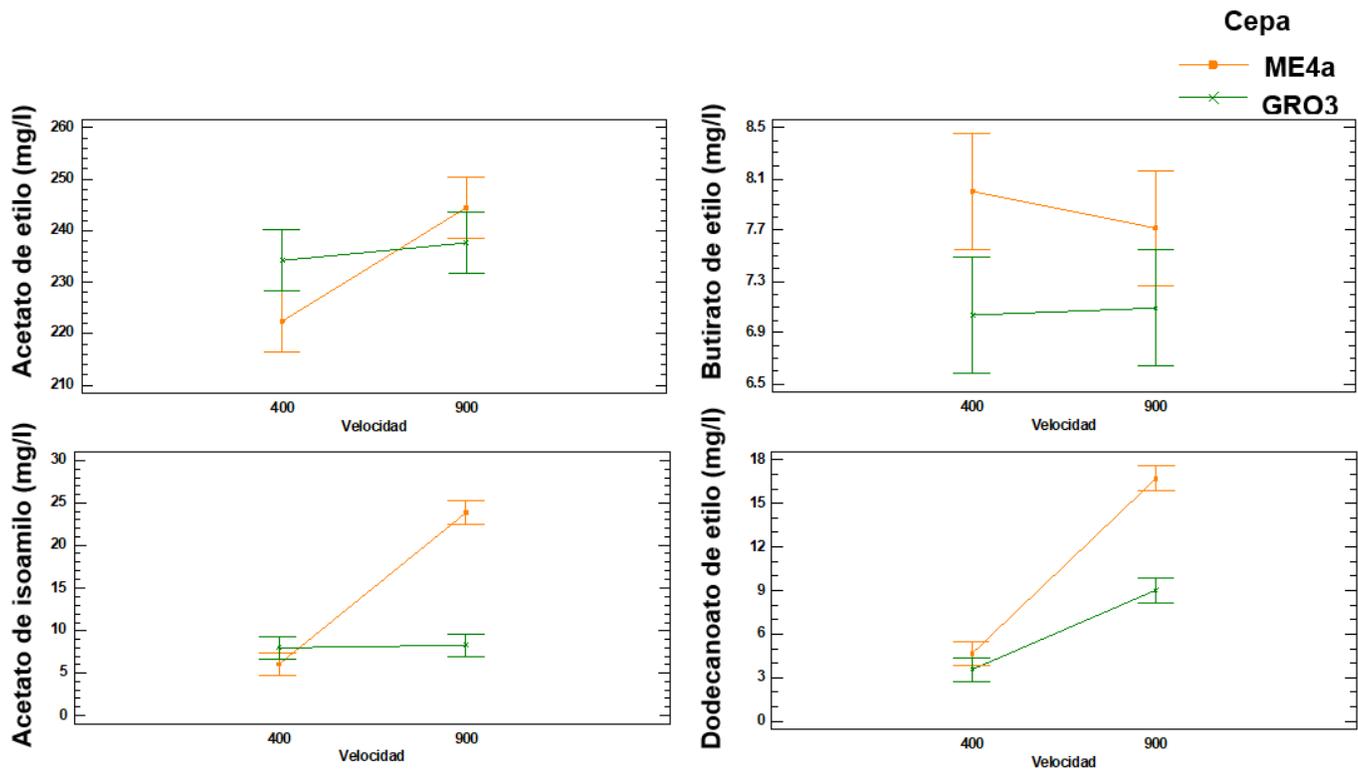


Ilustración 25 Gráficas de medias de GRO3 y ME4a en el sistema de mini biorreactores, variando la velocidad de agitación (400 y 900 rpm). Empleando el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de confianza del 95.0%

Para el acetato de etilo, el único impacto en la producción se obtuvo con la cepa ME4a, incrementando la producción de éste en un 11.36% al pasar de 400 rpm a 900 rpm. En el caso de GRO3 no se observa un efecto en la producción de acetato de etilo con respecto a la velocidad en estas condiciones de operación, siendo un comportamiento similar al obtenido en el sistema de micro fermentación, considerando la variabilidad de los datos.

Por otra parte, para el acetato de isoamilo, se observa el mayor incremento con la cepa ME4a, incrementando poco más de cuatro veces su producción a 900 rpm. Para el butirato de etilo, no se observan diferencias en su producción con respecto a la velocidad de agitación para ambas

cepas. Este efecto también es el mismo que el obtenido en el sistema de micro fermentación, en el jugo de agave.

Por último, la producción del dodecanoato de etilo, incrementa con ambas cepas, alcanzando un incremento del doble para GRO3 y un incremento de 3.4 veces más con ME4a incrementando la velocidad a 900rpm. Este incremento de mayor proporción para una cepa que para otra por la velocidad de agitación también es similar al obtenido en el sistema de micro fermentación.

Las máximas producciones de acetato de etilo fueron de 224.48 ± 5.59 y 137.66 ± 4.9 mg/l, con ME4a y GRO3 respectivamente a 900 rpm. Las máximas concentraciones de acetato de isoamilo fueron de 23.83 ± 0.69 y 8.3 ± 0.58 mg/l, con ME4a y GRO3 respectivamente a 900 rpm. Las máximas concentraciones de butirato de etilo fueron de 7.72 ± 0.46 y 7.09 ± 0.01 mg/l, con ME4a y GRO3 respectivamente a 900 rpm. Y las máximas concentraciones de dodecanoato de etilo fueron de 16.7 ± 1.0 y 9.01 ± 0.01 mg/l, con ME4a y GRO3 respectivamente a 900 rpm. Todos estos máximos niveles de producción coinciden con los máximos niveles alcanzados con ambas cepas a 30°C en jugo de agave, a 250rpm en el sistema de micro fermentación.

Sin embargo, las producciones a 400 rpm del sistema de mini biorreactores y las del sistema de micro fermentación a 100 rpm, no alcanzan los mismos niveles como ya se ha discutido. A pesar de esto, los cambios de la velocidad de agitación propician los mayores cambios de producción de la mayoría de los ésteres, por lo que estas condiciones podrían ser las propicias para realizar un análisis de expresión diferencial en la síntesis de estos ésteres.

En resumen, para las micro fermentaciones, el jugo de agave fue el medio que promovió en mayor medida la producción de ésteres para ambas cepas. A excepción del butirato de etilo, que mostro los mayores niveles de producción en el medio M12. El incremento de la velocidad de agitación redujo el tiempo de fermentación e incremento la producción de ésteres, incrementando en mayor medida la producción de esterres por ME4a que por GRO3. Por otra parte, el cambio de temperatura de fermentación incremento en mayor medida la producción de ésteres por GRO3 que por ME4a. Los mayores niveles de producción de ésteres se obtuvieron con la cepa ME4a en jugo de agave a 250 rpm y 30°C.

Por otra parte, para las fermentaciones en los mini biorreactores los mayores niveles de producción de ésteres fueron los obtenidos con la cepa ME4a. El aumento de la velocidad de agitación incremento en mayor medida la producción de ésteres que el cambio de la temperatura

de fermentación con ambas cepas. Solo el butirato de etilo incrementó considerablemente al disminuir la temperatura de fermentación con GRO3.

8 Conclusiones

Las cepas de *P. kluyveri* son de gran interés debido a su capacidad en la producción de compuestos volátiles, así como la variabilidad de perfiles aromáticos que pueden generar. Durante este trabajo se logró evaluar la producción de compuestos volátiles a partir de 21 cepas de *P. kluyveri* aisladas de diferentes procesos fermentativos. Los resultados mostraron que la producción de compuestos volátiles se ve afectada por diferentes factores incluyendo los medios de producción, y presenta variabilidad en función de los diferentes procesos de fermentación y regiones de aislamiento de las cepas. A partir de un análisis de compuestos principales se distinguen las cepas GRO3, ME4a, RJC y TZB como las mejores candidatas para la producción de ésteres y alcoholes. Sin embargo, de entre estas cuatro cepas se seleccionaron GRO3 y ME4a para los análisis producción de compuestos volátiles, debido a su desempeño en la fermentación del jugo de agave.

A partir de los dos diseños experimentales realizados en las micro fermentaciones se identificaron diferencias significativas entre GRO3 y ME4a, con respecto a la producción de compuestos volátiles. ME4a presentó niveles de producción de ésteres superiores a GRO3, alcanzando concentraciones tres órdenes de magnitud superiores a los reportados para otras levaduras no-*Saccharomyces* y algunas cepas de *S. cerevisiae* en diferentes tipos de fermentación.

La velocidad de agitación de 250 rpm tuvo el mayor efecto en la síntesis de alcoholes y ésteres en ambos sistemas de fermentación, aumentando su producción, en algunos casos, más de 20 veces. Por otro lado, el jugo de agave de *A. tequilana* mostró la mayor contribución a la producción de ésteres, duplicando los niveles de producción en comparación con el medio M12.

Asimismo, se corroboró que la cepa GRO3 es una levadura capaz de producir altos niveles de etanol, comparables a los reportados por *S. cerevisiae* y superando a varias levaduras no-*Saccharomyces*. En el caso de ME4a se distingue una posible síntesis de etanol “estancada” a 250 rpm en jugo de agave en el sistema de micro fermentación, al identificar un gran incremento de producción de acetaldehído y baja producción de etanol.

Además, se analizó la influencia de la temperatura de fermentación para cada éster sintetizado por estas dos cepas, identificando efectos tanto negativos como positivos sobre la

producción de ésteres al disminuir la temperatura de fermentación. Estos resultados sugieren diferencias en el metabolismo de biosíntesis de los ésteres de acetato, al menos, para la cepa ME4a y reafirman la variabilidad en el metabolismo de cepas de la misma especie. Con lo que se corrobora, que no se debe generalizar la producción de ésteres al realizar estudios con una sola cepa.

Los resultados obtenidos en este trabajo sustentan las bases para que se puedan utilizar diferentes cepas de *P. kluyveri* y condiciones de fermentación para modular el sabor y el aroma de las bebidas fermentadas.

Por último, pero no menos importante, se destaca y valida el uso potencial de estas levaduras no-*Saccharomyces* para su uso en procesos industriales de fermentación alcohólica en monocultivos.

9 Perspectivas

Los presentes resultados sientan las bases para identificar condiciones con niveles de producción significativamente diferentes que podrían permitir análisis de expresión diferencial en síntesis de ésteres para *P. kluyveri*, profundizando así en los posibles efectos moleculares que influyen en la formación de estos compuestos.

Para poder entender los mecanismos metabólicos involucrados en las vías de síntesis complejas para este tipo de compuestos, se requiere hacer uso de herramientas transcriptómicas, proteómicas y de metabolómica (Ciani *et al.*, 2010), y al haber identificado diferentes condiciones se podrá discriminar la influencia o no de determinado gen, RNA, proteína o metabolito, en la biosíntesis de ésteres de interés.

Durante la fermentación, las levaduras en respuesta al estrés generado, sobreexpresan o subexpresan algunos genes (Ma *et al.*, 2010). El análisis de los genes involucrados en la síntesis de ésteres sería la siguiente etapa del presente trabajo, para lo cual se requieren estandarizar herramientas y análisis moleculares, como lo es la extracción de ARN total, contemplando pureza e integridad para posteriores análisis transcriptómicos.

10 Referencias

- Aguilera-Rojo, D., Martín del Campo, S., Ramírez, R., Escalona-Buendía, H., & Estarrón-Espinosa, M. (2003). Identification of distinctive parameters between Tequila mixto and Tequila 100% agave by gas chromatography. In (pp. 761-764).
- Amaya-Delgado, L., Herrera-Lopez, E. J., Arrizon, J., Arellano-Plaza, M., & Gschaedler, A. (2013). Performance evaluation of *Pichia kluyveri*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in industrial tequila fermentation. *World J Microbiol Biotechnol*, 29(5), 875-881. doi:<http://doi.org/10.1007/s11274-012-1242-8>
- Arellano, M., Gschaedler, A., & Alcazar, M. (2012). Major Volatile Compounds Analysis Produced from Mezcal Fermentation Using Gas Chromatography Equipped Headspace (GC–HS). In *Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications* (pp. 73-88).
- Arrizon, J., & Gschaedler, A. (2002). Increasing fermentation efficiency at high sugar concentrations by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of the tequila fermentation process. *Can J Microbiol*, 48(11), 965-970. doi:<http://doi.org/10.1139/w02-093>
- Arrizon, J., & Gschaedler, A. (2007). Effects of the addition of different nitrogen sources in the tequila fermentation process at high sugar concentration. *J Appl Microbiol*, 102(4), 1123-1131. doi:<http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03142.x>
- Barnett, J. A., & Entian, K.-D. (2005). A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism1. *Yeast*, 22(11), 835-894. doi:10.1002/yea.1249
- Batista, N. N., Ramos, C. L., Ribeiro, D. D., Pinheiro, A. C. M., & Schwan, R. F. (2015). Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 221-227. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.051>
- Beckner Whitener, M. E., Carlin, S., Jacobson, D., Weighill, D., Divol, B., Conterno, L., . . . Vrhovsek, U. (2015). Early fermentation volatile metabolite profile of non-*Saccharomyces* yeasts in red and white grape must: A targeted approach. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 412-422. doi:10.1016/j.lwt.2015.05.018
- Beltran, G., Novo, M., Guillamon, J. M., Mas, A., & Rozes, N. (2008). Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *Int J Food Microbiol*, 121(2), 169-177. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.030
- Bely, M., Rinaldi, A., & Dubourdieu, D. (2003). Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *J Biosci Bioeng*, 96(6), 507-512. doi:[http://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)70141-3](http://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70141-3)
- Benn, S. M., & Peppard, T. L. (1996). Characterization of tequila flavor by instrumental and sensory analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(2), 557-566. doi:DOI 10.1021/jf9504172
- Bilbao, A., Irastorza, A., Duenas, M., & Fernandez, K. (1997). The effect of temperature on the growth of strains of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice fermentation. *Lett Appl Microbiol*, 24(1), 37-39. doi:<http://doi.org/10.1046/j.1472-765x.1997.00340.x>
- Blateyron, L., & Sablayrolles, J. M. (2001). Stuck and slow fermentations in enology: statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(2), 184-189. doi:[https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80063-3](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80063-3)
- Bohlscheid, J. C., Fellman, J. K., Wang, X. D., Ansen, D., & Edwards, C. G. (2007). The influence of nitrogen and biotin interactions on the performance of *Saccharomyces* in alcoholic fermentations. *J Appl Microbiol*, 102(2), 390-400. doi:<http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03180.x>
- Cabranes, C., Mangas, J. J., & Blanco, D. (1997). Selection and Biochemical Characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains Isolated from Spanish Cider. *Journal of the Institute of Brewing*, 103(3), 165-169. doi:<http://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1997.tb00945.x>
- Calderbank, J., & Hammond, J. R. M. (2018). Influence of Higher Alcohol Availability on Ester Formation by Yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 52(2), 84-90. doi:10.1094/asbcj-52-0084
- Canonico, L., Comitini, F., & Ciani, M. (2018). *Torulasporea delbrueckii* for secondary fermentation in sparkling wine production. *Food Microbiol*, 74, 100-106. doi:<http://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.009>

- Canonico, L., Solomon, M., Comitini, F., Ciani, M., & Varela, C. (2019). Volatile profile of reduced alcohol wines fermented with selected non-Saccharomyces yeasts under different aeration conditions. *Food Microbiology*, *84*, 103247. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103247>
- Chen, S., & Xu, Y. (2010). The Influence of Yeast Strains on the Volatile Flavour Compounds of Chinese Rice Wine. *Journal of the Institute of Brewing*, *116*(2), 190-196. doi:<http://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00417.x>
- Christiaens, J. F., Franco, L. M., Cools, T. L., De Meester, L., Michiels, J., Wenseleers, T., . . . Verstrepen, K. J. (2014). The fungal aroma gene ATF1 promotes dispersal of yeast cells through insect vectors. *Cell Rep*, *9*(2), 425-432. doi:10.1016/j.celrep.2014.09.009
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-Saccharomyces yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res*, *10*(2), 123-133. doi:<http://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x>
- Ciani, M., & Maccarelli, F. (1998). Oenological properties of non-Saccharomyces yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *14*(2), 199-203. doi:<http://doi.org/10.1023/a:1008825928354>
- Ciani, M., & Picciotti, G. (1995). The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-Saccharomyces yeasts associated with wine-making. *Biotechnology Letters*, *17*(11), 1247-1250. doi:<http://doi.org/10.1007/bf00128395>
- Contreras, A., Hidalgo, C., Schmidt, S., Henschke, P. A., Curtin, C., & Varela, C. (2015). The application of non-Saccharomyces yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. *International Journal of Food Microbiology*, *205*, 7-15. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.027
- Coulibaly, W. H., Bouatenin, K. M. J.-P., Kouamé, A. K., Camara, F., Bi, Y. C. T., Toka, D. M., . . . Djè, K. M. (2020). Use of non-Saccharomyces yeast strains as starter cultures to enhance fermented mango juice production. *Scientific African*, *7*, e00226. doi:<http://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00226>
- Critiani, G., & Monnet, V. (2001). *Food micro-organisms and aromatic ester synthesis* (Vol. 21).
- De Deken, R. H. (1966). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J Gen Microbiol*, *44*(2), 149-156. doi:10.1099/00221287-44-2-149
- De la Torre Gonzalez, F. J., Avendano, D. O. G., Mathis, A. C. G., & Kirchmayr, M. R. (2018). Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for differentiation of *Pichia kluyveri* strains isolated from traditional fermentation processes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *32*(17), 1514-1520. doi:10.1002/rcm.8192
- Díaz-Montaño, D. M., Marie-Line, D., Estarrón-Espinosa, M., & Strehaiano, P. (2008). Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from Agave tequilana Weber juice. *Enzyme and Microbial Technology*, *42*(7), 608-616. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.12.007
- Dufour, J. P., Malcorps, P. H., & Silcock, P. (2003). Control of Ester Synthesis During Brewery Fermentation. *Brewing Yeast Fermentation Performance*. doi:doi:10.1002/9780470696040.ch2110.1002/9780470696040.ch21
- Erten, H. (2002). Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *18*(4), 377-382. doi:<http://doi.org/10.1023/a:1015221406411>
- Escribano-Viana, R., Gonzalez-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., Lopez-Alfaro, I., Lopez, R., . . . Gutierrez, A. R. (2018). Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non-Saccharomyces/Saccharomyces yeasts. *Food Res Int*, *112*, 17-24. doi:<http://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.018>
- Fairbairn, S., McKinnon, A., Musarurwa, H. T., Ferreira, A. C., & Bauer, F. F. (2017). The Impact of Single Amino Acids on Growth and Volatile Aroma Production by *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 2554.
- Feng, X., Dong, H., Yang, P., Yang, R., Lu, J., Lv, J., & Sheng, J. (2016). Culture-Dependent and -Independent Methods to Investigate the Predominant Microorganisms Associated with Wet Processed Coffee. *Current Microbiology*, *73*(2), 190-195. doi:10.1007/s00284-016-1047-3
- Flores-Berrios, E. P., Alba-Gonzalez, J. F., Arrizon-Gavino, J. P., Romano, P., Capece, A., & Gschaedler, A. (2005). The uses of AFLP for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity between yeasts

- isolated from Mexican agave-distilled beverages and from grape musts. *Lett Appl Microbiol*, 41(2), 147-152. doi:10.1111/j.1472-765X.2005.01738.x
- Fornairon-Bonnefond, C., Aguera, E., Deytieux, C., Sablayrolles, J.-M., & Salmon, J.-M. (2003). Impact of oxygen addition during enological fermentation on sterol contents in yeast lees and their reactivity towards oxygen. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95(5), 496-503. doi:[https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)80051-8](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)80051-8)
- Fujii, T., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Furukawa, S., & Tamai, Y. (1997). Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene. *Applied and environmental microbiology*, 63(3), 910-915.
- Fujii, T., Nagasawa, N., Iwamatsu, A., Bogaki, T., Tamai, Y., & Hamachi, M. (1994). Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene. *Applied and environmental microbiology*, 60(8), 2786-2792.
- Fujii, T., Yoshimoto, H., Nagasawa, N., Bogaki, T., Tamai, Y., & Hamachi, M. (1996a). Nucleotide sequences of alcohol acetyltransferase genes from lager brewing yeast, *Saccharomyces carlsbergensis*. *Yeast*, 12(6), 593-598. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199605)12:6%3C593::AID-YEA593%3E3.0.CO;2-B
- Fujii, T., Yoshimoto, H., & Tamai, Y. (1996b). Acetate ester production by *Saccharomyces cerevisiae* lacking the ATF1 gene encoding the alcohol acetyltransferase. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81(6), 538-542. doi:Doi 10.1016/0922-338x(96)81476-0
- Fukuda, K., Yamamoto, N., Kiyokawa, Y., Yanagiuchi, T., Wakai, Y., Kitamoto, K., . . . Kimura, A. (1998a). Balance of activities of alcohol acetyltransferase and esterase in *Saccharomyces cerevisiae* is important for production of isoamyl acetate. *Applied and environmental microbiology*, 64(10), 4076-4078.
- Fukuda, K., Yamamoto, N., Kiyokawa, Y., Yanagiuchi, T., Wakai, Y., Kitamoto, K., . . . Kimura, A. (1998b). Brewing properties of sake yeast whose EST2 gene encoding isoamyl acetate-hydrolyzing esterase was disrupted. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(1), 101-106. doi:Doi 10.1016/S0922-338x(97)80362-5
- Gao, J., Yuan, W., Li, Y., Xiang, R., Hou, S., Zhong, S., & Bai, F. (2015a). Transcriptional analysis of *Kluyveromyces marxianus* for ethanol production from inulin using consolidated bioprocessing technology. *Biotechnol Biofuels*, 8, 115. doi:<http://doi.org/10.1186/s13068-015-0295-y>
- Gao, J., Yuan, W., Li, Y., Xiang, R., Hou, S., Zhong, S., & Bai, F. (2015b). Transcriptional analysis of *Kluyveromyces marxianus* for ethanol production from inulin using consolidated bioprocessing technology. *Biotechnology for biofuels*, 8, 115. doi:10.1186/s13068-015-0295-y
- Gschaedler, A., Rodríguez-Garay, B., Prado-Ramírez, R., & Flores-Montaña, J. (2015). *Ciencia y Tecnología del Tequila: Avances y Perspectivas* (Vol. 2): CIATEJ.
- Inoue, Y., Trevanichi, S., Fukuda, K., Izawa, S., Wakai, Y., & Kimura, A. (1997). Roles of esterase and alcohol acetyltransferase on production of isoamyl acetate in *Hansenula mrakii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 644-649. doi:DOI 10.1021/jf960648o
- Iñiguez-Muñoz, L. E., Arellano-Plaza, M., Prado-Montes-de-Oca, E., Kirchmayr, M., Segura-García, L. E., Amaya-Delgado, L., & Gschaedler Mathis, A. (2019). The production of esters and expression by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation on Agave tequilana juice in continuous cultures. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 18(2), 451-462. doi:<http://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n2/Iniguez>
- Ivorra, C., Pérez-Ortín, J. E., & del Olmo, M. I. (1999). An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. *Biotechnology and Bioengineering*, 64(6), 698-708. doi:10.1002/(sici)1097-0290(19990920)64:6<698::Aid-bit9>3.0.Co;2-z
- Jolly, N. P., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res*, 14(2), 215-237. doi:10.1111/1567-1364.12111
- Kashima, Y., Iijima, M., Nakano, T., Tayama, K., Koizumi, Y., Udaka, S., & Yanagida, F. (2000). Role of intracellular esterases in the production of esters by *Acetobacter pasteurianus*. *J Biosci Bioeng*, 89(1), 81-83. doi:[https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)88055-X](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)88055-X)
- Knoll, C., Fritsch, S., Schnell, S., Grossmann, M., Rauhut, D., & du Toit, M. (2011). Influence of pH and ethanol on malolactic fermentation and volatile aroma compound composition in white wines. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2077-2086. doi:<http://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.05.009>

- Kong, C.-L., Li, A.-H., Su, J., Wang, X.-C., Chen, C.-Q., & Tao, Y.-S. (2019). Flavor modification of dry red wine from Chinese spine grape by mixed fermentation with *Pichia fermentans* and *S. cerevisiae*. *LWT - Food Science and Technology*, *109*, 83-92. doi:<http://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.101>
- Kruis, A. J., Bohnenkamp, A. C., Nap, B., Nielsen, J., Mars, A. E., Wijffels, R. H., . . . Weusthuis, R. A. (2020). From Eat to trEat: engineering the mitochondrial Eat1 enzyme for enhanced ethyl acetate production in *Escherichia coli*. *Biotechnol Biofuels*, *13*(1), 76. doi:10.1186/s13068-020-01711-1
- Kruis, A. J., Gallone, B., Jonker, T., Mars, A. E., van Rijswijck, I. M. H., Wolkers-Rooijackers, J. C. M., . . . Weusthuis, R. A. (2018a). Contribution of Eat1 and Other Alcohol Acyltransferases to Ester Production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Microbiol*, *9*, 3202. doi:10.3389/fmicb.2018.03202
- Kruis, A. J., Levisson, M., Mars, A. E., van der Ploeg, M., Garces Daza, F., Ellena, V., . . . Weusthuis, R. A. (2017). Ethyl acetate production by the elusive alcohol acetyltransferase from yeast. *Metab Eng*, *41*, 92-101. doi:10.1016/j.ymben.2017.03.004
- Kruis, A. J., Mars, A. E., Kengen, S. W. M., Borst, J. W., van der Oost, J., & Weusthuis, R. A. (2018b). Alcohol Acetyltransferase Eat1 Is Located in Yeast Mitochondria. *Applied and environmental microbiology*, *84*(19), e01640-01618. doi:10.1128/AEM.01640-18
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). Chapter 1 - Definition, Classification and Nomenclature of the Yeasts. In C. P. Kurtzman, J. W. Fell, & T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts (Fifth Edition)* (pp. 3-5). London: Elsevier.
- Lachance, M. A. (1995). Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, *68*(2), 151-160. doi:<http://doi.org/10.1007/BF00873100>
- Lachenmeier, D. W., Sohnius, E. M., Attig, R., & Lopez, M. G. (2006). Quantification of selected volatile constituents and anions in Mexican Agave spirits (Tequila, Mezcal, Sotol, Bacanora). *J Agric Food Chem*, *54*(11), 3911-3915. doi:10.1021/jf060094h
- Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2019). Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. *South African Journal of Enology & Viticulture*, *21*(1). doi:10.21548/21-1-3560
- Lee, S. Y., & Kim, H. U. (2015). Systems strategies for developing industrial microbial strains. *Nat Biotechnol*, *33*(10), 1061-1072. doi:10.1038/nbt.3365
- Liang, J. J., Zhang, M. L., Ding, M., Mai, Z. M., Wu, S. X., Du, Y., & Feng, J. X. (2014). Alcohol dehydrogenases from *Kluyveromyces marxianus*: heterologous expression in *Escherichia coli* and biochemical characterization. *BMC biotechnology*, *14*, 45. doi:10.1186/1472-6750-14-45
- Lilly, M., Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Applied and environmental microbiology*, *66*(2), 744-753. doi:10.1128/aem.66.2.744-753.2000
- Liu, F., Li, S., Gao, J., Cheng, K., & Yuan, F. (2019). Changes of terpenoids and other volatiles during alcoholic fermentation of blueberry wines made from two southern highbush cultivars. *LWT - Food Science and Technology*, *109*, 233-240. doi:<http://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.100>
- Liu, P.-T., Lu, L., Duan, C.-Q., & Yan, G.-L. (2016). The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, *71*, 356-363. doi:<http://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.031>
- Llaurado, J., Rozes, N., Bobet, R., Mas, A., & Constanti, M. (2002). Low Temperature Alcoholic Fermentations in High Sugar Concentration Grape Musts. *Journal of Food Science*, *67*(1), 268-273. doi:<http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb11396.x>
- Lopez-Alvarez, A., Diaz-Perez, A. L., Sosa-Aguirre, C., Macias-Rodriguez, L., & Campos-Garcia, 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. *J Biosci Bioeng*, *113*(5), 614-618. doi:<http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.12.015>
- Lorenzini, M., Simonato, B., Slaghenaufi, D., Ugliano, M., & Zapparoli, G. (2019). Assessment of yeasts for apple juice fermentation and production of cider volatile compounds. *LWT - Food Science and Technology*, *99*, 224-230. doi:<http://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.075>
- Lu, Y., Huang, D., Lee, P.-R., & Liu, S.-Q. (2016). Assessment of volatile and non-volatile compounds in durian wines fermented with four commercial non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *96*(5), 1511-1521. doi:10.1002/jsfa.7253

- Ma, M., & Liu, Z. L. (2010). Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 829-845. doi:10.1007/s00253-010-2594-3
- Malcorps, P., Cheval, J. M., Jamil, S., & Dufour, J. P. (2018). A New Model for the Regulation of Ester Synthesis by Alcohol Acetyltransferase in *Saccharomyces Cerevisiae* during Fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 49(2), 47-53. doi:10.1094/asbcj-49-0047
- Malcorps, P., & Dufour, J. P. (1992). Short-chain and medium-chain aliphatic-ester synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, 210(3), 1015-1022. doi:10.1111/j.1432-1033.1992.tb17507.x
- Mason, A. B., & Dufour, J. P. (2000). Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast*, 16(14), 1287-1298. doi:10.1002/1097-0061(200010)16:14<1287::AID-YEA613>3.0.CO;2-I
- Mendoza, M. (2005). Importancia de la identificación de levaduras *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, 25, 15-23.
- Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F.-J., Wagner, R. S., & Hutzler, M. (2016). Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 569-587. doi:10.1002/jib.381
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428. doi:<http://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Molina-Guerrero, J. A., Botello-Álvarez, J. E., Estrada-Baltazar, A., Navarrete-Bolaños, J. L., Jiménez-Islas, H., Cárdenas-Manríquez, M., & Rico-Martínez, R. (2007). Compuestos volátiles en el mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6(1), 41-50.
- Molina, A. M., Swiegers, J. H., Varela, C., Pretorius, I. S., & Agosin, E. (2007). Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(3), 675-687. doi:10.1007/s00253-007-1194-3
- Morales, P., Rojas, V., Quirós, M., & Gonzalez, R. (2015). The impact of oxygen on the final alcohol content of wine fermented by a mixed starter culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(9), 3993-4003. doi:10.1007/s00253-014-6321-3
- Moreira, N., Mendes, F., Hogg, T., & Vasconcelos, I. (2005). Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. *Int J Food Microbiol*, 103(3), 285-294. doi:<http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.029>
- Morrissey, J. P., Etschmann, M. M., Schrader, J., & de Billerbeck, G. M. (2015). Cell factory applications of the yeast *Kluyveromyces marxianus* for the biotechnological production of natural flavour and fragrance molecules. *Yeast*, 32(1), 3-16. doi:10.1002/yea.3054
- Munoz, E., & Ingledew, W. M. (1989). Effect of yeast hulls on stuck and sluggish wine fermentations: importance of the lipid component. *Applied and environmental microbiology*, 55(6), 1560-1564.
- Nagasawa, N., Bogaki, T., Iwamatsu, A., Hamachi, M., & Kumagai, C. (1998). Cloning and nucleotide sequence of the alcohol acetyltransferase II gene (ATF2) from *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No. 7. *Biosci Biotechnol Biochem*, 62(10), 1852-1857. doi:10.1271/bbb.62.1852
- Nordström, K. (1962). Formation of Ethyl Acetate in Fermentation with Brewer's Yeast. Iii. Participation of Coenzyme A. *Journal of the Institute of Brewing*, 68(5), 398-407. doi:10.1002/j.2050-0416.1962.tb01882.x
- Nordström, K. (1963). Formation of Ethyl Acetate in Fermentation with Brewer's Yeast: Iv. Metabolism of Acetyl-Coenzyme A. *Journal of the Institute of Brewing*, 69(2), 142-153. doi:10.1002/j.2050-0416.1963.tb01910.x
- Nordström, K. (1964). Formation of Esters from Alcohols by Brewer's Yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 70(4), 328-336. doi:10.1002/j.2050-0416.1964.tb01999.x
- Parkkinen, E., Oura, E., & Suomalainen, H. (1978). The Esterases of Baker's Yeast. I. Activity and Localization in the Yeast Cell. *Journal of the Institute of Brewing*, 84(1), 5-8. doi:10.1002/j.2050-0416.1978.tb03830.x
- Parkkinen, E., & Suomalainen, H. (1982). Esterases of Baker's Yeast. Ii. Substrate Specificities Towards Esters Formed during Sugar Fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, 88(1), 34-38. doi:10.1002/j.2050-0416.1982.tb04067.x
- Pinal, L., Cedeno, M., Gutierrez, H., & Alvarez-Jacobs, J. (1997). Fermentation parameters influencing higher alcohol production in the tequila process. *Biotechnology Letters*, 19(1), 45-47. doi:10.1023/A:1018362919846
- Pires, E. J., Teixeira, J. A., Branyik, T., & Vicente, A. A. (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(5), 1937-1949. doi:10.1007/s00253-013-5470-0
- Rainieri, S., & Pretorius, I. (2000). *Selection and improvement of wine yeast* (Vol. 50).

- Rapp, A. (1998). Volatile flavour of wine: Correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Food / Nahrung*, 42(06), 351-363. doi:10.1002/(SICI)1521-3803(199812)42:06<351::AID-FOOD351>3.0.CO;2-2
- Rêgo, E. S. B., Rosa, C. A., Freire, A. L., Machado, A. M. d. R., Gomes, F. d. C. O., Costa, A. S. P. d., . . . Padilha, F. F. (2020). Cashew wine and volatile compounds produced during fermentation by non-Saccharomyces and Saccharomyces yeast. *LWT - Food Science and Technology*, 126, 109291. doi:<http://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109291>
- Rojas, V., Gil, J. V., Pinaga, F., & Manzanares, P. (2001). Studies on acetate ester production by non-saccharomyces wine yeasts. *Int J Food Microbiol*, 70(3), 283-289. doi:10.1016/s0168-1605(01)00552-9
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., & Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int J Food Microbiol*, 86(1-2), 169-180. doi:[http://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00290-3](http://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00290-3)
- Sadoudi, M., Tourdot-Marechal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacon, J. J., Ballester, J., . . . Alexandre, H. (2012). Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts. *Food Microbiol*, 32(2), 243-253. doi:10.1016/j.fm.2012.06.006
- Saerens, S., & Swiegers, J. H. (2017). US Patent No. US 9580675 B2.
- Saerens, S., Verstrepen, K., Van Laere, S., Voet, A., Van Dijck, P., Delvaux, F., & Thevelein, J. (2006). *The Saccharomyces cerevisiae EHT1 and EEB1 Genes Encode Novel Enzymes with Medium-chain Fatty Acid Ethyl Ester Synthesis and Hydrolysis Capacity* (Vol. 281).
- Saerens, S. M., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., & Delvaux, F. R. (2008). Parameters affecting ethyl ester production by Saccharomyces cerevisiae during fermentation. *Applied and environmental microbiology*, 74(2), 454-461. doi:10.1128/AEM.01616-07
- Saerens, S. M., Delvaux, F. R., Verstrepen, K. J., & Thevelein, J. M. (2010). Production and biological function of volatile esters in Saccharomyces cerevisiae. *Microbial Biotechnology*, 3(2), 165-177. doi:10.1111/j.1751-7915.2009.00106.x
- Salmon, J. M. (1989). Effect of Sugar Transport Inactivation in Saccharomyces cerevisiae on Sluggish and Stuck Enological Fermentations. *Applied and environmental microbiology*, 55(4), 953-958.
- Schreier, P. (1979). Flavor composition of wines: a review. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr*, 12(1), 59-111. doi:10.1080/10408397909527273
- Segura-García, L. E., Taillandier, P., Brandam, C., & Gschaedler, A. (2015). Fermentative capacity of Saccharomyces and non-Saccharomyces in agave juice and semi-synthetic medium. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 284-291. doi:<http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.005>
- Shekhawat, K., Bauer, F., & Setati, M. (2017). Impact of oxygenation on the performance of three non-Saccharomyces yeasts in co-fermentation with Saccharomyces cerevisiae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(6), 2479-2491. doi:10.1007/s00253-016-8001-y
- Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P. J., & Stanley, G. A. (2010). The ethanol stress response and ethanol tolerance of Saccharomyces cerevisiae. *J Appl Microbiol*, 109(1), 13-24. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04657.x
- 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. doi:10.1111/1574-6976.12073
- Stoupis, T., Stewart, G. G., & Stafford, R. A. (2018). Hydrodynamic Shear Damage of Brewer's Yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 61(4), 219-225. doi:10.1094/asbcj-61-0219
- Sumby, K. M., Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2010). Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*, 121(1), 1-16. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.004>
- Sun, S. Y., Gong, H. S., Jiang, X. M., & Zhao, Y. P. (2014). Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with Saccharomyces cerevisiae on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma of cherry wines. *Food Microbiol*, 44, 15-23. doi:<http://doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.007>
- Swiegers, J. H., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast Modulation of Wine Flavor. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 57, pp. 131-175): Academic Press.
- Thurston, P. A., Quain, D. E., & Tubb, R. S. (1982). Lipid-Metabolism and the Regulation of Volatile Ester Synthesis in Saccharomyces-Cerevisiae. *Journal of the Institute of Brewing*, 88(2), 90-94. doi:DOI 10.1002/j.2050-0416.1982.tb04078.x

- Torija, M. J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Rozes, N., Guillamon, J. M., & Mas, A. (2003). Effect of the nitrogen source on the fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, *20*(2), 255-258. doi:Pii S0740-0020(02)00091-6 Doi 10.1016/S0740-0020(02)00091-6
- Vallejo-Cordoba, B., Gonzalez-Cordova, A. F., & del Carmen Estrada-Montoya, M. (2004). Tequila volatile characterization and ethyl ester determination by solid phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry analysis. *J Agric Food Chem*, *52*(18), 5567-5571. doi:10.1021/jf0499119
- Van Hoek, P., Van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (1998). Effect of specific growth rate on fermentative capacity of baker's yeast. *Applied and environmental microbiology*, *64*(11), 4226-4233.
- van Rijswijk, I. M. H., Kruis, A. J., Wolkers – Rooijackers, J. C. M., Abee, T., & Smid, E. J. (2019). Acetate-ester hydrolase activity for screening of the variation in acetate ester yield of *Cyberlindnera fabianii*, *Pichia kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT*, *104*, 8-15. doi:10.1016/j.lwt.2019.01.019
- Varela, J. A., Gethins, L., Stanton, C., Ross, P., & Morrissey, J. P. (2017). Applications of *Kluyveromyces marxianus* in Biotechnology. In *Yeast Diversity in Human Welfare* (pp. 439-453).
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S., & Delvaux, F. R. (2003a). Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. *J Biosci Bioeng*, *96*(2), 110-118. doi:[https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)90112-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)90112-5)
- Verstrepen, K. J., Moonjai, N., Bauer, F. F., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Winderickx, J., . . . Delvaux, F. R. (2003b). Genetic Regulation of Ester Synthesis in Yeast: New Facts, Insights and Implications for the Brewer. *Brewing Yeast Fermentation Performance*. doi:doi:10.1002/9780470696040.ch2210.1002/9780470696040.ch22
- Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D., Vanderhaegen, B. M., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Pretorius, I. S., . . . Delvaux, F. R. (2003c). Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters. *Applied and environmental microbiology*, *69*(9), 5228-5237. doi:10.1128/aem.69.9.5228-5237.2003
- Wade, L. G. J. (2011). *Química Orgánica, Volumen 2* (Séptima Edición ed.): Person Education.
- Wang, X. D., Bohlscheid, J. C., & Edwards, C. G. (2003). Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *Journal of Applied Microbiology*, *94*(3), 349-359. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01827.x
- Whitener, M. E. B., Stanstrup, J., Carlin, S., Divol, B., Du Toit, M., & Vrhovsek, U. (2017). Effect of non-*Saccharomyces* yeasts on the volatile chemical profile of Shiraz wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *23*(2), 179-192. doi:10.1111/ajgw.12269
- Willaert, R., & Nedovic, V. A. (2006). Primary beer fermentation by immobilised yeast—a review on flavour formation and control strategies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *81*(8), 1353-1367. doi:10.1002/jctb.1582
- Yoshimoto, H., Fujiwara, D., Momma, T., Ito, C., Sone, H., Kaneko, Y., & Tamai, Y. (1998). Characterization of the ATF1 and Lg-ATF1 genes encoding alcohol acetyltransferases in the bottom fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *86*(1), 15-20. doi:Doi 10.1016/S0922-338x(98)80027-5
- Yoshimoto, H., Fujiwara, D., Momma, T., Tanaka, K., Sone, H., Nagasawa, N., & Tamai, Y. (1999). Isolation and characterization of the ATF2 gene encoding alcohol acetyltransferase II in the bottom fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Yeast*, *15*(5), 409-417. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(19990330)15:5<409::AID-YEA366>3.0.CO;2-Q
- Żyłańczyk-Duda, E., Brzezińska-Rodak, M., Klimek-Ochab, M., Duda, M., & Zerka, A. (2017). Yeast as a Versatile Tool in Biotechnology. In *Yeast - Industrial Applications* (pp. <https://www.intechopen.com/books/yeast-industrial>).

11 Anexo Tablas

Tabla A 1 Compuestos volátiles producidos por las 21 cepas de *Pichia kluyveri* después de 8 días de fermentación en medio M12 (mg / L).

Código de cepa	Acetaldehído	Isobutiral - dehído	Acetate de Etilo	Etanol*	Etil propionato	Etil butirato	1-Propanol	Isobutanol	Acetato de Isoamilo	Butanol	Alcohol Isoamílico	Etil hexanoato	Etil lactato	Etil dodecanoato
1	21.33±1.6	0.20±0.1	11.54±0.7	42.03±5.5	0.80±1.2	0.61±1.0	32.98±5.3	17.86±2.9	0±0	0.23±0.1	8.63±1.2	0.34±0.6	3.96±1.4	0.16±0.1
2	18.65±0.6	1.05±0.2	160.82±13.7	21.22±0.3	0.95±0.2	0±0	15.79±1.2	13.27±4.1	2.16±0.3	0.27±0.3	5.65±0.9	0.34±0.6	0±0	6.06±0.9
3	24.53±2.0	0.71±0.1	185.44±29.1	29.25±3.7	0.89±0.1	0±0	8.61±0.3	15.33±3.6	1.46±0.3	0.09±0.1	5.33±0.6	0.34±0.6	0±0	11.85±1.9
4	26.30±3.1	0.667±0.1	203.56±11.4	20.35±1.4	0.80±0.1	0±0	6.19±0.5	5.28±0.6	1.36±0.1	0±0	4.86±0.5	0±0	0±0	6.64±0.4
5	25.32±3.6	0.82±0.2	193.24±42.2	20.49±2.4	0.78±0.1	0±0	7.37±0.8	6.26±1.6	1.49±0.4	0.02±0.1	5.23±0.9	0±0	0±0	5.48±0.8
6	20.92±5.8	0.30±0.08	77.63±14.4	19.66±3.9	0.96±0.1	0±0	5.91±1.1	5.05±0.7	1.83±0.3	0.04±0.03	5.66±1.0	0.33±0.1	0±0	6.60±0.8
7	26.64±2.4	0.74±0.02	199.02±5.4	17.99±1.2	0.78±0.06	0±0	7.01±0.7	4.95±0.5	1.50±0.1	0±0	4.65±0.3	0±0	0±0	6.51±0.7
8	29.92±1.1	1.19±0.03	335.79±11.7	30.40±1.8	0.91±0.05	0±0	8.59±0.4	26.98±3.0	3.22±0.2	0.03±0.03	7.82±0.5	1.01±0.03	0±0	14.00±0.2
9	23.67±1.8	0.11±0.02	21.66±7.3	17.04±1.1	0.91±0.1	0±0	5.60±0.2	5.64±0.6	1.04±0.2	0.77±0.4	5.66±0.5	0±0	0±0	0.60±0.4
10	19.16±2.7	0.17±0.03	15.30±1.0	19.02±2.1	1.22±0.1	0±0	7.41±1.3	7.22±1.0	1.10±0.2	0.42±0.1	7.48±1.1	0±0	0±0	0.30±0.03
11	14.90±2.0	0.28±0.1	28.30±6.9	17.41±1.8	0.79±0.1	0±0	10.22±0.4	14.74±1.7	1.27±0.4	1.78±0.9	6.13±1.2	0±0	0±0	1.74±1.1
12	15.35±1.5	0.41±0.07	96.62±10.9	18.70±2.3	0.99±0.1	0±0	8.93±1.1	7.76±1.9	1.36±0.2	0.10±0.03	5.23±0.9	0±0	0±0	3.08±0.4
13	17.34±2.1	0.17±0.07	15.61±2.9	14.80±2.2	0.89±0.1	0±0	6.99±1.8	7.32±1.7	0.89±0.3	0.19±0.1	5.97±1.7	0±0	0±0	1.62±0.3
14	17.39±2.4	0.07±0.03	14.42±1.7	12.29±1.8	0.59±0.1	0±0	4.28±0.7	4.57±0.9	1.04±0.3	0.14±0.02	4.99±1.2	0±0	0±0	1.71±0.3
15	12.42±1.4	0.15±0.03	41.45±3.9	21.53±1.8	0.68±0.2	0±0	6.42±0.6	20.16±2.1	1.34±0.1	0.22±0.02	6.80±0.7	0±0	0±0	3.69±0.2
16	22.03±0.8	0.32±0.1	108.32±13.6	26.33±2.0	0.98±0.2	0±0	7.98±0.5	13.51±2.1	1.54±0.4	0.10±0.01	5.84±0.6	0.67±0.3	2.29±1.9	5.89±0.5
17	16.18±2.6	0.34±0.1	106.71±13.3	26.72±5.7	0.95±0.3	0±0	7.29±1.4	19.75±2.2	1.55±0.12	0.36±0.13	6.64±0.8	0.34±0.1	0±0	4.20±0.3
18	12.36±3.1	0.12±0.07	33.88±9.3	18.65±5.4	0.82±0.2	0±0	5.47±1.4	21.32±5.8	1.30±0.4	0.22±0.1	6.96±2.1	0±0	0±0	3.15±0.6
19	15.51±3.4	0.38±0.1	83.20±18.9	13.13±2.7	0.45±0.1	0±0	4.52±1.2	7.58±1.9	0.88±0.4	0.17±0.2	3.70±1.1	0.34±0.1	0±0	3.57±0.1
20	23.19±2.4	0.23±0.03	98.85±19.4	18.02±2.0	0.84±0.1	0±0	3.76±0.4	12.19±2.3	1.69±0.3	0.13±0.1	6.06±1.2	0.34±0.6	0±0	6.35±0.8
21	18.88±0.7	0.22±0.03	48.25±6.2	17.07±0.7	0.98±0.1	0±0	7.11±0.6	21.54±2.4	0.85±0.2	0.08±0.02	6.08±0.8	0±0	0±0	3.50±0.3

* Cuantificación en g / L. Los datos son medias ± desviación estándar de réplicas independientes.

Tabla A 2 Compuestos volátiles producidos por las 21 cepas de *Pichia kluyveri* luego de 8 días de fermentación en jugo de agave (mg / L).

Código de cepa	Acetaldehído	Isobutiraldehído	Acetato de Etilo	Etanol*	Etil propionato	Etil butirato	1-Propanol	Isobutanol	Acetato de Isoamilo	Butanol	Alcohol Isoamílico	Etil hexanoato	Etil lactato	Etil dodecanoate
1	27.50±9.3	0±0	13.92±1.9	46.55±4.5	0±0	1.81±0.03	50.37±4.5	22.54±3.3	0±0	0.39±0.1	82.08±12.4	0±0	0±0	0.11±0.07
2	13.75±1.1	0.05±0.02	127.80±25.3	14.27±0.7	1.99±1.7	0±0	6.81±0.3	7.06±0.3	2.27±0.2	0.05±0.01	4.80±0.3	0±0	0±0	15.62±3.2
3	10.56±2.5	0.03±0.01	102.54±25.1	11.85±3.5	2.91±0.1	0±0	5.17±1.3	6.72±2.3	1.83±0.3	0.03±0.01	4.15±1.2	0±0	0±0	16.50±7.1
4	12.78±0.9	0.18±0.1	196.86±61.6	17.37±2.5	0±0	0±0	7.09±0.9	8.27±2.1	2.73±0.9	0±0	7.26±1.79	0.33±0.6	0±0	27.77±12.8
5	10.30±0.2	0.08±0.01	113.67±2.65	9.62±1.59	2.80±0.08	0±0	5.18±0.9	5.03±0.9	1.64±0.2	0.05±0.03	4.45±0.74	0±0	0±0	6.94±0.5
6	15.53±0.9	0.11±0.02	180.46±17.8	21.34±0.4	3.15±0.04	0±0	9.45±0.2	8.71±0.7	3.20±0.6	0.02±0.01	6.33±0.39	0±0	0±0	18.27±2.9
7	6.07±3.1	0.10±0.1	151.07±96.5	9.57±3.3	0±0	0±0	6.58±3.0	5.52±2.3	2.03±0.9	0±0	4.45±1.8	0.34±0.6	0±0	10.42±3.7
8	16.40±0.7	0.17±0.01	231.37±44.5	19.80±2.2	0±0	0±0	8.82±0.5	16.98±2.8	3.29±0.5	0.02±0.01	11.72±1.7	0±0	0±0	21.84±5.3
9	16.17±3.0	0.27±0.1	92.79±21.2	23.77±4.9	0±0	0.60±0.3	13.80±2.6	19.61±3.2	1.90±0.4	0.24±0.1	11.84±1.9	0.67±0.3	8.53±3.5	1.52±0.2
10	18.20±4.1	0.26±0.1	102.38±4.5	24.27±3.3	0±0	0.60±0.3	14.51±1.1	20.46±1.8	2.44±0.4	0.25±0.04	12.73±1.5	0.67±0.6	13.28±0.9	1.67±0.2
11	16.62±4.1	0±0	95.01±4.5	14.89±3.3	0±0	1.81±1.1	9.38±1.1	20.25±1.8	1.38±0.4	0.17±0.1	7.63±1.5	1.01±0.6	11.89±0.9	4.51±0.2
12	14.80±1.1	0±0	101.99±3.2	13.10±0.6	0±0	1.81±0.1	7.65±0.7	18.08±1.4	1.68±0.2	0.17±0.01	7.02±0.3	0.67±0.6	10.97±0.4	4.50±0.4
13	14.85±1.3	0±0	85.25±11.5	12.61±0.8	0±0	1.81±0.1	7.33±0.2	17.08±0.5	1.63±0.3	0.12±0.1	6.49±0.2	0.34±0.2	11.09±0.4	3.83±0.2
14	15.17±3.4	0±0	107.84±36.1	16.62±3.5	0.61±0.4	1.21±0.9	8.44±2.0	19.97±3.9	2.29±0.4	0.14±0.04	7.43±1.7	0.33±0.2	11.16±1.0	4.40±0.8
15	17.87±3.0	0±0	151.54±21.3	24.59±0.6	0±0	0±0	16.27±0.1	20.04±0.5	2.48±0.6	0.20±0.01	7.74±0.4	0±0	8.17±1.8	4.80±0.3
16	18.98±1.4	0.08±0.02	94.23±14.2	22.08±2.5	0±0	0±0	13.06±1.16	17.75±2.3	2.10±0.3	0.14±0.03	7.85±1.0	0±0	1.99±0.9	11.35±1.9
17	17.42±2.8	0.05±0.04	165.38±30.2	20.36±2.8	0±0	0±0	14.38±2.4	18.12±3.9	1.75±0.2	0.21±0.03	6.834±1.8	0±0	7.20±6.2	5.31±1.4
18	19.01±2.3	0.01±0.01	99.74±12.5	24.16±2.7	0±0	0.61±0.4	15.96±1.9	20.46±2.8	2.16±0.3	0.21±0.03	7.57±1.0	0±0	7.30±0.6	4.74±0.7
19	6.07±1.9	0.03±0.02	280.75±65.9	10.89±2.7	0±0	0.60±0.4	6.16±1.4	18.12±3.6	1.33±1.0	0±0	4.02±1.0	0.34±0.2	3.61±2.2	4.63±1.2
20	18.40±2.7	0±0	580.29±62.2	19.04±5.7	3.13±0.2	0±0	11.38±2.3	20.04±5.0	5.03±0.7	0.11±0.02	12.35±4.8	0.67±0.4	6.67±0.9	21.00±3.4
21	13.69±1.9	0±0	443.74±40.5	14.65±1.5	0±0	1.82±0.1	5.14±0.8	35.59±2.6	2.71±0.2	0±0	7.54±0.9	0.67±0.4	15.18±1.7	8.97±0.5

* Cuantificación en g / L. Los datos son medias ± desviación estándar de réplicas independientes.

12 Anexo Imágenes

GRO3

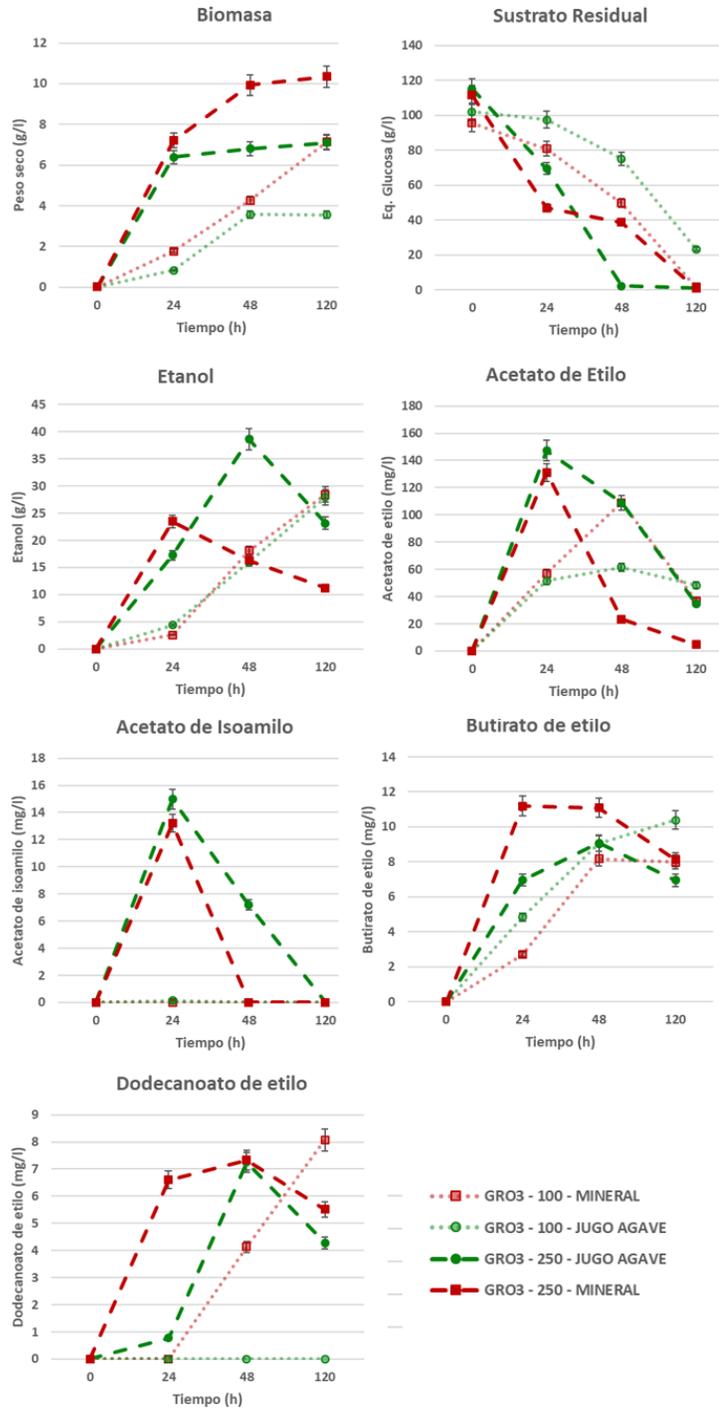


Ilustración A 1 Cinéticas de crecimiento, sustrato residual y producción de compuestos por GRO3 en el sistema de micro fermentación, con dos diferentes medios y dos diferentes velocidades de agitación 100 y 250 rpm. (Mineral=M12)

ME4a

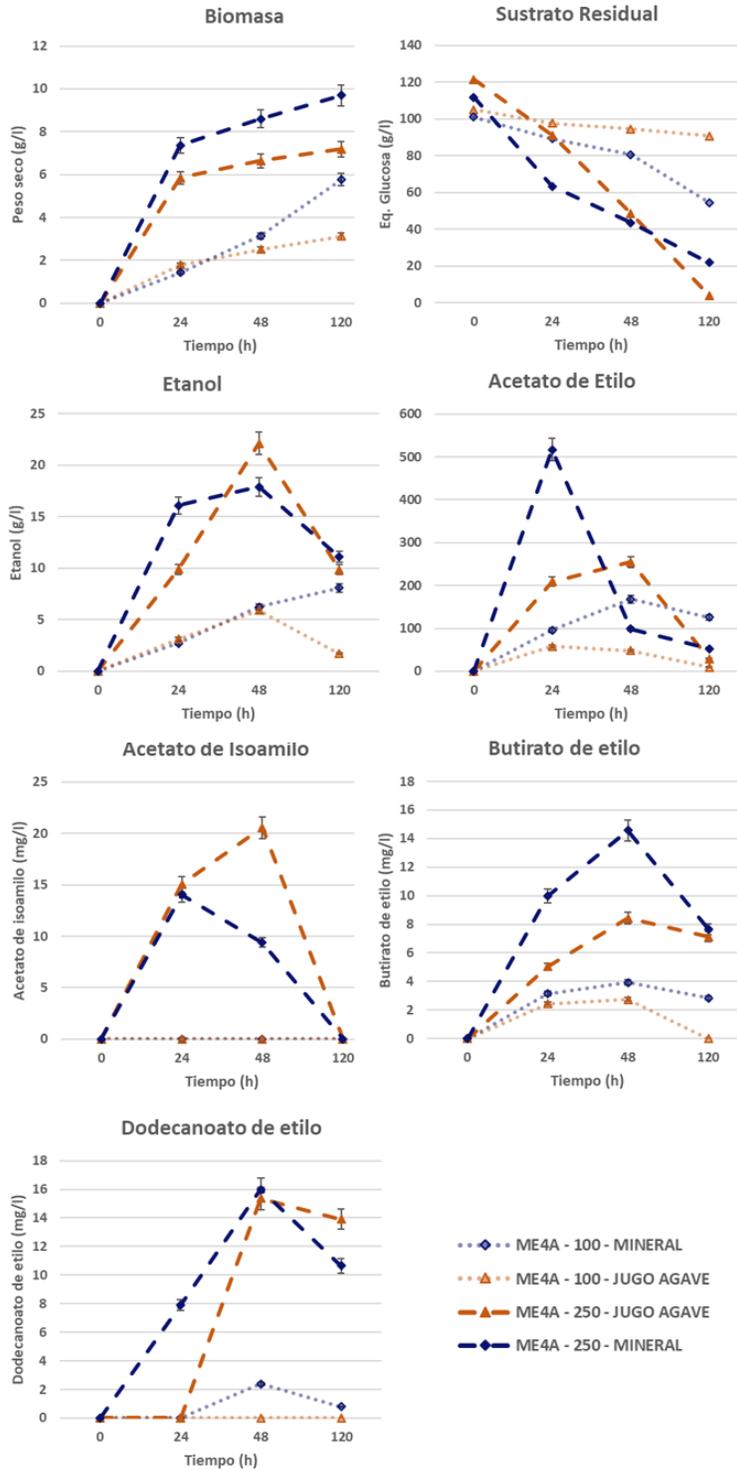


Ilustración A 2 Cinéticas de crecimiento, sustrato residual y producción de compuestos por ME4a en el sistema de micro fermentación, con dos diferentes medios y dos diferentes velocidades de agitación 100 y 250 rpm. (Mineral=M12)

GRO3

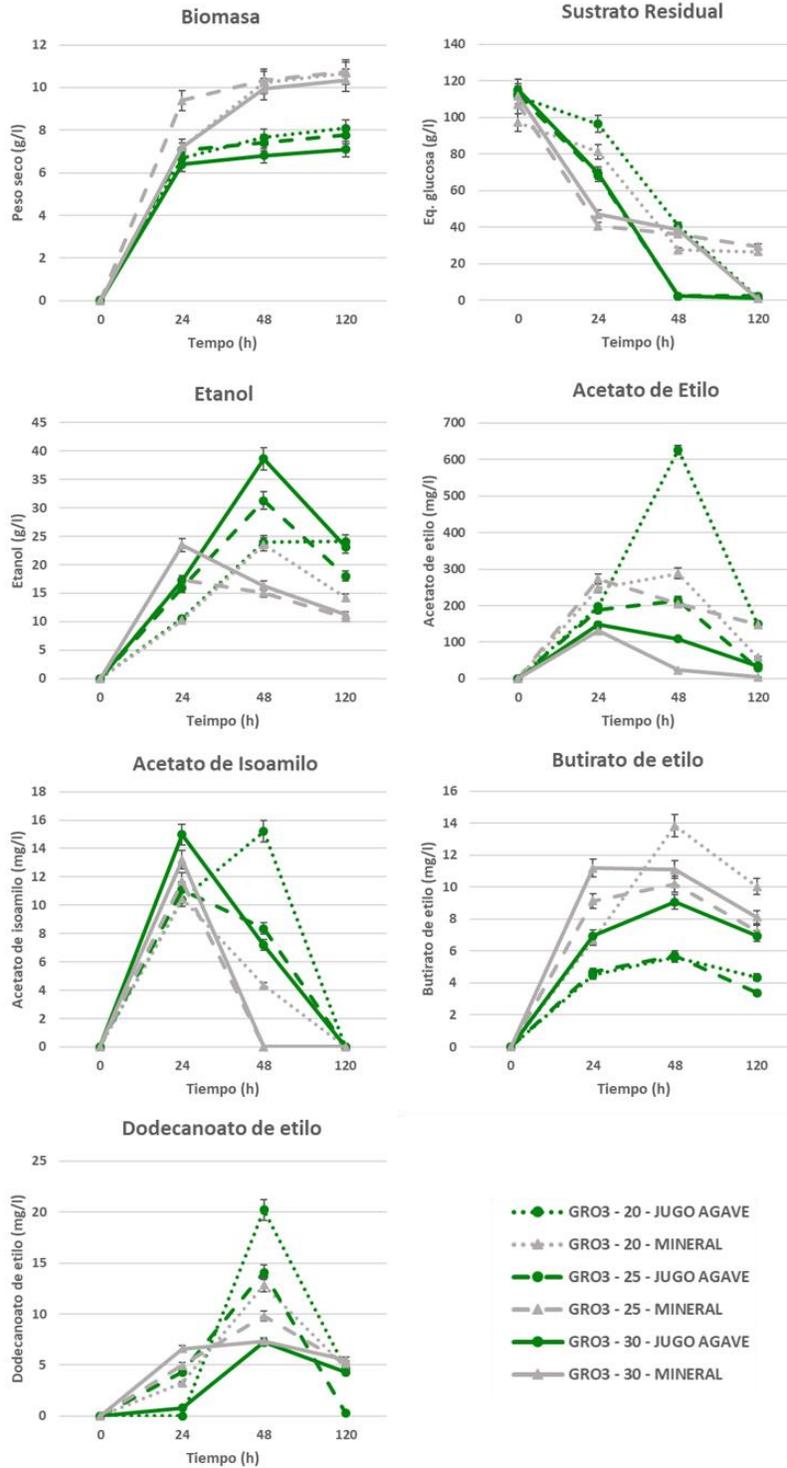


Ilustración A 3 Cinéticas de crecimiento, sustrato residual y producción de compuestos por GRO3 en el sistema de micro fermentación, con dos diferentes medios y tres diferentes temperaturas de incubación 20, 25 y 30°C. (Mineral=M12)

ME4a

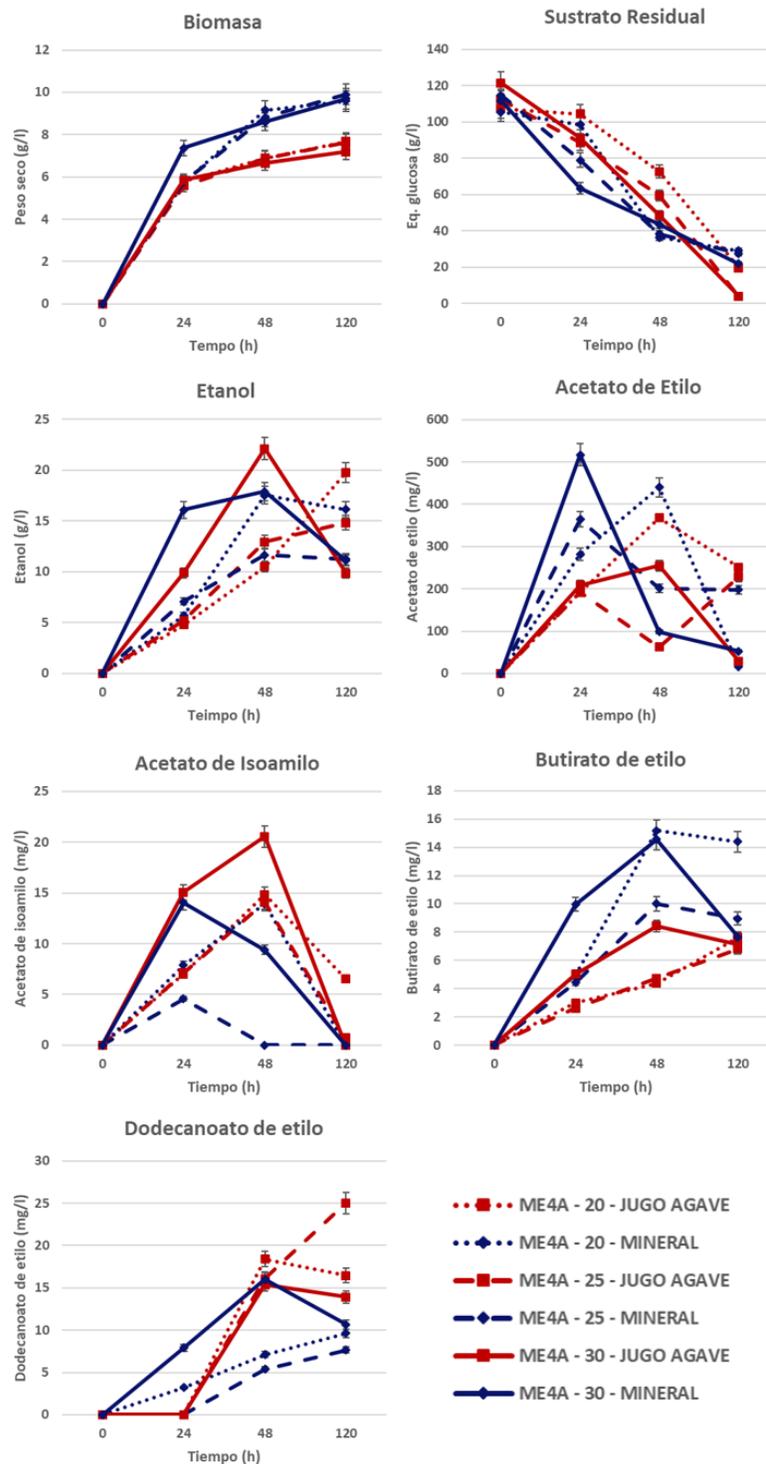


Ilustración A 4 Cinéticas de crecimiento, sustrato residual y producción de compuestos por ME4a en el sistema de micro fermentación, con dos diferentes medios y tres diferentes temperaturas de incubación 20, 25 y 30°C. (Mineral=M12)