

**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLAS DE HIDALGO**



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Cuna de héroes, crisol de pensadores

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA

“Expresión de la alcohol acetiltransferasa Atf1 en *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 y su efecto sobre la producción de compuestos volátiles”.

Tesis

Para obtener el grado en:

Maestría en Ciencias en Biología Experimental



Presenta: IBQ Alejandra Vargas Guerrero

Asesor: D. C. Jesús Campos García
Morelia Michoacán, diciembre de 2017



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS
UMSNH

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana, del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Con la asesoría del DC. Jesús Campos García.

En la realización del presente trabajo se contó con el apoyo económico del CONACYT, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a Dios por permitirme culminar esta etapa.

Al Instituto Tecnológico de Morelia por otorgarme disponibilidad de tiempo para dedicarme al proceso de cursar la maestría.

Al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH, por recibirme en sus instalaciones para la realización del presente trabajo.

Al doctor Jesús Campos por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por su apoyo y asesoría durante mi formación en la maestría.

A mis sinodales, los doctores Josué Altamirano, Mauro Martínez, Víctor Meza y Carlos Sosa por sus aportaciones para la mejora de mi trabajo de investigación y apoyo durante todo este proceso de aprendizaje.

Al equipo de trabajo del laboratorio de Biotecnología Microbiana, Lore F., Alma, Laura, Xochitl, Claudia, Sharel, Lore M., Mauricio, Wicho y Omar por su apoyo incondicional y por formar parte del mejor equipo de trabajo que me pudo haber tocado en espacio y tiempo.

A mis compañeros de generación Eli, Lupita, Belem, Beto, Richie, Ivan y Pedro porque entre todos formamos una generación muy unida sin importar que estuviéramos en diferentes laboratorios.

Y por su puesto a mi familia, mi esposo Ricardo, mis niños Iker y Abner, mis papás Emma y Boni; mis hermanos Emma y Jesús, mis cuñados Mau y Uli; mi tía Car y mi sobrina Abi; que les tocó disfrutar mis triunfos y padecer mis ausencias y mis cargas de trabajo.

INDICE

RESUMEN	IX
ABSTRACT	X
INTRODUCCIÓN	1
1. LEVADURAS	1
1.1 Generalidades.	1
1.2 Metabolismo.	2
1.3 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	2
2. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	4
2.1 Generalidades.	4
2.2 Compuestos producidos durante la fermentación alcohólica.	6
2.3 Esteres.	7
2.4 Gen <i>ATF1</i> y su regulación transcripcional.	9
3. MEZCAL	15
ANTECEDENTES	17
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
1. MATERIALES	25
1.1 Plásmidos y Cepas.	25
1.2 Medios de cultivo.	26
1.3 Antibióticos.	27
1.4 Oligonucleótidos	28
2. MÉTODOS	29
2.1 Aislamiento de ADN plasmídico de bacterias	29
2.2 Restricción con endonucleasas.	30
2.3 Aislamiento de ADN total de levaduras.	30
2.4 Electroforesis en gel de agarosa.	31
2.5 Amplificación de ADN (PCR)	32
2.6 Purificación de ADN.	33
2.7 qPCR y qRT-PCR de <i>ATF1</i>	33
2.8 Transformación de levaduras.	35
2.9 Fermentación.	35
2.10 Cinética de crecimiento.	36
2.11 Viabilidad celular.	37
2.13 Determinación de ésteres totales.	38
2.14 Análisis mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).	38
2.15 Extracción líquido-líquido de compuestos orgánicos volátiles en el medio	39
2.16 Cromatografía de gases.	40
2.17 Cuantificación de compuestos orgánicos volátiles por cromatografía.	40
2.18 Preparación de inóculos para pruebas industriales.	41
2.19 Fermentación y destilación industrial de mezcal.	41
2.20 Análisis estadístico de resultados experimentales.	42
2.21 Simulación del proceso de elaboración de mezcal.	42

RESULTADOS	43
1. Construcciones genéticas.....	43
2. Restricción plasmídica.....	44
3. Transformación de levaduras.	47
4. Selección de transformantes sobreproductoras de ésteres.	49
5. Evaluación del número de copias y la expresión del gen <i>ATF1</i>	51
6. Fermentaciones en medio YPD.....	52
7. Cinética de crecimiento.	55
8. Viabilidad celular.	57
9. pH durante la fermentación.	58
10. Consumo de glucosa – Producción de etanol.	58
11. Determinación de parámetros fermentativos.	60
12. Determinación de compuestos orgánicos volátiles en medio YPD.	61
13. Aplicación industrial de <i>Kluyveromyces marxianus</i> UMPe1 para elaboración de mezcal.....	69
DISCUSIÓN.....	79
CONCLUSIONES.....	83
REFERENCIAS	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen *Kluyveromyces marxianus*

Figura 2. Reacción global de la fermentación alcohólica.

Figura 3. Compuestos orgánicos volátiles.

Figura 4. Reacción de síntesis de ésteres.

Figura 5. Secuencia LORE en múltiples genes inducidos por hipoxia.

Figura 6. Regulación transcripcional del gen *ATF1*.

Figura 7. *Agave cupreata*.

Figura 8. Mezcal servido para su consumo.

Figura 9. Osmotolerancia, crecimiento y supervivencia de *Kluyveromyces marxianus* UMPe1.

Figura 10. Plásmido con *PGK_p-ATF1-PGK_T*.

Figura 11. Análisis Northern blot de transcritos de *ATF1* durante la fermentación.

Figura 12. Cinética de crecimiento y concentración de ésteres totales en el medio de fermentación.

Figura 13. Construcciones genéticas.

Figura 14. Diagramas de los plásmidos pJET conteniendo las construcciones

Figura 15. Extracción de plásmidos.

Figura 16. Plásmidos linearizados.

Figura 17. Cinética de crecimiento de UMPe1 para transformación genética.

Figura 18. Levaduras transformantes.

Figura 19. Reacción colorimétrica.

Figura 20. Curva de calibración acetato de etilo-DO525nm.

Figura 21. Ésteres totales.

Figura 22. Expresión de *ATF1*.

Figura 23. Levaduras en agar YPD.

Figura 24. Morfología celular.

Figura 25. Biorreactores en fermentación.

Figura 26. Correlación entre DO 600 nm y células por mililitro, para *Kluyveromyces marxianus*.

Figura 27. Cinética de crecimiento celular de *Kluyveromyces marxianus* en condiciones fermentativas.

Figura 28. Viabilidad celular.

Figura 29. pH del medio de cultivo durante la fermentación.

Figura 30. Curva de calibración glucosa-etanol por HPLC.

Figura 31. Glucosa-Etanol.

Figura 32. Reporte CG-masas.

Figura 33. Cromatograma comparativo.

Figura 34. Análisis de Correlación.

Figura 35. Cambio porcentual de ésteres en YPD.

Figura 36. Diagrama de flujo representativo del proceso de elaboración del mezcal.

Figura 37. Imágenes de elaboración del mezcal.

Figura 38. Correlación lineal de mezcales.

Figura 39. Cambio porcentual de ésteres en mezcal.

Figura 40. Catado del mezcal.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características genómicas comparativas de *K. marxianus* con otras levaduras.

Tabla 2. Ésteres en el bouquet de bebidas fermentadas.

Tabla 3. Características y diferencias entre *ATF1* y *ATF2*.

Tabla 4. Factores que afectan la producción de ésteres en fermentación alcohólica.

Tabla 5. Eficiencia de alcohol producido en fermentaciones.

Tabla 6. Plásmidos utilizados.

Tabla 7. Cepas utilizadas.

Tabla 8. Oligonucleótidos diseñados para amplificación de ADN por PCR de las construcciones TLATF y 18SATF.

Tabla 9. Oligonucleótidos e iniciadores para Q-RT-PCR.

Tabla 10. Mezcla de reacción para PCR.

Tabla 11. Mezcla de reacción para q-PCR.

Tabla 12. Números de copias del gen *ATF1* en TLATF y 18SATF.

Tabla 13. Parámetros fermentativos.

Tabla 14. Compuestos Orgánicos Volátiles YPD.

Tabla 15. Compuestos Orgánicos Volátiles en mezcal.

Tabla 16. Descriptores característicos del catado del mezcal.

RESUMEN

Kluyveromyces marxianus es una especie levaduriforme que posee la capacidad de sintetizar ésteres durante el proceso de fermentación. Los ésteres de ácidos grasos y ésteres de acetato son la principal fuente de aromas y sabores afrutados en bebidas fermentadas, siendo importantes por sus propiedades organolépticas, mejorando el bouquet de estas bebidas. El gen *ATF1* codifica para la alcohol acetil transferasa (AATasa), que es la enzima responsable de la producción de los ésteres.

posee la capacidad de sintetizar ésteres durante el proceso de fermentación. Los ésteres de ácidos grasos y ésteres de acetato son la principal fuente de aromas y sabores afrutados en bebidas fermentadas. El contenido de ésteres es en una bebida alcohólica es importante por las propiedades organolépticas que aporta a estas.

En el presente trabajo, se diseñaron modificaciones genéticas para mejorar el contenido de éster durante el proceso de fermentación con la levadura industrial *K. marxianus* UMPE-1 mediante el uso de dos estrategias: la primera, aumentando la expresión de *ATF1* en condiciones hipóxicas, insertando una copia adicional en posición tándem del activador transcripcional, el elemento de respuesta a bajo nivel de oxígeno LORE (por sus siglas en inglés), ubicado en el promotor de *ATF1*; y la segunda estrategia fue fusionado *ATF1* al gen ribosomal 18S, para incrementar la transcripción del gen desde el inicio de la fermentación.

La integración y expresión de *ATF1* en las cepas recombinantes se verificaron mediante qPCR y RT-qPCR. Los parámetros fermentativos en medio YPD no se vieron afectados, sin embargo el contenido de ésteres se incrementó significativamente. La determinación de compuestos orgánicos volátiles (COVs) por GC-MS se evaluó en medio YPD fermentado y en Mezcal. El contenido de COVs y el análisis de correlación mostraron que los ésteres se incrementaron significativamente con las levaduras recombinantes con respecto al WT, observándose mayor significancia con la inserción de *ATF1* en 18S. Los resultados indican que la sobreexpresión del gen *ATF1* en la levadura modificada 18SATF aumenta el contenido total de ésteres y mejora las propiedades organolépticas del mezcal.

Palabras clave: *Kluyveromyces marxianus* • LORE • ADNr 18S • *ATF1* • alcohol acetil transferasa • ésteres • mezcal.

ABSTRACT

Yeast such as *Kluyveromyces marxianus* possess the ability to synthesize esters during the fermentation process. Acetate and fatty acid -esters are the primary source of fruity flavours and aromas in fermented beverages, being important for their organoleptic properties, improving bouquet. The *ATF1* gene encodes for the alcohol acetyl transferase, enzyme responsible of acetate-esters.

In this work, we engineered modifications to improve ester content during the fermentation process of industrial yeast *K. marxianus* UMPe-1 by using two strategies: *ATF1* expression was increased in hypoxic conditions, inserting an extra copy of the transcriptional activator Low Oxygen Response Element (LORE), located upstream of *ATF1* in tandem position; and the second one was fused *ATF1* to 18S rDNA gene.

The *ATF1* integration and expression in the recombinant strain were verified by qPCR and RT-qPCR. Fermentative parameters in synthetic YPD medium were unaffected, but esters content was significantly increased. Volatile organic compounds (VOCs) was determined by GC-MS was evaluated in both fermented YPD medium and into Mezcal. The VOCs content distribution and correlation analysis showed that the esters were significantly increased in the recombinant yeast with respect to the WT. The results indicate that the *ATF1* gene over-expression in the engineered yeast increased the total esters content and improve the organoleptic properties of Mezcal.

Keywords: *Kluyveromyces marxianus* • LORE • 18S rDNA integration • *ATF1* • alcohol acetyltransferase • esters • mezcal.

INTRODUCCIÓN

1. LEVADURAS.

1.1 Generalidades.

Las levaduras son organismos utilizados desde la antigüedad para la elaboración de pan, cerveza y vino y siguen siendo ampliamente utilizados por la humanidad.

Las levaduras pertenecen al reino Fungi, comparten una arquitectura celular común y un ciclo celular rudimentario con eucariotas multicelulares como plantas y animales. Como todas las células eucariotas, las levaduras tienen organelos, como núcleo, mitocondrias, peroxisoma, entre otros. Las levaduras son células eucariontes que crecen por gemación tanto en su estadio sexual (diploide) como en el asexual (haploide). El proceso consiste en la formación de una pequeña gema (la célula hija) en la célula madre; posteriormente, la célula parental duplica y segrega su ADN, se divide el núcleo y éste migra hacia la célula hija y se inicia el evento de división celular. Las células haploides, solo se aparean con el tipo sexual opuesto, pudiendo ser a o α , los cuales se expresan en el locus MAT del cromosoma III, en el caso de *Saccharomyces cerevisiae* (Chang y Burgess, 2002).

Los genes de levaduras tienen pocos intrones y regiones intergénicas cortas. La redundancia genética en el genoma de la levadura es muy baja, facilitando el análisis de la función genética. El tiempo de generación es bastante corto (aproximado de 90 min), por lo que se pueden crecer y analizar grandes poblaciones de individuos; esto es crucial para direccionar varios problemas genéticos que requieren la observación de eventos como mutaciones genéticas (Chang y Burgess, 2002).

Saccharomyces cerevisiae, es la levadura más utilizada industrialmente, sobre todo en la elaboración de bebidas alcohólicas; aunque, recientemente *Kluyveromyces marxianus* comienza a tener importancia industrial.

Las levaduras tienen una tasa importante de recombinación homóloga para reparación de ADN. Esto no sólo facilita el mapeo genético sino también permite diseñar con precisión las cepas por transformación integrativa dirigida (Chang y Burgess, 2002).

1.2 Metabolismo.

La levadura es un microorganismo facultativo, ya que se puede adaptar a condiciones con presencia o ausencia de oxígeno; cuando hay presencia de oxígeno hacen respiración y cuando está ausente, entran en fase fermentativa; por lo tanto, puede realizar la fosforilación oxidativa o fosforilación a nivel sustrato para la síntesis de ATP (Ornelas-Hernández, 2000; Martínez-Guerra, 2006).

Tanto el metabolismo respiratorio como fermentativo comparten la vía de la glicólisis, como fase inicial de degradación de carbohidratos. El primer paso de esta ruta catabólica consiste en el transporte de hexosas (glucosa y fructosa) a través de la membrana plasmática, mediante difusión facilitada (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Posteriormente, la vía glicolítica Embden-Meyerhof convierte una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato, con la generación de dos moléculas de ATP, el cual en el caso de metabolismos aerobio, por medio de las reacciones del complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa se entrelaza con la serie de reacciones del ciclo del ácido cítrico a través de la acetil-CoA, provocando una oxidación completa de los carbonos para formar CO₂, H₂O y liberación de grandes cantidades de energía metabólica útil (NADH). En ausencia de oxígeno, al entrar a fermentación alcohólica, el piruvato es descarboxilado a acetaldehído, posteriormente, por alcohol deshidrogenasa se reduce el acetaldehído a alcohol (Mathews et al., 2002; Ornelas-Hernández, 2000).

1.3 *Kluyveromyces marxianus*.

K. marxianus (Fig. 1), es una levadura haploide, homotalica y hemiascomiceto. En la literatura científica, *K. marxianus* ha sido descrito con sinónimos como *K. fragilis* y *Saccharomyces kefir*. Tiene algunas ventajas sobre *Saccharomyces cerevisiae*, como su débil represión por glucosa, capacidad de asimilar lactosa, por la presencia de los genes *LAC12* y *LAC4* que codifican para lactosa permeasa y para β-galactosidasa respectivamente; y la capacidad de utilizar inulina como única fuente de carbono, por la presencia del gen *INU1*. Adicionalmente, otra de sus características que le confieren importancia industrial es su termotolerancia, ya que puede crecer a 44 °C, e incluso algunas cepas han resistido temperaturas superiores a los 50 °C; esta capacidad de fermentar varios azúcares a altas temperaturas, reduce costos de enfriamiento y también previene la contaminación por bacterias, incluyendo coliformes (Morrissey et al., 2015; Lertwattanasakul et al., 2015).

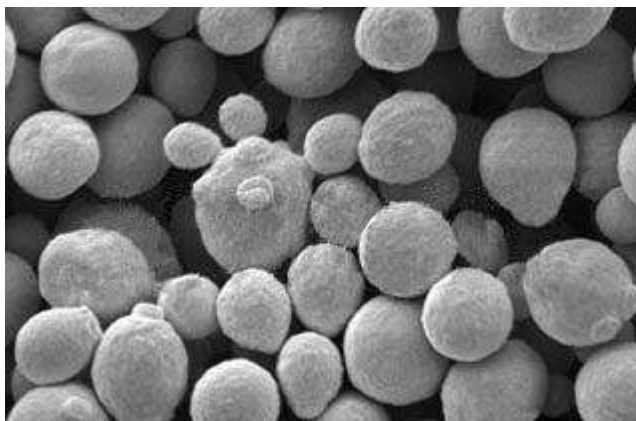


Figura 1. Imagen de *Kluyveromyces marxianus*. Visto en microscopio electrónico de barrido (diark.org)

Muchas aplicaciones biotecnológicas de *K. marxianus* se han reportado, como producción de varias enzimas incluyendo proteínas heterólogas, componentes del aroma o bioingredientes, reducción de lactosa en productos alimenticios, producción de etanol o bioremediación (Fonseca et al., 2008).

La secuencia genómica de *K. marxianus*, es de 11 Mb, tiene 8 cromosomas que varían entre 0.9 y 1.7 Mb y un genoma mitocondrial de 46 kb, con 4,952 genes predichos; mostrando a continuación en la tabla 1 el comparativo genómico de *K. marxianus* con otras levaduras (Lertwattanasakul et al., 2015).

Tabla 1. Características genómicas comparativas de *K. marxianus* con otras levaduras. Modificado de Lertwattanasakul et al., (2015).

Especie	Tamaño de genoma (Mb)	Contenido de G + C (%)	Total de genes
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	10.97	40.12	4,952
<i>Kluyveromyces lactis</i>	10.60	38.7	5,329
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12.10	38.3	5,807

Kluyveromyces marxianus UMPe1

La cepa de *K. marxianus* UMPe1 fue seleccionada entre 200 levaduras y bacterias aisladas de residuos de fermentos de agave de diversas fábricas de tequila. Fue identificada como *Kluyveromyces marxianus* por secuenciación de ADNr 26S, mostrando un 99% de identidad, de acuerdo con la herramienta BLAST de la base de datos de Gene Bank de NCBI. La cepa fue depositada en el “Microbial Type Culture Collection & Gene Bank” del Instituto de tecnología microbiana en Chandigarh, India como MTCC 5309, con la patente MX/a/2007/014445; No. Pat 271316; 2007. (López-Álvarez *et al.*, 2012).

2. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.

2.1 Generalidades.

La fermentación es una vía metabólica que usan los organismos anaerobios, tanto estrictos como facultativos, para degradar a la glucosa. Los anaerobios estrictos viven siempre en lugares en donde no hay oxígeno, porque esta molécula les es tóxica. Los organismos facultativos pueden estar tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Para que funcionen el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria, se requiere la presencia del oxígeno, que es el aceptor final de electrones, de tal manera que los organismos anaerobios carecen de esas rutas metabólicas.

Sin embargo, la degradación de la glucosa en este grupo de organismos procede, hasta llegar a piruvato, de manera idéntica a como ocurre en los organismos aerobios, o sea que usan las enzimas glucolíticas. En los organismos aerobios las moléculas de piruvato, producidas al degradar glucosa, se descarboxilan para producir acetil CoA. Las células anaerobias conducen al piruvato por otras rutas diferentes, con lo que se obtienen los productos finales de la fermentación. Hay muchos tipos de fermentación y cada una de ellos produce distintos compuestos al final de la ruta.

La fermentación alcohólica convierte una molécula de glucosa en dos moléculas de etanol y dos de CO₂ (fig. 2). Para ello, la hexosa es degradada por las enzimas de la glucólisis que la convierten en piruvato; éste es descarboxilado por la enzima piruvato descarboxilasa, para producir acetaldehído y CO₂; finalmente, la alcohol

deshidrogenasa convierte al acetaldehído en etanol, en una reacción que utiliza una molécula de NADH. Por lo tanto, en este tipo de fermentación el receptor final de electrones es el acetaldehído. Hay varios microorganismos que efectúan esta vía metabólica. Por medio de estas reacciones se obtienen todos los tipos de bebidas alcohólicas.

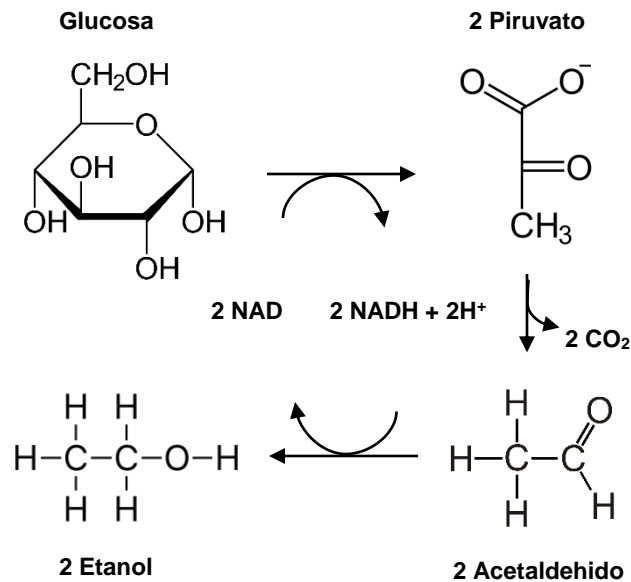


Figura 2. Reacción global de la fermentación alcohólica. Por glucólisis se descompone la glucosa en dos moléculas de piruvato, el cual es descarboxilado para producir acetaldehído y CO₂, para finalmente obtener alcohol.

En la elaboración de bebidas fermentadas, se han encontrado tanto *Saccharomyces cerevisiae* como *Kluyveromyces marxianus* de forma silvestre; en donde no solo se encargan de la producción de alcohol, sino también de los componentes de aroma y sabor, formados de aminoácidos, como alcoholes superiores y su asociación a ésteres y ácidos volátiles. La síntesis de ésteres volátiles por levaduras es de gran interés industrial, ya que constituyen uno de los más importantes componentes del aroma de bebidas fermentadas (Mason and Dufour, 2000; Styger et al., 2011).

2.2 Compuestos producidos durante la fermentación alcohólica.

Algunos de los mayores componentes del aroma producidos por levaduras durante la fermentación alcohólica, se muestran en el siguiente diagrama (fig. 3), incluyendo los ésteres de acetato y los etil ésteres de ácidos grasos (Styger et al., 2011).

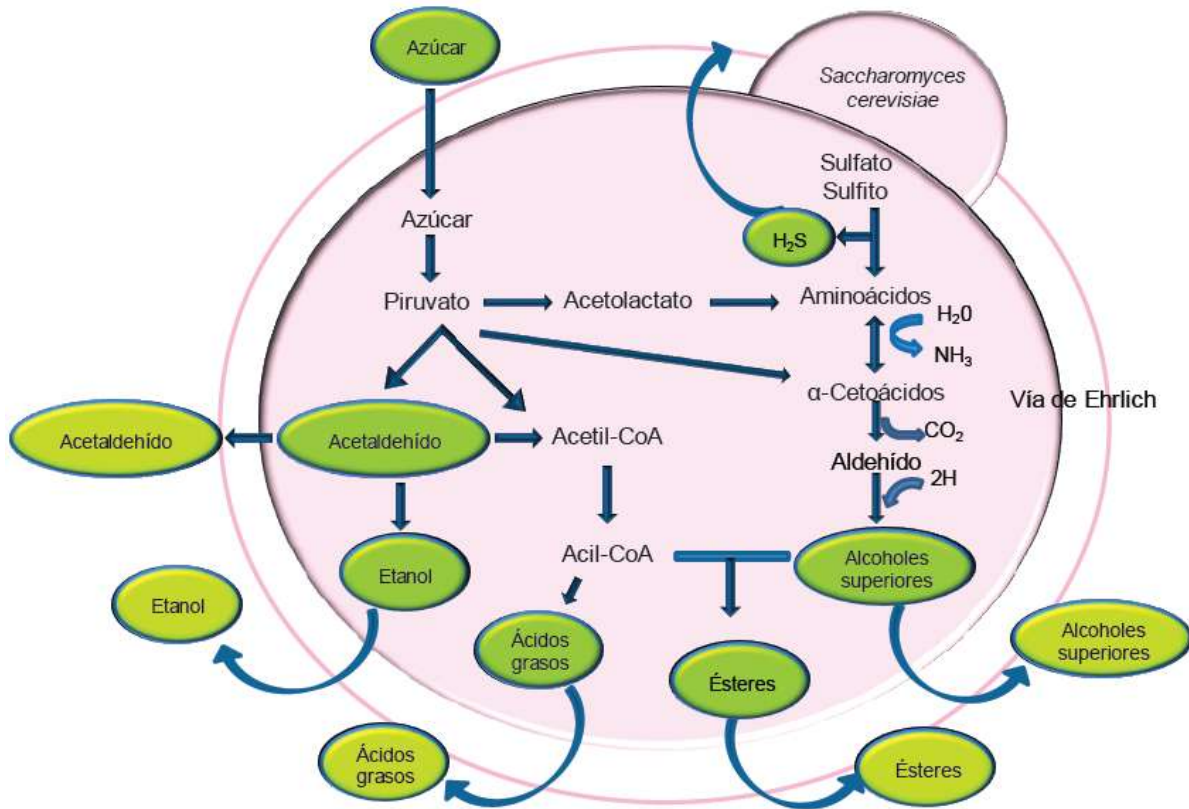


Figura 3. Compuestos orgánicos volátiles. Esquema que muestra la formación de algunos de los principales COVs generados por levaduras. Modificado de Swiegers y Pretorius (2005).

2.3 Esteres.

La síntesis de ésteres por levaduras en la fermentación es de gran interés industrial, ya que la presencia de estos compuestos determina el aroma frutal de las bebidas fermentadas (*Mason y Dufour, 2000*).

Un grupo de ésteres presentes en las bebidas alcohólicas, son los ésteres de acetato, como etil-acetato, isoamil-acetato o propil-acetato; que son el resultado de la reacción de transferencia de un grupo acetato de la acetil-CoA al grupo hidroxilo de un alcohol, generando el éster (fig. 4), que dependerá del tipo de alcohol utilizado como sustrato; pudiendo ser alcoholes superiores formados de la degradación de aminoácidos, carbohidratos y lípidos. Otro grupo de ésteres, son los etil ésteres de ácidos grasos de cadena media, como etil-butanoato, etil-hexanoato o etil-octanoato (*Styger et al., 2011; Morrisey et al., 2015*). Los ésteres dan características de aroma y sabor agradables en las bebidas, con ciertos descriptivos frutales y dulces, que dependiendo del tipo de bebida tendrán cierto umbral de detección, como se indica en la tabla 2 (*Saerens et al., 2010; Lambrechts y Pretorius, 2000*).

Tabla 2. Ésteres en el bouquet de bebidas fermentadas.

Compuesto	Umbral (mg/L)	Descripción de olor
Etil-acetato	7.5-30	Frutal
Isoamil-acetato	0.03-1.2	Plátano, Pera
Feniletil-acetato	0.25-3.8	Flores, Miel
Isobutil-acetato	0.01-1.6	Plátano, Frutal
Hexil-acetato	0.7-0.9	Dulce, Frutal.
Etil-hexanoato	0.05-0.23	Frutal, Manzana, Dulce
Etil-octanoato	0.02-0.9	Manzana, Anís

Descriptivos sensoriales de ésteres en bebidas alcohólicas, con los rangos de umbral de detección que varía de acuerdo al tipo de bebida. Modificado de *Saerens et al., (2010)* y *Lambrechts y Pretorius, (2000)*.

Los niveles de ésteres producidos bajo cualquier condición particular de crecimiento, dependerá de tres parámetros: la disponibilidad del alcohol como sustrato, los niveles de acetil-CoA en el citoplasma, y la expresión o actividad de las alcohol acetiltransferasas (fig. 4) (Morrisey et al, 2015).

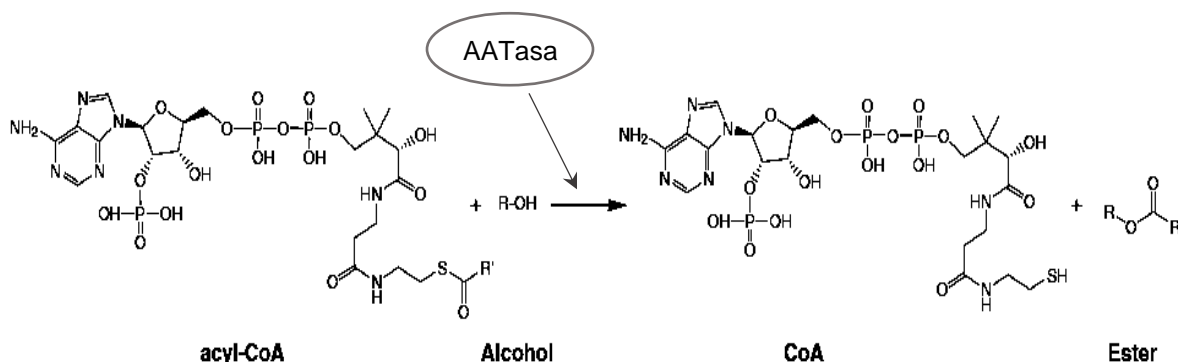


Figura 4. Reacción de síntesis de ésteres. Esquema representativo de la reacción de síntesis de ésteres, donde interviene la AATasa como enzima catalizadora de la reacción. Modificado de Sumbly et al., (2010).

Al inicio de la fermentación, la síntesis de ésteres es muy lenta, por la alta demanda metabólica de acetil-CoA para el crecimiento celular. Durante esta fase de la curva de fermentación el oxígeno y la acetil-CoA son rápidamente consumidos para sustentar la producción de ácidos grasos insaturados y esteroides. Inmediatamente después se estabiliza el equilibrio entre consumo de Acetil-CoA para ácidos grasos y la producción de ésteres; que representa el inicio de la inducción de producción de ésteres y que se incrementa cuando la síntesis de ácidos grasos se frena y hay un pico en los niveles de Acetil-CoA, permitiendo una mayor producción de ésteres (Lilly et al., 2000).

Dado que el etil-acetato no es derivado del metabolismo de aminoácidos, porque su sustrato no fue un alcohol superior sino el etanol, las condiciones que favorecen la acumulación de etanol, favorecen la producción de etil-acetato; por lo que la actividad del ciclo de ácidos tricarboxílicos (ATC) tiene un efecto en la formación de éste. Resultados demuestran que una limitación de Fe y Cu mejora la producción de etil-acetato; ya que ciertas enzimas en el ciclo de ATC son dependientes de Fe (aconitasa, succinato deshidrogenasa) o de Cu (cadena transportadora de electrones, complejo IV) y limitar estos elementos perjudica el ciclo de ATC.

Adicionalmente el Fe también se requiere para el reciclaje del NADH a NAD⁺ en la mitocondria. Este efecto dual del límite de Fe reduce el flujo de Acetil-CoA en el ciclo de TCA, incrementando de esta manera su disponibilidad en el citoplasma (*Looser et al., 2012*).

La formación de ésteres difiere ampliamente entre cepas de levadura y otros factores externos, como: temperatura, disponibilidad de nutrientes, pH, niveles de ácidos grasos insaturados y niveles de oxígeno (*Rojas et al., 2003*). Su síntesis ha sido ampliamente estudiada en *S. cerevisiae* durante la fermentación; las enzimas que se han identificado formando parte de la síntesis de los ésteres de acetato, son las alcohol acetiltransferasas (AATasa), localizadas en partículas lipídicas, con una masa molecular estimada de 57 ± 3 kDa, mostrando una actividad máxima alrededor de un pH de 8.0 y con un valor aparente de K_m de entre 25 y 45 μM, dependiendo del tipo de éster producido (*Malcorps and Dufour, 1992*).

2.4 Gen *ATF1* y su regulación transcripcional.

Los genes que codifican las AATasas son *ATF1* y *ATF2* (*Lilly et al., 2000*); algunas de sus características se muestran en la tabla 3; además, se conoce una tercer enzima involucrada en la producción de etil-acetato e isoamil-acetato, es una AATasa que se encuentra únicamente en las levaduras lager (Lg-Atf1p) y es homóloga a Atf1p (*Yoshimoto et al., 1998*); mientras que la formación de etil ésteres de ácidos grasos de cadena media, ha sido atribuida a dos enzimas, acil-CoA: etanol O-aciltransferasas: *EEB1* y *EHT1* (*Saerens et al., 2006*).

Tabla 3. Características y diferencias entre *ATF1* y *ATF2*. (*Mason y Dufour, 2000*).

GEN	<i>ATF1</i>	<i>ATF2</i>
Fuente	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Cromosoma	XV	VII
Tamaño ORF (pb)	1575	1605
Identidad aminoácidos	100%	36.9%
Índice de hidrofobicidad	-0.34	-0.36
Punto Isoeléctrico predicho	6.94	5.77
Masa predicha (kDa)	61.1	61.9

Una característica común en Atf1p, LgAtf1p y Atf2p es un heptapéptido (¹⁶⁴WRLICLP) que es completamente conservado. Si este péptido constituye parte del sitio activo es posible que el residuo cisteína sea crítico para la actividad enzimática (*Mason y Dufour, 2000*).

La inhibición de la actividad AATasa por cantidades traza de oxígeno y/o ácidos grasos insaturados, fue reportado muchos años antes a la clonación del gen *ATF1* (*Yoshioka et al., 1981*). La represión de la síntesis enzimática como medio de regulación de la síntesis de ésteres, fue primeramente propuesto por *Malcorps et al. en 1992* y apoyado por estudios utilizando ácido linoléico para suprimir la actividad AATasa (*Mason y Dufour, 2000*).

Un análisis southern blot del ADN genómico de *S. cerevisiae* detecta solo una copia del gen *ATF1* por genoma haploide (*Fujii et al., 1994*). Usando la mutante nula *atf1Δ*, *Fujii et al.* demuestran que la actividad remanente de alcohol acetiltransferasa (AATasa) en la cepa que usaron no fue afectada por aireación o por ácidos grasos insaturados, sugiriendo que Atf1p fue responsable por la actividad AATasa reprimible por oxígeno y ácidos grasos insaturados.

Un análisis de la región promotora río arriba del ORF de *ATF1*, ha establecido que ésta regulación de la expresión fue mediado principalmente a nivel transcripcional. Reemplazando al promotor natural del gen *ATF1* con el promotor constitutivo del gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenada (pGAPDH), libera la expresión de la actividad IATasa (Isoamil Alcohol acetiltransferasa) de la represión por oxígeno y/o ácidos grasos insaturados (*Mason y Dufour, 2000*).

Díaz-Maroto et al., (2005), hacen una evaluación de la cantidad de etil ésteres de ácidos grasos de cadena corta ramificada durante el añejamiento de bebidas fermentadas como el vino Muscadet y Sylvaner; en los cuales se ve incrementada la cantidad de ésteres en vinos añejos, respecto a vinos jóvenes, dando la formación de nuevos aromas; lo cual es consistente con los datos obtenidos por *Kotséridis (1999)*, con el vino Merlot y el impacto de la cantidad de ésteres en el aroma del mismo durante su añejamiento.

La vía de señalización de Ras/cAMP/PKA está involucrada en la inducción de *ATF1* por glucosa; el cual fue probado por *Verstrepen et al.* (2003), cuyos resultados indican que hay una fuerte inducción por glucosa y no así por maltosa la cual fue abolida en una cepa con PKA atenuado, mientras que en una con PKA sobreactivado, la transcripción basal de *ATF1* fue más alta, y la inducción por glucosa más rápida que la cepa silvestre; lo que indica que *ATF1* es un nuevo blanco para esta vía de señalización.

Adicionalmente, la región promotora de *ATF1*, contiene algunos elementos de respuesta a estrés global (STREs), como choque térmico, estrés osmótico, estrés oxidativo, pH ácidos, requerimientos de carbono y nitrógeno agentes de daño al ADN; alrededor de 650pb río arriba del inicio de la transcripción, lo que sugiere que *ATF1* también puede estar controlado por estrés fisiológico (*Verstrepen et al.*, 2003).

Un análisis Southern del ADN genómico de *S. cerevisiae* detectó solo una copia de *ATF1* por genoma haploide de ésta levadura; pero existen otros genes *ATF2* y *Lg-ATF1* los cuales tienen patrones similares de expresión, debido a su homología en las secuencias río arriba del gen, además de que tanto *ATF1*, cómo *Lg-ATF1* contienen el elemento cis de activación transcripcional LORE en su región promotora (-79 a -70 y -20 a -11 respectivamente) (*Verstrepen et al.*, 2003).

En la regulación de *ATF1* por oxígeno el principal responsable es el llamado “Elemento de respuesta a bajo oxígeno” LORE (por sus siglas en inglés) ubicado en la secuencia promotora del gen *ATF1*. Éste elemento promotor es inducido bajo condiciones hipóxicas. La inducción mediada por LORE no ha sido completamente caracterizada, pero ha sido demostrado que Spt23p y Mga2p, dos proteínas de membrana del retículo endoplásmico son requeridas para este proceso.

La supresión de la proteína cinasa Sch9p, la cual está involucrada en la señalización del nitrógeno, causa una reducción en la expresión de *ATF1*. La posible influencia de los componentes nitrogenados en la expresión de *ATF1*, concuerda con el incremento en la producción de ésteres durante fermentaciones en medio rico en nitrógeno (*Verstrepen et al.*, 2003). Mga2p es un factor transcripcional que interactúa directamente con el elemento LORE, ya que se probó que es un componente del complejo de unión a LORE inducido por hipoxia, (*Jiang et al.*, 2001) el cual se regula mediante una vía de procesamiento dependiente de ubiquitina/proteosoma, mediada por RPS5, para garantizar una respuesta celular rápida (*Hoppe et al.*, 2000).

El elemento LORE fue detectado inicialmente río arriba del gen *OLE1* que codifica para $\Delta 9$ desaturasa de ácidos grasos, pero no es el único gen en el que se ha encontrado; en la figura 5 se muestra un listado de los genes donde se ha identificado este elemento regulador, resaltando la secuencia consenso del núcleo del elemento.

	from		
	ATG	Core	
OLE1	-347	GAACACTCAACAAACCTTAT	-328
ATF1	-83	GCCAACcCAACAAAATTCG	-64
TIR1	-344	AGGAACcCAACAATACAATA	-325
SUT1	-377	GGTTttTCAACAATACGTTT	-358
TRX2	-838	TGGCACTCAACAAGATTGAC	-819
FKH1	-391	AACTACTCAACAATAGAAGG	-372
FTR1	-524	ACGTtCTCAACAATTTTTCG	-505
RPL35A	-353	TGTTACTCAACAAATAATCT	-334
MET22	-231	AACAACCTCAACAATAGCATA	-212

Figura 5. Secuencia LORE en múltiples genes inducidos por hipoxia. Indica el nombre del gen, la posición de la secuencia LORE río arriba del inicio de la transcripción y la secuencia con la región consenso sombreada, indicando con minúsculas las variantes de la secuencia (*Vasconcelles et al., 2001*).

La compleja regulación del gen *ATF1* (fig. 6), indica que la síntesis de ésteres volátiles no se trata de un proceso futil, sino que tiene una función específica que solo se requiere bajo ciertas condiciones. Es posible por ejemplo, que ciertos ésteres de ácidos grasos de cadena larga puedan servir como análogos de ácidos grasos, ya que la pequeña cadena lateral en el largo núcleo alquilo de éstos ésteres, puede alterar la estructura de la membrana de forma similar al doble enlace de los ácidos grasos insaturados; de esta forma, ciertos ésteres pueden ayudar a mantener el grado de fluidez de la membrana, bajo condiciones hipóxicas (*Verstrepen et al, 2003*).

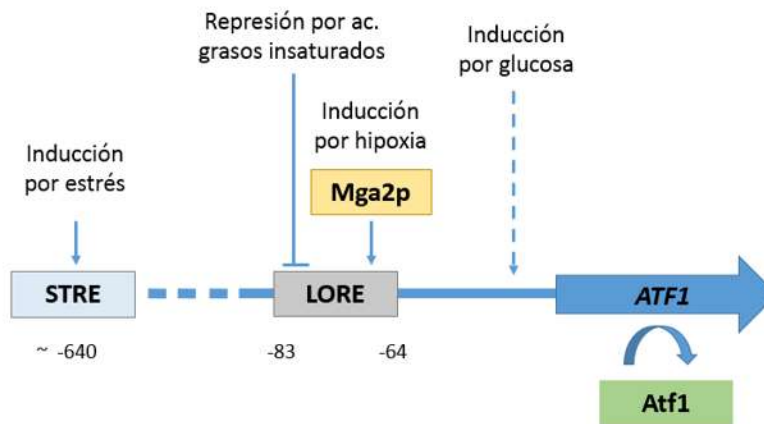


Figura 6. Regulación transcripcional del gen *ATF1*. Se representan las vías regulatorias dependientes de factores globales de estrés, ácidos grasos insaturados, oxígeno y glucosa, responsables del control de la expresión del gen *ATF1* (Mason y Dufour, 2000; Jiang et al., 2001; Vasconcelles et al., 2001; Verstrepen et al., 2003).

Además de varios factores que afectan directamente la transcripción del gen *ATF1*, existen factores adicionales previamente descritos; todos éstos se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Factores que afectan la producción de ésteres en fermentación alcohólica.

Factor	Descripción	Referencia
Biomasa y fase de crecimiento	En la fase estacionaria de crecimiento celular, la acetil-CoA está disponible para producción de ésteres, por freno en síntesis de ácidos grasos.	<i>Lilly et al., 2000</i>
Fe y Cu	La limitación de éstos elementos mejora producción de etil acetato por enzimas del ciclo de ATC dependientes de Fe y Cu, que al perjudicarlo favorecen la producción de etanol.	<i>Loser et al., 2012</i>
pH ácido, estrés osmótico, estrés oxidativo y alta temperatura	Estos factores en el medio de cultivo favorecen la producción de ésteres por elementos de respuesta a estrés global STRE localizados ~600pb río arriba de <i>ATF1</i> .	<i>Mason and Dufour, 2000</i>
Disponibilidad de nitrógeno	La vía de señalización del nitrógeno está afectada por la proteína cinasa Sch9p, que en ausencia reduce la expresión de <i>ATF1</i> .	<i>Verstrepen et al., 2003</i>
Ácidos grasos insaturados	La presencia de ácidos grasos insaturados en el medio, inhiben la actividad de la AATasa	<i>Malcorps et al., 1992</i>
Añejamiento	La cantidad de etil ésteres de ácidos grasos de cadena corta incrementan durante el añejamiento de bebidas fermentadas no destiladas.	<i>Díaz-Maroto et al., 2005</i>
Glucosa	<i>ATF1</i> se induce por glucosa a través de la vía de señalización Ras/cAMP/PKA	<i>Verstrepen et al., 2003</i>
Hipoxia	El bajo nivel de oxígeno activa al elemento LORE, promoviendo la transcripción de <i>ATF1</i> .	<i>Vasconcelles et al., 2001</i>

3. MEZCAL

La palabra mezcal proviene del náhuatl *metl* que significa “maguey o agave” (Fig. 7) e *ixcalli* que significa “cocido”; es una bebida alcohólica espirituosa (Fig. 8) obtenida por destilación y rectificación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras del agave, previamente cocidas y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras, ya sea con fermentación espontánea por levaduras silvestres o por inoculación por levadura seleccionada, siendo susceptible de ser enriquecido, para el caso del Mezcal tipo II, con hasta en 20% de otros carbohidratos en la preparación de dichos mostos, siempre y cuando no se eliminen los componentes que le dan las características a este producto, no permitiéndose las mezclas en frío (*Elis-Peral, 2015; NOM-070-SCFI-2016*).



Figura 7. *Agave cupreata*. Principal tipo de agave utilizado para la producción de mezcal en Michoacán. (*Mezcalesdeleyenda.com*).

El mezcal es un líquido de olor y sabor suigeneris de acuerdo a su tipo. Es incoloro o ligeramente amarillento cuando es reposado o añejado en recipientes de madera de roble blanco o encino, o cuando se aboque sin reposarlo o añejarlo (*NOM-070-SCFI-2016*).



Figura 8. Mezcal servido para su consumo. (*Food and Travel México, 2017*).

El mezcal cuenta con Denominación de Origen, la cual abarca: Michoacán, Oaxaca, Guerrero, Guanajuato, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí y Tamaulipas. Algunas de las variedades más famosas de agaves mezcaleros en Michoacán son: Cupreata, Inaequidens y Espadín. La NOM 70 reconoce más de 20 variedades de agave para producir el mezcal y cada variedad tiene un sabor diferente (*Elis-Peral, 2015; Sánchez-Ibáñez, 2017*)

El maestro mezcalero es quien aporta una personalidad única a su mezcal. El espíritu de esta bebida es la concentración alcohólica lograda a través del proceso de destilación; además influyen el tipo de agave, la variedad, la zona donde creció y, sobre todo, que el agave haya cumplido su ciclo de vida (de 7 a 10 años). Por eso cada mezcal es una obra de arte que lleva pasión y amor del maestro mezcalero (*Sánchez-Ibáñez 2017*)

Puede decirse que un mezcal es equilibrado cuando están presentes el sabor dulce, ácido y amargo del agave sin ser predominante ninguno de los dos últimos. Si la bebida tiene paso por barrica no deben dominar las notas de roble ni tener un ahumado excesivo, pues ocultaría los sabores y aromas naturales del agave, entre los que se encuentran: cítricos, notas frutales, herbales, raíz, tierra y el ahumado de la cocción (*Elis-Peral, 2015*).

El perfil organoléptico del mezcal, depende en gran medida de la materia prima usada pero es influenciado por el suelo, clima, cultivo de agave y otros factores del proceso durante la cocción, fermentación y destilación (*De León-Rodríguez et al, 2008*).

ANTECEDENTES

Estudios comparativos en fermentaciones de mosto de agave con *Saccharomyces cerevisiae* Pan1 y UM5 (levadura comúnmente usada en producción de tequila) y *Kluyveromyces marxianus* UMPe1, muestran que en pruebas de osmotolerancia con medio YPD modificado con jarabe de agave de alta fructosa UMPe1 muestra un comportamiento similar a UM5, soportando concentraciones de azúcares arriba de 22% (m/v), mientras que Pan1 se inhibe a una concentración de 13 % (m/v) (Fig. 9A).

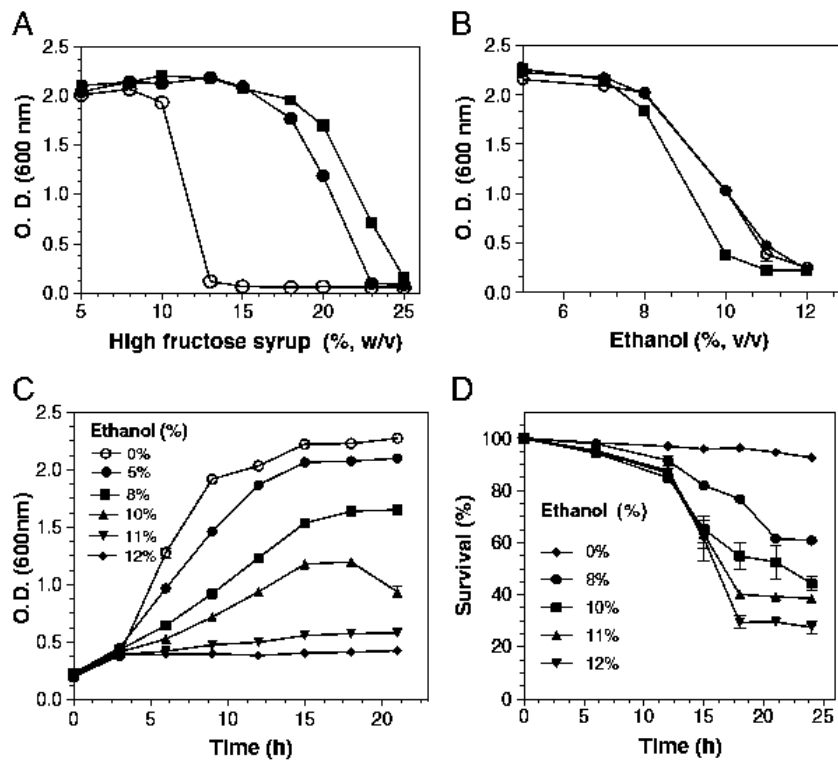


Figura 9. Osmotolerancia, crecimiento y supervivencia de *Kluyveromyces marxianus* UMPe1. Cultivos crecidos en medio YPD modificado, fueron incubados a 30 °C con agitación ligera, y A) diferentes concentraciones de agave de alta fructosa (contiene 9.4 % de glucosa, 88.6 % de fructosa y 2 % de otros azúcares), obtenidos por procesamiento de piñas de *Agave tequilana* Weber. (B-D) YPD con diferentes concentraciones de etanol, como se indica (v/v). En A) y B) se muestra Pan1 en círculos abiertos, UM5 en cuadros cerrados y UMPe1 en círculos cerrados. La biomasa es medida en DO 600nm. D) La supervivencia fue medida con tinción con azul de tripano y conteo en cámara de Neubauer. Tomado de (López-Álvarez *et al.*, 2012).

Por otra parte, a concentraciones crecientes de etanol en el medio, tanto UMPe1 como Pan1 se inhiben a 11 % (v/v), mientras que UM5 lo hace a 10 % (v/v). Estos resultados indican que la tolerancia al etanol fue más alta en UMPe1 que en UM5, siendo que ambas fueron aisladas del mismo residuo (Fig. 9B). Para evaluar la habilidad de UMPe1 para contrarrestar el efecto tóxico del etanol bajo condiciones de fermentación, se realizaron ensayos de crecimiento y sobrevivencia con etanol; mostrando que UMPe1, tiene la habilidad de crecer eficientemente en medio YPD con 10 % de etanol (Fig. 9C) y puede soportar concentraciones entre 8 y 10 % por 20 horas mostrando un 50 % de sobrevivencia (Fig. 9D).

También se hizo análisis comparativo de rendimiento alcohólico en fermentaciones por lotes tanto a nivel laboratorio de las cepas de *S. cerevisiae* UM5 y Pan1 y de *K. marxianus* UMPe1, como a nivel industrial de estas últimas dos; obteniendo los resultados mostrados en la tabla 5:

Tabla 5. Eficiencia de alcohol producido en fermentaciones.

Cepa de levadura	Eficiencia de alcohol producido (%)				
	Matraz (YPD)		Matraz (Mosto)	P. Piloto (Mosto)	P. Ind. (Mosto)
	160 g·L ⁻¹	220 g·L ⁻¹	160 g·L ⁻¹	160 g·L ⁻¹	140 g·L ⁻¹
<i>K. marxianus</i> UMPe1	98	81	92	94	96
<i>S. cerevisiae</i> UM5	85	65	84	85	ND
<i>S. cerevisiae</i> Pan1	86	66	82	76	70

Se hacen fermentaciones por lotes a nivel laboratorio como industrial, con diferentes concentraciones de azúcares, en medio YPD, y en mosto de agave.

Adicionalmente, se hizo un análisis de compuestos volátiles mayoritarios y minoritarios, donde el contenido de alcohol en el tequila blanco obtenido de UMPe1 (n-propanol, isobutanol y alcohol isoamílico) fue superior al obtenido con Pan1. Se hizo un análisis comparativo de compuestos minoritarios volátiles en el producto destilado obtenido con UMPe1 y Pan1; donde los resultados indican que la abundancia y el número de componentes volátiles minoritarios en general fue mejor en el producto obtenido de UMPe1 que de Pan1.

Los resultados sugieren que la levadura *K. marxianus* UMPe1 puede ser usada para fermentación en mostos de agave con cerca de 220 g·L⁻¹ de azúcares fermentables sin efectos inhibitorios por contenido de azúcar y toxicidad por etanol. Además de que estas propiedades pueden mejorar la productividad y el rendimiento económico

en la producción de tequila o mezcal; Además de que el producto destilado de UMPe1 puede ser una bebida rica en componentes volátiles, lo que hace que la calidad organoléptica sea mejor que las bebidas fermentadas con Pan1. (López-Álvarez *et al*, 2012).

Por otro lado, previamente en el año 2000, *Lilly et al.*, insertaron una copia modificada del gen *ATF1*, bajo el control de un promotor y terminador constitutivo del gen fosfoglicerato cinasa (*PGK1*) como se muestra en la figura 10, en tres cepas comerciales de vino *Saccharomyces cerevisiae* VIN7, VIN13 y WE228, utilizadas para en elaboración de vino blanco.

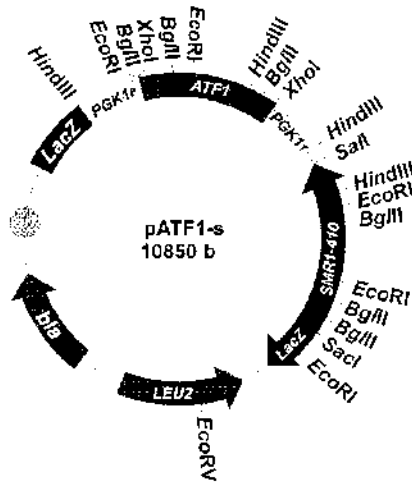


Figura 10. Plásmido con PGK_p -*ATF1*- PGK_T . Mapa de restricción del plásmido pATF1-s, insertando el gen *ATF1* en medio del gen *PGK*, con su respectivo promotor y terminador. Tomado de (*Lilly et al.*, 2000).

Verificando la expresión de *ATF1* con Northern blot, usando un control y las cepas industriales transformadas, donde se observan bandas en las transformantes en todos los tiempos de muestreo, mientras que en la silvestre solo se detecta al día 7 de fermentación. Lo que muestra que la expresión del gen *ATF1* bajo el promotor constitutivo fue alta a través de toda la fermentación, mientras que en la cepa silvestre solo se elevó en las etapas finales de la fermentación (fig. 11).

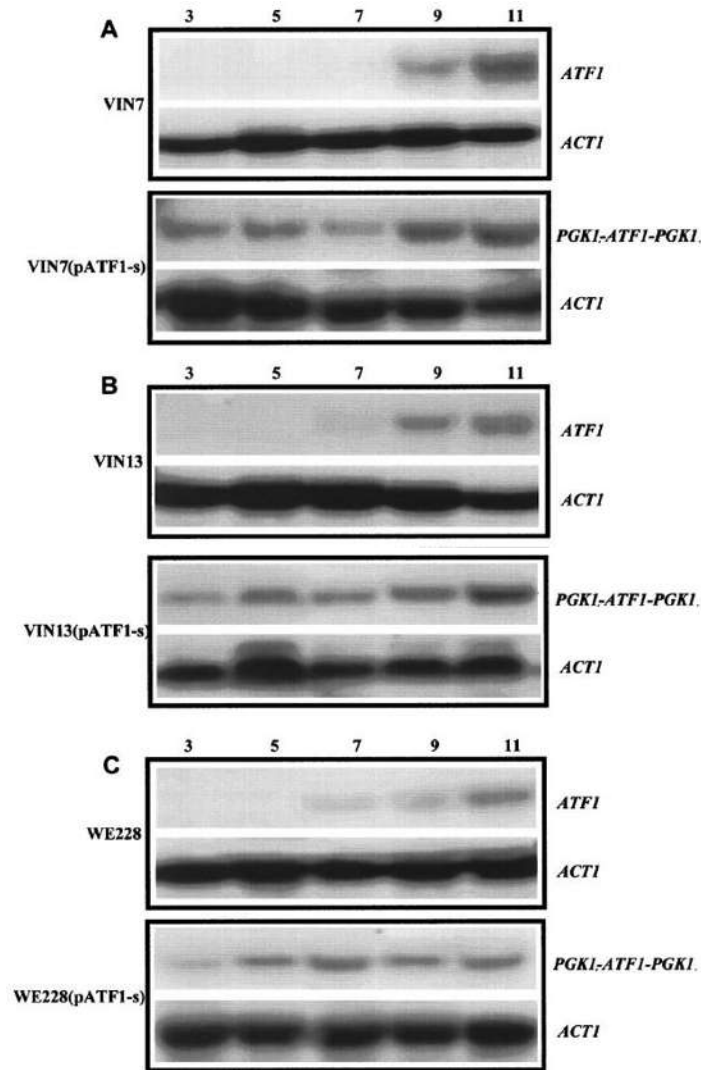


Figura 11. Análisis Northern blot de transcritos de *ATF1* durante la fermentación. ARN de las cepas A) VIN7, B) VIN13 y C) WE228 de levaduras comerciales de vino, con sus correspondientes transformantes, con el casete de expresión constitutiva *PGK_P-ATF-PGK_T*, aislados los días 3, 5, 7, 9 y 11 de fermentación, probando *ATF1* y *ACT1*. Tomado de (Lilly *et al.*, 2000).

Hacen también análisis por cromatografía de gases de los vinos y destilados, en donde observan que los niveles de ésteres de acetato incrementan de 3 a 12 veces, en fermentaciones con las cepas transformadas, respecto al control. Finalmente hacen análisis sensorial con 5 experimentados jueces, que determinan que las bebidas obtenidas con las cepas transformadas presentan más intensidad de olor a solvente y a florar-frutal que las obtenidas con cepas control. (Lilly *et al.*, 2000).

Más tarde, en el 2012, *Ceballos-Magaña et al.*, realizaron análisis de compuestos volátiles como etil-acetato, 1-propanol, 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, 5-(hidroximetil)-2-furaldehido and 2-furaldehido en tequila a diferentes puntos de añejamiento; comprobando que la cantidad de ésteres se ve incrementada de manera importante con el añejamiento del mismo. Por lo que no solo durante la fermentación de bebidas alcohólicas se da la producción total de ésteres, sino que también el añejamiento juega un papel importante en acentuar un aroma y sabor agradables en el producto, por efecto de la cantidad de ésteres presentes.

Adicionalmente, con el fin de incrementar la producción de ésteres mediante la modificación de la expresión del gen *ATF1* en la cepa de *S. cerevisiae* BY4741, en nuestro grupo de trabajo se hicieron pruebas tanto de inserción de plásmidos pYES conteniendo al gen *ATF1*, como inserción del gen en 18S, para recombinación homóloga con el fin de aumentar el número de copias del gen *ATF1* en el genoma de la levadura; como insertando una copia adicional en tándem del elemento cis de activación transcripcional (LORE) en el promotor del gen *ATF1*, para incrementar la expresión del mismo.

Se evalúa la cinética de crecimiento a diferentes tiempos de fermentación, para verificar que la biomasa contenida en el medio no muestre diferencias de la cepa control con las transformadas. Los parámetros fermentativos evaluados fueron: rendimiento en la producción de etanol, velocidad específica de crecimiento y velocidad máxima de consumo de glucosa. Con las cepas recombinantes se realizaron fermentaciones y se determinó que la concentración de los ésteres en el medio a los 6 días de fermentación con la cepa transformada con el duplicado del elemento LORE (TLATF) fue significativamente mayor en comparación con su fondo genético. (*Farías-Rosales, 2014 tesis de maestría, IIQB, UMSNH*).

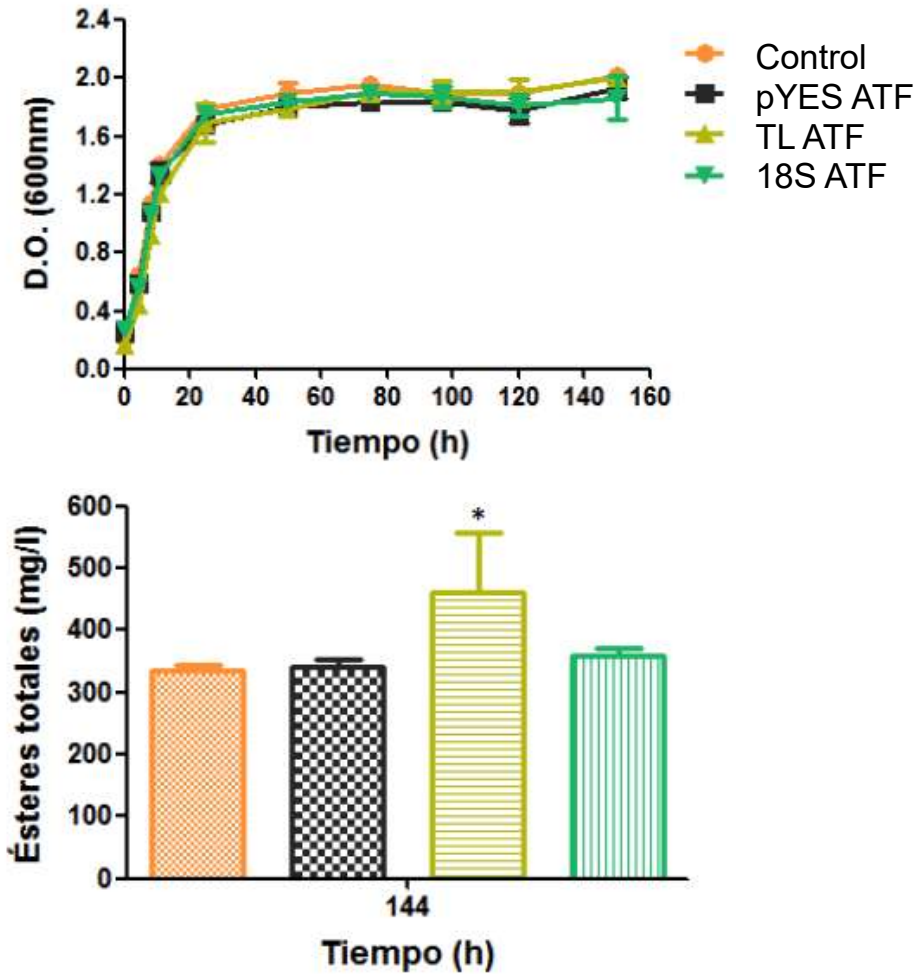


Figura 12. Cinética de crecimiento y concentración de ésteres totales en el medio de fermentación. Los cultivos de BY4741 se crecieron y las clonas recombinantes seleccionadas en medio YPD 20% adicionado con sulfato de amonio y la fermentación se realizó a 30°C. A) Curva de crecimiento determinada a partir de los cambios en la densidad óptica a 600nm. B) Determinación de ésteres totales con el método del hidroxamato férrico al final de la fermentación alcohólica. (Fariás-Rosales, tesis de maestría, 2014, IIQB, UMSNH).

JUSTIFICACIÓN

Los compuestos volátiles que otorgan a las bebidas fermentadas un olor y sabor agradables, como los ésteres, dan notas sensoriales específicas que son de agrado para el consumidor; por lo que resultan ser de importancia industrial para mejorar las características organolépticas de éstas bebidas.

El gen *ATF1* es el responsable de sintetizar a la alcohol acetiltransferasa *Atf1*, que es la enzima involucrada en la producción de ésteres, por lo que la sobreexpresión de la misma, podría reflejarse en un incremento en la producción de éstos durante el proceso de fermentación realizada con la levadura industrial de *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1, contribuyendo en el mejoramiento de las características organolépticas del producto fermentado.

HIPÓTESIS

La sobreexpresión del gen *ATF1* en la cepa industrial de *Kluyveromyces marxianus* UMPe1, incrementa el contenido de ésteres en fermentaciones alcohólicas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Incrementar la producción de ésteres en fermentaciones alcohólicas, obtenidas con la cepa de *K. marxianus* UMPe1 mediante la sobreexpresión del gen *ATF1*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Incrementar la expresión del gen *ATF1* en *K. marxianus*.
2. Incrementar la producción de ésteres durante la fermentación alcohólica con *K. marxianus* UMPe1.
3. Evaluar el efecto de la levadura sobreproductora de ésteres sobre las características organolépticas en aplicación industrial para elaboración de mezcal.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1 Plásmidos y Cepas.

En este trabajo se utilizaron los plásmidos y cepas descritos en las tablas 6 y 7 respectivamente:

Tabla 6. Plásmidos utilizados.

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
pJET1.2/blunt	Vector para la clonación de fragmentos de ADN. Se basa en una selección positiva de las células recombinantes (ya que contiene el gen letal <i>eco47IR</i>) y el gen <i>bla</i> que confiere resistencia a ampicilina (ApR).	Fermentas
pJTándemLORE Zeo	pJET con gen ATF, duplicación de elemento LORE y resistencia a Zeocina	Farías-Rosales, 2014
pJATF1-18S zeo	pJET con gen ATF, insertando en gen 18S y resistencia a Zeocina	Farías-Rosales, 2014

Tabla 7. Cepas utilizadas.

ORGANISMO/CEPA	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
<i>E. coli</i> JM101	Cepa receptora de la transformación	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
JM101 TLATF	<i>E. coli</i> JM101 transformada conteniendo el plásmido pJ TLATF Zeo ^R	Farías-Rosales, 2014
JM101 18SATF	<i>E. coli</i> JM 101 transformada conteniendo el plásmido pJ 18SATF Zeo ^R	Farías-Rosales, 2014
<i>K. marxianus</i> UMPe1	Levadura industrial aislada de residuos de fermentos	López-Álvarez, 2007
UMPe1 TLATF	<i>K. marxianus</i> transformada con duplicado de elemento LORE, <i>ATF1</i> y resistencia a Zeocina	Este trabajo
UMPe1 18SATF	<i>K. marxianus</i> transformada con <i>ATF1</i> insertado dentro del gen 18S y resistencia a Zeocina	Este trabajo

1.2 Medios de cultivo.

Medio Luria Bertani (LB).

Para la preparación del medio de cultivo LB para bacterias, se requirieron los siguientes componentes:

- 1% Peptona de caseína.
- 0.5% Extracto de levadura.
- 0.5% Cloruro de sodio.
- 1.5% Agar bacteriológico. Para medio sólido.

Se mezclaron los componentes con agua destilada en matraz Erlenmeyer y el agar se agregó únicamente cuando se requirió medio sólido. Se esterizaron previo a su uso en autoclave 15 minutos a 121°C y 15 libras de presión.

Medio Extracto de levadura-Peptona-Dextrosa (YPD).

Para la preparación del medio de cultivo YPD para siembra de levaduras, se requirieron los siguientes componentes:

- 1% Extracto de levadura.
- 2% Peptona de caseína.
- 2% Agar bacteriológico. Para medio sólido.
- Dextrosa.

Se preparó dextrosa en agua destilada para esterilizar por separado con el medio (ya que esterilizado junto se carameliza y obscurece el medio). Se preparó al 20% para usar en medios YPD 2% (resiembras en caja Petri o crecimiento de inóculos) y al 50% para usar en medios YPD 10% (medios para fermentación).

Los otros componentes se mezclaron con agua destilada hasta el 80% o 90% del total que se va a requerir, para agregar después la dextrosa y completar el 100%. Se esterilizó previo a su uso en autoclave 15 minutos a 121°C y 15 libras de presión.

1.3 Antibióticos.

Para la selección y resiembra de las bacterias que contienen las construcciones se utilizó Ampicilina a una concentración final de 100µg/ml.

Para la selección y resiembra de las levaduras transformadas, se utilizó Zeocina a una concentración final de 100µg/ml a un pH de 7.5 del medio, teniendo la precaución de manejar el antibiótico en obscuridad parcial, por su sensibilidad a la luz.

Para la preparación de los viales para el almacenamiento de las cepas, se cosecharon las células de cultivos crecidos toda la noche, para resuspenderlas en 800 µL del medio de cultivo correspondiente más 200 µL de glicerol. Los microtubos se almacenaron en el ultra-congelador a - 80°C.

1.4 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron diseñados previamente por Farías-Rosales en el laboratorio de biotecnología microbiana para su uso en PCR para las construcciones genéticas realizadas, se muestran en la tabla 8:

Tabla 8. Oligonucleótidos diseñados para amplificación de ADN por PCR de las construcciones TLATF y 18SATF.

Oligo	Secuencia (5´- 3´)	Tm °C	GC %	Región
01 F	AGATCACGTGCAAACCGAAGAAATG	58.0	44	414pb río arriba
01 R	TTTCGTCGACCGAATTTTTGTTGGGTTGGC	63.1	45	LORE a LORE
02 F	TCTTGTCGACGCCAACCCAACAAAATTGC	62.9	45	LORE a región
02 R	CGAGGATATGCACACAAGGTTCCAA	59.1	48	terminadora <i>ATF1</i>
03 F	CTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTC	57.1	48	Marco de
03 R	GTCCAAATTCTCCGCTCTGAGATGG	59.3	52	lectura abierto 18S ADNr

* F = Directo; R = Reverso

Los oligonucleótidos y los iniciadores utilizados para PCR y RT-PCR en tiempo real para el gen *ATF1* se muestran en la tabla 9:

Tabla 9. Oligonucleótidos para Q-PCR.

Tipo	Nombre	Secuencia
Sonda	ATF1_Probe	TGAGGAAACTTCCAGAACCGATCGA TGGCTTCTTTGACTACCTTCCAACA
Oligo directo	ATF1_FP	TTCAAGTACGAGGAGGATTACCAAT
Oligo reverso	ATF1_RP	AAACAAGTACGGTGGTCTAAAGTC
Sonda	Scactin Probe	TGGCTTCTTTGACTACCTTCCAACA
Oligo directo	Scactin_FP	CGTCTGGATTGGTGGTTCTATC
Oligo reverso	Scactin RP	GGACCACTTTCGTCGTATTCTTG

2. MÉTODOS

2.1 Aislamiento de ADN plasmídico de bacterias

El aislamiento se lleva a cabo empleando el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979):

- 1) Se creció la bacteria *E. coli* JM101 en 3 mL de caldo LB durante 12 a 18 h a 30°C con agitación constante.
- 2) Se cosechó el cultivo obtenido en tubos eppendorf de 1.5 mL, mediante centrifugación a 10,000rpm, durante 1 min a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y se guardó el sedimento. Se hizo una repetición para usar el total de los 3 mL.
- 3) Se resuspendió la pastilla en 150 µL de solución STE (Sacarosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0).
- 4) Se adicionó 250 µL de solución de lisis recién preparada (NaOH 0.2 N, SDS al 1%) y se mezcló por inversión hasta ver viscosa y clara; para después incubar por 10 min en hielo.
- 5) Se agregó 150 µL de acetato de sodio 3 M pH 4.8, mezclando por inversión para después incubar 10 min en hielo, hasta que se observó un precipitado blanco.
- 6) Se centrifugó a más de 10,000 rpm por 2 min.
- 7) Se adicionó 150 µL de la mezcla fenol:cloroformo 1:1, agitando por un 1 min en vórtex.
- 8) Se centrifugó por 7 min a más de 10,000 rpm.
- 9) Se recuperó el sobrenadante en un nuevo microtubo con micropipeta y se adicionó 700 µL de la mezcla etanol absoluto/isopropanol 60/40 (v/v); para posteriormente mantenerlo por 20 minutos en hielo y centrifugarlo por 1 min a 13,000 rpm.
- 10) Se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla (ADN) 2 veces con 500 µL de etanol al 70% (v/v), centrifugando en cada lavado de 2 a 5 min a 13,000 rpm (descartando el sobrenadante).
- 11) Se secó la pastilla a 37°C durante 7 min o hasta que no se percibiera olor a etanol y se resuspendió en 50 µL de agua destilada estéril.
- 12) Se agregó 3 µl de RNAsa (100 µg·µL⁻¹) y se dejó incubar durante 30 min a 37°C.
- 13) Se almacenó en refrigeración, previo corrimiento electroforético.

2.2 Restricción con endonucleasas.

El ADN plasmídico obtenido se digirió empleando la enzima de restricción Scal (promega) que corta en el sitio 2473 del plasmido pJET 1.2/blunt, con el procedimiento siguiente:

- 1) Se mezcló 50 μL de ADN plasmídico, 1 μL de la enzima seleccionada a 10 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 15 μL de solución amortiguadora Scal y agua destilada c.b.p. 150 μL .
- 2) Se incubó a 37°C durante ~ 20 horas.
- 3) Se realizó electroforesis en gel de agarosa para comprobar la linearización del plásmido.

2.3 Aislamiento de ADN total de levaduras.

El aislamiento de ADN de levaduras se modificó del método reportado por Philippsen *et al.*, (2004) como se indica:

- 1) Se inoculó un tubo con 3 mL de medio YPD 2% con la cepa de la levadura y se incubó toda la noche a 30°C con agitación constante.
- 2) Se cosecharon las levaduras en tubos eppendorf de 1.5 mL, centrifugando a 13,000 rpm por 1 min y descartando el sobrenadante.
- 3) Se resuspendieron las células en 200 μL de buffer de lisis (tritón 2%; SDS 1%; NaCl 100 mM; Tris-HCl pH 8.0, 10 mM; EDTA pH 8.0, 1 mM) recién preparado.
- 4) Se adicionaron 8 perlas de vidrio estériles y 200 μL de la mezcla fenol:cloroformo 1:1 y se mezcló en vórtex a alta velocidad durante 1 min.
- 5) Se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min y se transfirió la fase acuosa a un nuevo microtubo.
- 6) Se adicionó 200 μL de fenol:cloroformo 1:1, se mezcló y se centrifugó.
- 7) Se transfirió la fase acuosa a otro microtubo.
- 8) Se adicionó 500 μL de la mezcla etanol-isopropanol 60/40 (v/v), mezclando por inmersión para posteriormente incubar en hielo por al menos 15 min.
- 9) Se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min, para después decantar el sobrenadante y lavar la pastilla tres veces con 500 μL de etanol al 70% (v/v).
- 10) Se centrifugó a 13,000 rpm durante 3 min, descartando el sobrenadante y dejando secar a 37°C durante 8 min.
- 11) Se resuspendió la pastilla de ADN en 50 μL de agua destilada estéril.
- 12) Se agregaron 3 μL de RNasa y se incubó el ADN a 37°C durante 30 min.
- 13) Finalmente se verificó la extracción en gel de agarosa.

2.4 Electroforesis en gel de agarosa.

Para realizar la electroforesis y verificar tanto la extracción de plásmidos, ADN linear plasmídico y ADN total de levaduras se preparó el gel y se cargó en la cámara de electroforesis como se indica en el procedimiento:

- 1) Se preparó el gel de agarosa con TAE 0.8X y 1% de agarosa y se derritió hasta observar homogeneidad y transparencia en la mezcla.
- 2) Una vez fundido, cuando se enfrió lo suficiente para que aun esté líquido pero se pueda tomar el matraz con la mano, se vertió en la placa y se colocó el peine de pozillos.
- 3) Se prepararon las muestras con 3 a 5 μL de ADN o 2 μL de marcador de tamaño molecular y 2 μL de amortiguador de carga (azul de bromofenol).
- 4) Se depositó el gel solidificado y con los pozos disponibles en una cámara de electroforesis horizontal PowerPac (BIO-RAD), que contenía amortiguador TAE 1X.
- 5) Se cargó cada una de las muestras en los orificios del gel, incluyendo el marcador de tamaño molecular.
- 6) Se sometió a un voltaje de 110 a 130 V, durante 30 min.
- 7) Se sacó el gel y se cortó, para meter solo la parte correspondiente al corrimiento a teñir en bromuro de etidio al 0.2% durante 5 a 10 min (con manejo especial, ya que es cancerígeno).
- 8) Se sacó el gel del bromuro y se colocó en el transiluminador de luz UV de onda corta (Fisher Biotech) para observar en el software la imagen del gel y las bandas de ADN.
- 9) Después de haber guardado el archivo, se eliminó el gel en confinamiento temporal en contenedor especial.

2.5 Amplificación de ADN (PCR)

La PCR se realizó utilizando el termociclador *Mastercycler* (eppendorf); se utilizó para preparar la mezcla de reacción el kit de reacción Pfx Platinum (Invitrogen); la mezcla se preparó de acuerdo a las siguientes condiciones de concentración final, partiendo de la inicial y considerando un volumen de reacción de 25 μL :

Tabla 10. Mezcla de reacción para PCR.

Componente	Concentración inicial	Concentración final
Pfx Buffer de Amplificación	10 X	1 X
Mezcla de dNTPs	10 mM	0.3 mM
MgSO ₄	50 mM	1 mM
Enhancer	10 X	0.5 X
Oligonucleótido directo	50 pm· μL^{-1}	6 pm· μL^{-1}
Oligonucleótido reverso	50 pm· μL^{-1}	6 pm· μL^{-1}
ADN molde	N.A.	~ 100 ng
Agua destilada estéril	N.A.	c.b.p 25 μL
ADN Polimerasa Pfx Platinum	2.5 U· μL^{-1}	1.25 U· μL^{-1}

Una vez preparada la reacción, se programó el termociclador de acuerdo a las condiciones de operación indicadas:

Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos	} 30 ciclos
Desnaturalización	94°C	40 segundos	
Hibridación (alineamiento)	56°C	30 segundos	
Extensión	68°C	1 minuto por kb	
Extensión final	68°C	5 minutos	
Mantener	4°C	Indeterminado	

- 1) Se colocaron las muestras en el termociclador.
- 2) Se validó o incluyeron condiciones de recipiente y volumen de reacción.
- 3) Se dejó el tiempo necesario hasta terminar los ciclos.
- 4) Se retiró la muestra y se validó la amplificación con electroforesis en gel de agarosa.

2.6 Purificación de ADN.

Para purificar ADN presente en gel de agarosa posterior a electroforesis, se siguieron los siguientes pasos:

- 1) Se cortó la sección del gel de agarosa que contenga el ADN requerido. (con equipo especial y guantes por la presencia de bromuro de etidio).
- 2) Se colocó en un tubo eppendorf la sección del gel separada.
- 3) Se pesó en balanza analítica y se adicionó 1 μL de solución de unión, por cada mg excedido de 1gr del peso del tubo con las muestra.
- 4) Se calentó en termoblot a 70°C por 10 min, mezclando cada 2 min.
- 5) Se vertió la mezcla en una columna del kit promega y dejando 2 min a temperatura ambiente, para después centrifugar 10 seg.
- 6) Se regresó el filtrado a la columna y se dejó 2 min a temperatura ambiente, para luego centrifugar 10 seg.
- 7) Se pasó el líquido a un tubo eppendorf.
- 8) Se lavó la columna con 700 μL de solución de lavado del kit y se centrifugó 1 min.
- 9) Se realizó un segundo lavado con 500 μL de solución.
- 10) Se centrifugó 5 min para eliminar el etanol.
- 11) Se hizo cambio de columna a tubo eppendorf.
- 12) Se eluyó con 15 μL de agua libre de nucleasa, dejando 2 min a temperatura ambiente.
- 13) Se centrifugó 2 min a más de 10,000 rpm. Se repitieron los pasos 12 y 13 una vez más.
- 14) Se validó la presencia del ADN purificado contenido en el eluido, con electroforesis en gel de agarosa.

2.7 qPCR y qRT-PCR de *ATF1*.

Los análisis de PCR y RT-PCR cuantitativo (en tiempo real) se realizaron en el laboratorio Estatal de Salud Pública, con el apoyo del M.C. Marco Valle Maldonado; de acuerdo al siguiente procedimiento:

La RT-qPCR se realizó usando el kit SuperScript III Platinum One-step RT-qPCR (Invitrogen); en el sistema LightCycler480 II (Roche Molecular Diagnostics). La mezcla se preparó en un gabinete para PCR (UVP), de acuerdo a las siguientes cantidades, considerando un volumen de reacción de 25 μL .

Tabla 11. Mezcla de reacción para q-PCR.

Componente	Cantidad en mezcla
DNA templado (100 ng/μl)	5 μL
mezcla de enzimas	0.5 μL
mezcla de reacción 2X	12.5 μL
oligonucleótido directo 10 μM	0.5 μL
oligonucleótido reverso 10 μM	0.5 μL
sonda 5 μM	0.5 μL
agua libre nucleasa	5.5 μL

Una vez preparada la reacción, se lleva a cabo de acuerdo a las condiciones de operación indicadas, donde la transcripción reversa, se incluye únicamente para RT-qPCR, no así para q-PCR:

Transcripción reversa	50°C	30 minutos	
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos	
Desnaturalización	95°C	15 segundos	} 45 ciclos
Hibridación (alineamiento)	60°C	30 segundos	
Extensión	72°C	30 segundos	

Las señales de fluorescencia fueron colectadas a cada ciclo de amplificación a 60°C. Las curvas de amplificación fueron analizadas a longitudes de onda de absorción de 530 nm (ya que el componente fluoróforo de la sonda es FAM). En cada experimento se tomaron control positivo (ADN genómico de *Saccharomyces cerevisiae*), y agua como control negativo y se usó actina como gen de referencia.

Para el caso de q-PCR, para obtener el número de copias del gen *ATF1*, se utiliza la siguiente fórmula:

$$Copias = 2^{((CTactM - CTactC) - (CTatfM - CTatfC))}$$

Donde:

CTactM = Ciclo umbral de actina en muestra.

CTactC = Ciclo umbral de actina en control.

CTatfM = Ciclo umbral de *ATF1* en muestra.

CTatfC = Ciclo umbral de *ATF1* en control.

2.8 Transformación de levaduras.

La preparación de células competentes y la transformación se realizó de acuerdo al procedimiento indicado por el proveedor del kit de transformación Frozen EZ yeast transformation II de Zymo Research, como se describe:

Preparación de células competentes.

- 1) Se crecieron las levaduras en medio YPD 2% a 30°C, 150 rpm, hasta alcanzar una D.O.600 nm 0.7 ± 0.03 .
- 2) Se cosecharon las levaduras a temperatura ambiente a 13,000 rpm por 2 min y se eliminó el sobrenadante.
- 3) Se agregó 1 mL de solución EZ 1 precalentada a 30°C para lavar la pastilla.
- 4) Se cosecharon las células y se desechó el sobrenadante.
- 5) Se agregaron 100 μ L de solución EZ 2 precalentada a 30°C para re-suspender la pastilla y preparar alícuotas de células competentes.

Transformación.

- 1) Se mezclaron 50 μ L de células competentes (recién preparadas) con 0.2-1 μ g de ADN (en un volumen menor de 5 μ L).
- 2) Se adicionaron 500 μ L de la solución EZ 3 precalentada a 30°C y se mezcló.
- 3) Se incubó a 30°C durante 90 min agitando en rotor a 150 rpm.
- 4) Finalmente se distribuyeron 150 μ L de las células en cajas de YPD 2% (pH 7.5) con el antibiótico de selección (zeocina 100 μ g·mL⁻¹), con perlas estériles para hacer una mejor distribución de las células en las cajas.
- 5) Se incubó en oscuridad a 30°C durante ~3 días para permitir el crecimiento de las transformantes, revisándolas diariamente.

2.9 Fermentación.

Para llevar a cabo la fermentación a nivel laboratorio, se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- 1) Se Inocularon 3 mL de YPD 2% contenidos en un tubo de vidrio estéril ya sea a partir de un vial de levaduras almacenadas en el ultracongelador, tomando 15 μ L o una asada de levaduras sembradas en cajas de Petri.
- 2) Se incubaron las levaduras a 30°C en agitación constante toda la noche, para obtener un pre-inóculo y comenzar las fermentaciones con la misma densidad óptica para todas las muestras.
- 3) Se calculó la cantidad a tomar de una alícuota del cultivo previo, para comenzar con una D.O.600 nm inicial de 0.1 con la siguiente formula:

$$Vol x = \frac{Vol total * 0.1}{DO}$$

Donde:

Vol x= Volumen de la alícuota a tomar del preinoculo para inocular el medio YPD fresco.

Vol total = Volumen total del medio de cultivo a ser inoculado.

DO = Densidad Óptica 600 nm obtenida en el espectrofotómetro del preinóculo crecido toda la noche.

- 4) Se inoculó medio de cultivo estéril ya preparado previamente, en frascos de 118 mL de capacidad, con 90 mL de caldo de cultivo YPD 10%.
- 5) Se dejó crecer incubando a 30°C con agitación manual esporádica.

2.10 Cinética de crecimiento.

Para determinar la densidad óptica (D.O.) se siguió el procedimiento siguiente:

- 1) Se tomó muestra de los caldos de fermentación recién agitados, cada 2, 6 o 12 horas, para medir en espectrofotómetro la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm.
- 2) En los casos en que la lectura dio un valor superior a 1.0, se hicieron diluciones 1:10, ya que a partir de ese valor la correlación no es lineal.

Para poder relacionar la D.O. 600 nm con la cantidad de células presentes en el medio, se hizo un conteo celular en microscopio con cámara de Neubauer, tomando en cuenta que:

$$1 \text{ recuadro de la cámara de Neubauer} = 1 \text{ mm}^2 = 0.1 \text{ mm}^3 = 0.1 \mu\text{L}$$

Por lo que:

$$\text{Concentración celular} = \frac{\text{células contadas} * 10,000}{\text{No. de cuadros contados}}$$

2.11 Viabilidad celular.

Se mide la viabilidad celular en el citómetro de flujo Accuri C6 FlowCytometer, de acuerdo al procedimiento indicado por el proveedor del kit LIVE/DEAD® FungaLight™ Yeast Viability Kit:

- 1) Se preparó una muestra control de células muertas, manteniendo una alícuota de 1 mL de levaduras en medio YPD en baño de agua a 80°C por 10 min.
- 2) Se prepararon las muestras experimentales tomando 1 mL de muestra en microtubo, se centrifugaron todas las muestras incluyendo el control de células muertas a 10,000 rpm por 2 min para sedimentar las células.
- 3) Se resuspendieron en 1 mL de medio YPD fresco.
- 4) Se diluyeron las células a $\sim 10^6$ cel·mL⁻¹ ($\sim DO_{600nm} = 0.8$).
- 5) Para la tinción, cada muestra de 1 mL con $\sim 10^6$ cel, se colocó en microtubo.
- 6) Para el control de no teñidas, se guarda una muestra sin adicionar colorante.
- 7) Se preparó también control de colorante individual, adicionando 1 μ L de componente A (colorante SYTO® 9), y otro con 1 μ L de componente B (ioduro de propidio).
- 8) A las muestras experimentales, incluyendo control de muertas, se agrega 1 μ L de componente A y 1 μ L de componente B a cada una, y se mezcló en vortex.
- 9) Se incubaron las muestras a 37°C protegidas de la luz por 30 min.
- 10) Posteriormente se analizaron en el citómetro de flujo.

2.12 Determinación de biomasa.

Para la determinación de la biomasa en peso fresco y seco, se hizo toma de muestra del medio de cultivo, se midió la densidad óptica, se hizo conteo celular para cuantificar cantidad de células por mililitro y posteriormente:

- 1) Se cosecharon las levaduras en tubo eppendorf a 10,000 rpm por 3 min.
- 2) Se desechó el sobrenadante.
- 3) Se pesó en balanza analítica las levaduras con el tubo; al resultado se le restó 1 g de la masa del tubo para obtener así biomasa peso fresco por mililitros usados.
- 4) Se secaron las levaduras obtenidas en incubadora a 37°C por 24 horas y se pesaron de nuevo, para obtener así la biomasa en peso seco.

2.13 Determinación de ésteres totales.

Los ésteres reaccionan cuantitativamente con la hidroxilamina, en un medio alcalino, para formar ácido hidroxámico, que después de la acidificación forma un complejo coloreado con los iones de hierro. La concentración de ésteres es proporcional a la densidad óptica medida a 525 nm (*Molina-Ubeda, 2000*). La prueba es positiva cuando se observa una coloración borgoña intenso, magenta o marrón-rojizo (*Pavia et al., 2012*).

- 1) Se crecieron las levaduras en condiciones fermentativas.
- 2) Se tomó una muestra de 800 μL del caldo de fermentación y se colocó en un microtubo estéril.
- 3) Se centrifugó a 13,000 rpm por 3 min.
- 4) Se tomó 500 μL del sobrenadante y se colocó la muestra en un tubo de ensayo.
- 5) Se añadió 334 μL de la solución de clorhidrato de hidroxilamina 2 M y 334 μL de hidróxido de sodio 3.5 M.
- 6) Se tapó y agitó en vórtex y se dejó reposar por 10 minutos.
- 7) Se añadió 334 μL de ácido clorhídrico 4 M y 334 μL de la solución de cloruro férrico 0.37 M.
- 8) Se agitó en vórtex y se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a longitud de onda de 525 nm, empleando como blanco agua destilada estéril sometida al mismo procedimiento que las muestras.

2.14 Análisis mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

La producción de etanol y el consumo de glucosa durante la fermentación se determinó mediante un equipo de HPLC (Varian ProStar 240), con automuestreador (410), módulo de interfase (Star 800), acoplado a un detector de índice de refracción (Perkin-Elmer 200) y un horno (Alltech) programado a 80°C. Se utilizó una columna Aminex HPx-87Ca (Bio-Rad). Como fase móvil se usó agua destilada, desionizada, filtrada con un filtro MILLIPORE 0.22 μm y desgasificada al vacío.

Las muestras se filtraron con un filtro de 0.22 μm , previo a colocarlas en los viales para análisis.

Las condiciones de operación fueron las siguientes:

- 1) Se precalentó el horno a 80°C.
- 2) Se corrió en el software el método "Inicio Aminex C-87Ca", con flujos de agua: 0.2 mL·min⁻¹, 2 min; 0.3 mL·min⁻¹, 5 min; 0.4 mL·min⁻¹, 10 min; 0.5 mL·min⁻¹, 15 min; 0.6 mL·min⁻¹, 20 min, 0.7 mL·min⁻¹, 25 min.
- 3) Se colocaron las muestras en el automuestreador, cargando la serie, indicando el número de muestra y vial en la computadora, y activando la bomba.
- 4) Una vez terminado el método de inicio, se corrió el método "Ferm Aminex C-87Ca" (0.7 mL·min⁻¹, 20 min).
- 5) Para finalizar, sin parar la bomba, se apagó el horno y se corrió el programa de terminación 0.7 mL·min⁻¹ inicial, 0.6 mL·min⁻¹, 2 min; 0.4 mL·min⁻¹, 5 min; 0.3 mL·min⁻¹, 10 min; 0.2 mL·min⁻¹, 15 min; 0.15 mL·min⁻¹, 20 min; 0.10 mL·min⁻¹, 25 min; 0.00 mL·min⁻¹.

Los resultados se analizan en el software Varian ProStar de la computadora acoplada al HPLC.

2.15 Extracción líquido-líquido de compuestos orgánicos volátiles en el medio

- 1) Se muestrearon 8 mL del medio de fermentación.
- 2) Se centrifugó 5 min a 7,000 rpm a 4°C.
- 3) Se colocaron 5 mL del extracto libre de células en un tubo falcon de 15 mL. Para el caso del mezcal, se comenzó la extracción desde este punto.
- 4) Se adicionó 100 µL de 2-pentanol (100 mg·mL⁻¹ en etanol absoluto) para una concentración final de 2 mg·mL⁻¹, como compuesto normalizador.
- 5) Se agregó 7.5 mL de diclorometano, como solvente de extracción.
- 6) Se agitó la mezcla manualmente durante 1 min, con el tubo bien cerrado y se dejó reposar por 5 min.
- 7) Se centrifugó a 10°C a una velocidad de 4,000 rpm por 3 min para separar completamente las fases.
- 8) Se colocó la fase orgánica en el mismo tubo de 15 mL y el extracto en un tubo falcon limpio de 50 mL.
- 9) Se repitieron los pasos del 5 al 7 para hacer una segunda extracción, desechando la fase orgánica; el segundo extracto, se colocó en el mismo tubo que el primero.

- 10) Se colocaron todos los tubos con los extractos a baño maría a 45°C para evaporar parte del solvente hasta reducir a 0.5 mL, para hacer su posterior análisis en cromatografía de gases.

2.16 Cromatografía de gases.

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases 7890A (Agilent technologies), empleando un auto-muestreador y un detector de ionización en llama (FID). Para la detección de cada uno de los compuestos se utilizó Espectrómetro de masas 5975C (Agilent technologies).

Se utilizó helio como gas acarreador. Se utilizó la columna cromatográfica ZEBRON ZB-WAXPLUS de alta polaridad (52), de composición de Polietilen Glicol de 30 m x 0.25 mm x 0.50 µm; con un rango de 20 a 250/260°C.

El método de corrida utilizado fue:
VOLATILESFERM03(FID+ZEBRONZBWAXPlus).M

Las condiciones de operación fueron:

Temperatura de inyección: 280°C

Volumen de inyección: 1 µL

Temperatura del horno: 45°C a 240°C

45°C (3 min) + 4°C·min⁻¹ hasta 200°C + 10°C·min⁻¹ hasta 240°C

Temperatura máxima: 260°C

Tiempo total: 55.75 min

Se cargaron las muestras en viales de 2 mL, con adaptador interno de 200 µL. Se corrió una muestra inicial con metanol puro para limpieza y se cargó en el software la serie para que se analice automáticamente.

Terminando los análisis se integró el área bajo la curva de los picos detectados en los diferentes tiempos de retención y con el reporte arrojado con la cromatografía acoplada a espectrómetro de masas se identificó cada uno de los compuestos representados por los diferentes picos del cromatograma.

2.17 Cuantificación de compuestos orgánicos volátiles por cromatografía.

Para cuantificar los compuestos observados en el cromatograma obtenido de la cromatografía de gases acoplada a FID de los mezcales, se hizo doble extracción

líquido-líquido de 1 mL de estándares de alcoholes a concentraciones de 10, 20, 50, 100 y 250 mg·(100mL)⁻¹ con 1.5 mL de diclorometano y 2-pentanol como compuesto normalizador y evaporando posteriormente hasta aforar a 0.5 mL, para analizar por cromatografía de gases acoplado a FID con las mismas condiciones que las muestras para correlacionar las abundancias obtenidas con los estándares con la concentración correspondiente.

2.18 Preparación de inóculos para pruebas industriales.

Para realizar las pruebas industriales, se generaron los inóculos en el laboratorio de acuerdo al procedimiento indicado:

- 1) Se inoculó 50 mL de YPD 2% contenidos en un matraz estéril, con una asada de levaduras sembradas en cajas de Petri.
- 2) Se incubaron las levaduras a 30°C en agitación constante a 150 rpm hasta una D.O.600 nm aproximada de 1.0.
- 3) Se inoculó con éste preinóculo inicial 300 mL de YPD 5% en matraz de 2 L, tapado con torunda de algodón envuelta en gasa, todo en esterilidad.
- 4) Se incubó a 30°C en agitación constante toda la noche.
- 5) Se inoculó con el preinóculo en un garrafón de agua de 20 L; con 16 L de agua purificada, miel de agave esterilizada, calculando a ~ 4°Brix final y suplementada con 0.025 g·L⁻¹ de fosfato de amonio.
- 6) Se mantuvo oxigenado el medio con bomba de aire, manteniendo manguera y aireador al fondo del contenedor (material previamente esterilizado).
- 7) Se dejaron las levaduras en crecimiento hasta que el azúcar se consumió (aproximadamente 20 hr), controlando la inocuidad.

2.19 Fermentación y destilación industrial de mezcal.

La fermentación alcohólica para elaboración de mezcal se realizó en la industria mezcalera “La Flor del Mezcal” en Etúcuaro, Municipio de Madero, Michoacán; de acuerdo al procedimiento artesanal empleado por ellos. Se utilizó *Agave cupreata*. Cada tanque de fermentación fue inoculado con el inóculo preparado previamente en el laboratorio.

La destilación se llevó a cabo en la misma mezcalera a los 4 días de fermentación, con una rectificación para llegar al grado alcohólico deseado.

Todo el procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones.

2.20 Análisis estadístico de resultados experimentales.

Los datos obtenidos se expresan como la media \pm el error estándar. Se realizaron análisis de varianza de una vía y de dos vías, con las pruebas de comparación de medias Dunnett y Bonferroni, indicando en cada experimento el análisis estadístico aplicado.

Para realizar los análisis se usaron los softwares estadísticos GraphPad Prism 5 y STATISTICA 8.

2.21 Simulación del proceso de elaboración de mezcal.

Para hacer la simulación y el diagrama de flujo del proceso de elaboración del mezcal se utilizó el software SuperPro Designer 9.0

RESULTADOS

La producción de ésteres en fermentaciones alcohólicas, puede verse afectada por diversos factores, cómo la cantidad de biomasa en el medio, los nutrientes presentes, principalmente carbono y nitrógeno disponible, la temperatura de fermentación, factores de estrés como pH, alcohol, el tipo de levadura utilizada y principalmente la actividad enzimática de las alcohol acetil-transferasas, sintetizadas por el gen *ATF1*; por lo que la estrategia de trabajo utilizada fue aumentar la actividad de la AATasa, utilizando dos estrategias, incrementando la inducción por hipoxia del gen, duplicando el elemento LORE y aumentando el número de copias del gen insertando el gen *ATF1* dentro del gen ribosomal 18S; insertando las construcciones dentro de la levadura industrial de *Kluyveromyces marxianus* UMPe1, para incrementar la expresión de *ATF1* por recombinación, aumentando así la cantidad de Atf y con esto la concentración de ésteres en el medio de fermentación y en una bebida fermentada destilada, en este caso el mezcal.

1. Construcciones genéticas

Las construcciones genéticas que se utilizaron en este trabajo, fueron las generadas previamente por *Farias-Rosales en el 2014*.

El gen *ATF1* con su región promotora, responsable de la interacción con los factores de transcripción, incluyendo el elemento LORE y la región de terminación de la transcripción, tiene una longitud de 2900 pb y es ésta región completa la que se usó para las dos estrategias genómicas utilizadas (Fig. 13A).

En la primer construcción genética, se duplica el elemento potenciador LORE en tándem en la región promotora del gen y se inserta el casete de resistencia a zeocina, como marcador de selección de las cepas transformantes, construcción que se designa con el nombre de TLATF (Fig. 13B).

Por otra parte, se genera una segunda construcción, en la cual se interrumpió *in vitro* al gen 18S ADNr con el gen *ATF1* y el casete de resistencia a zeocina para la selección; el gen ribosomal con la inserción, fue empleado como secuencia homóloga para dirigir la transformación mediante recombinación homóloga (Fig. 13C).

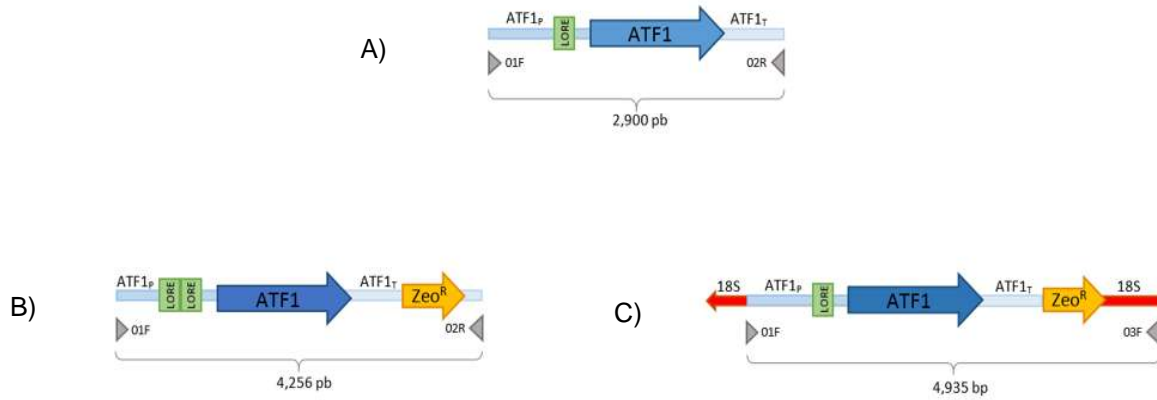


Figura 13. Construcciones genéticas. Imágenes representativas de las construcciones genéticas utilizadas en este trabajo, donde se muestra también en punta de flecha gris los oligonucleótidos para amplificación del fragmento indicado y el tamaño del fragmento; A). Gen *ATF1* con su región promotora, incluyendo el elemento LORE y la región terminadora; B). TLATF, duplicación de elemento LORE y resistencia a zeocina; C). 18SATF, *ATF1* insertando dentro del gen ribosomal *18S*.

2. Restricción plasmídica.

Las dos construcciones genéticas utilizadas, son las generadas previamente por Farías Rosales y se encuentran en el plásmido pJET, una llamada pJTandemLORE zeo y otra pJATF1-18S zeo (Fig. 13), contenido en la cepa portadora *E. coli* JM101, resguardadas en el cepario del laboratorio de biotecnología microbiana, del instituto de investigaciones químico biológicas

Se hace extracción de ADN plasmídico de las bacterias de *E. coli* JM101 crecidas en LB toda la noche, tanto las que contienen al plásmido pJATF1-18S zeo, como a las que contienen a pJTándemLORE zeo y se verifica la presencia del ADN por electroforesis en gel de agarosa (Fig. 15) para hacer la restricción con la enzima Scal que corta en la sección del gen Bla de resistencia a ampicilina que ya no es necesario puesto que se tiene la resistencia a zeocina, dejando íntegra la sección que se requiere (fig 16).

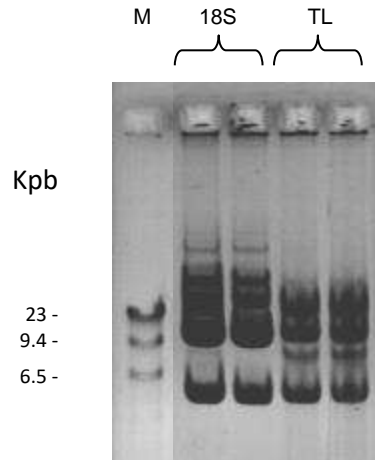


Figura 15. Extracción de plásmidos. Se muestra el corrimiento en gel de agarosa, donde M es el marcador de peso molecular λ DNA/HindIII, 18S es correspondiente a pJATF1-18S zeo y TL es pJTándemLORE zeo.

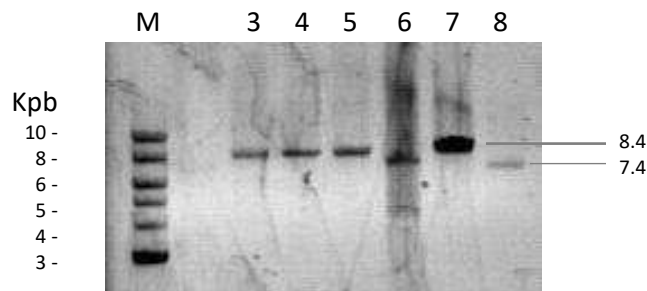


Figura 16. Plásmidos linearizados. Imagen que muestra un gel de agarosa con los plásmidos linearizados, donde el carril 1 es M, el marcador de peso molecular Ladder 1kb Plus, carriles 3, 4, 5 y 7 corresponden al plásmido pJATF1-18S zeo y los carriles 6 y 8 al plásmido pJTándemLORE zeo.

3. Transformación de levaduras.

Una vez teniendo el ADN con las dos construcciones, se realizó la transformación de las levaduras de *Kluyveromyces marxianus* UMPe1.

Cinética de crecimiento.

De acuerdo al proveedor del kit de transformación Yeast Frozen EZ, la densidad óptica ideal para realizar la transformación es de 0.7 ± 0.03 , por lo que antes de hacer la transformación se hace una cinética de crecimiento, para determinar el tiempo al que las células se encuentren en fase exponencial media para hacer la transformación.

Se inocula una asada de levaduras en medio YPD 2%, incubando a 30°C con agitación constante y tomando muestra cada dos horas durante las primeras 12 horas y otra toma de muestra a las 24 horas.

El crecimiento celular se determina por espectrofotometría a una D.O. 600nm. Los datos obtenidos en la cinética de crecimiento para la transformación, se representan en la figura 17, y se determina que el tiempo adecuado para hacer la transformación es aproximadamente a las 6 horas.

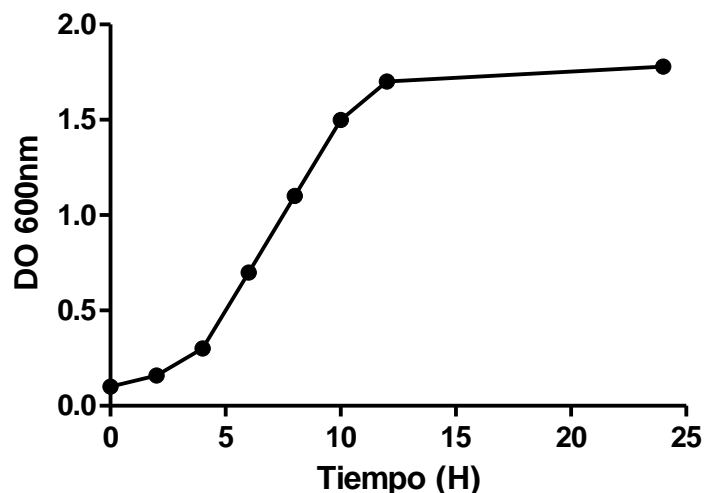


Figura 17. Cinética de crecimiento de UMPe1 para transformación genética. Cinética obtenida por espectrofotometría a DO 600 nm.

Transformación.

Ya determinado el tiempo ideal de crecimiento de levaduras para obtener la DO 600 nm aproximada de 0.7 que recomienda el proveedor, se hizo la preparación de las células competentes una vez alcanzada la densidad óptica de 0.72 con el kit FrozenEZ Yeast Transformation II, de la casa comercial Zymo Research; al igual que la transformación que se hizo con células competentes recién preparadas usando un aproximado de 500 ng de ADN, concentrándolo con CentriVap DNA Concentrator de LABCONCO, para llevarlo a un volumen menor de 5 μL y una vez mezclado el ADN con las células, se dejó en agitación constante a 30°C por 90 min., para posteriormente ser distribuido en las cajas de Petri con perlas estériles.

La selección de las transformantes se hizo en medio YPD 2% a pH = 7.5, con zeocina 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, manejando los medios con antibiótico en obscuridad envolviendo las cajas de Petri en papel aluminio tanto en la distribución de las levaduras en el medio, como en el tiempo que se dejó en incubación y en almacenamiento en frío.

De la transformación, a los tres días de incubación, se obtuvieron 4 clonas de la transformante TLATF, las cuales fueron nombradas como TLATF1, TLATF2, TLATF3, TLATF4 y una de la 18SATF.

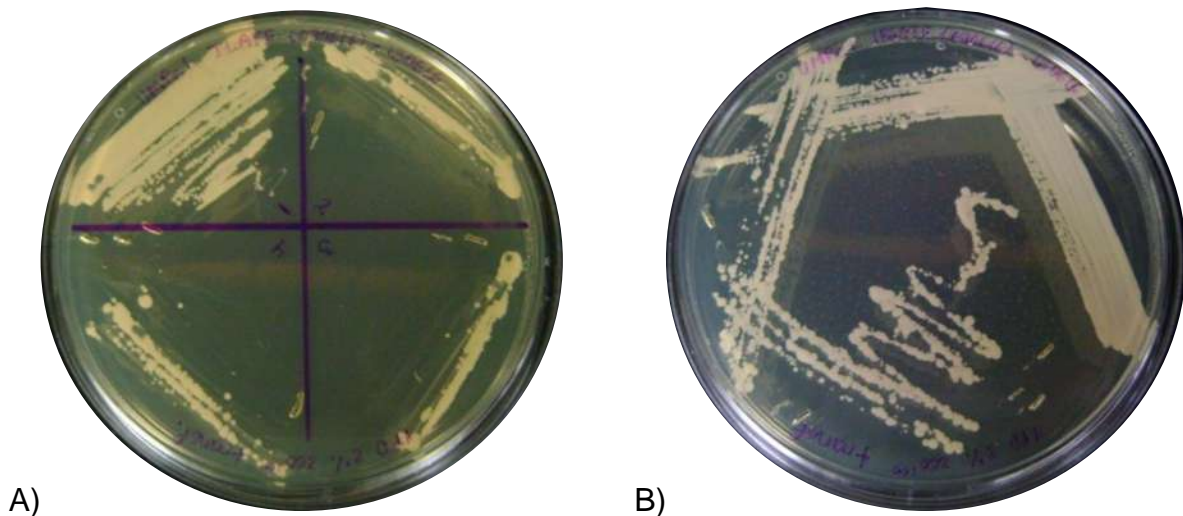


Figura 18. Levaduras transformantes. Fotografías de la resiembra de las clonas obtenidas en la transformación, en caja con medio YPD 2% zeo¹⁰⁰, donde A) Clonas con la construcción TLATF y B) Clona con la construcción 18SATF.

4. Selección de transformantes sobreproductoras de ésteres.

Para seleccionar las mejores clonas, basándose en las que mostraran una mayor producción de ésteres, se realizó en condiciones fermentativas en tubos de ensayo, análisis de ésteres totales por colorimetría, con hidroxamato férrico y leyendo absorbancia en espectrofotómetro a una densidad óptica 525 nm, donde un cambio de coloración a rojo borgoña, indica la presencia de ésteres, entre más intenso es mayor.

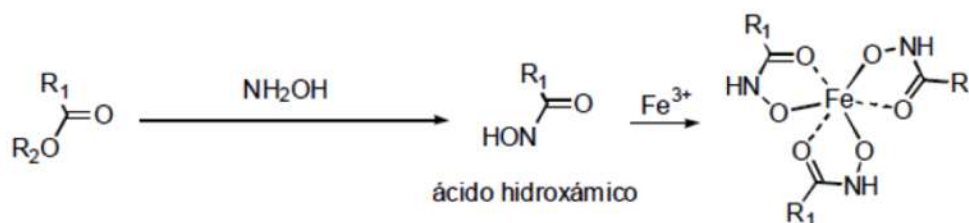


Figura 19. Reacción colorimétrica. Imagen que representa la reacción química de obtención de complejo coloreado de hidroxamato férrico. (Molina-Ubeda, 2000).

Se realizó una curva calibración con acetato de etilo a diferentes concentraciones, para observar la relación entre concentración y densidad óptica medida a una longitud de onda de 525 nm; se muestra en la figura 20.

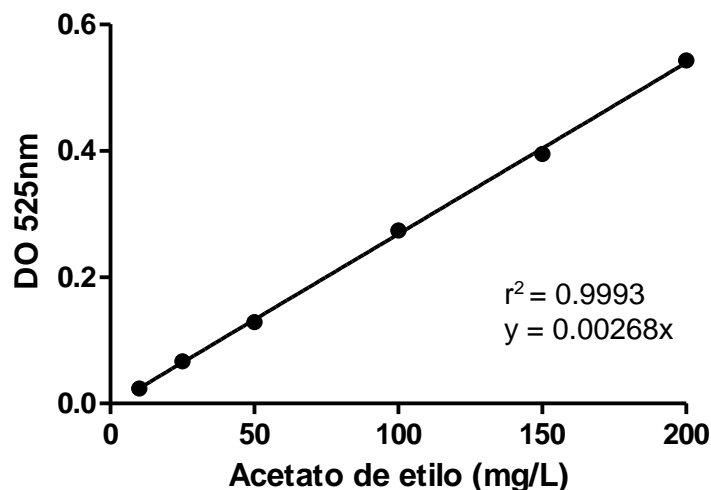


Figura 20. Curva de calibración acetato de etilo-DO525nm. Gráfica que representa la regresión lineal de la curva de calibración de acetato de etilo a concentraciones crecientes con su lectura en espectrofotómetro a 525 nm, por reacción colorimétrica.

Los resultados de los ésteres totales detectados en el medio, producidos por las clonas y la cepa control a diferentes tiempos de fermentación, hasta las 96 horas se muestran en la figura 20A, y representado en barras la DO 525 nm en la figura 20B.

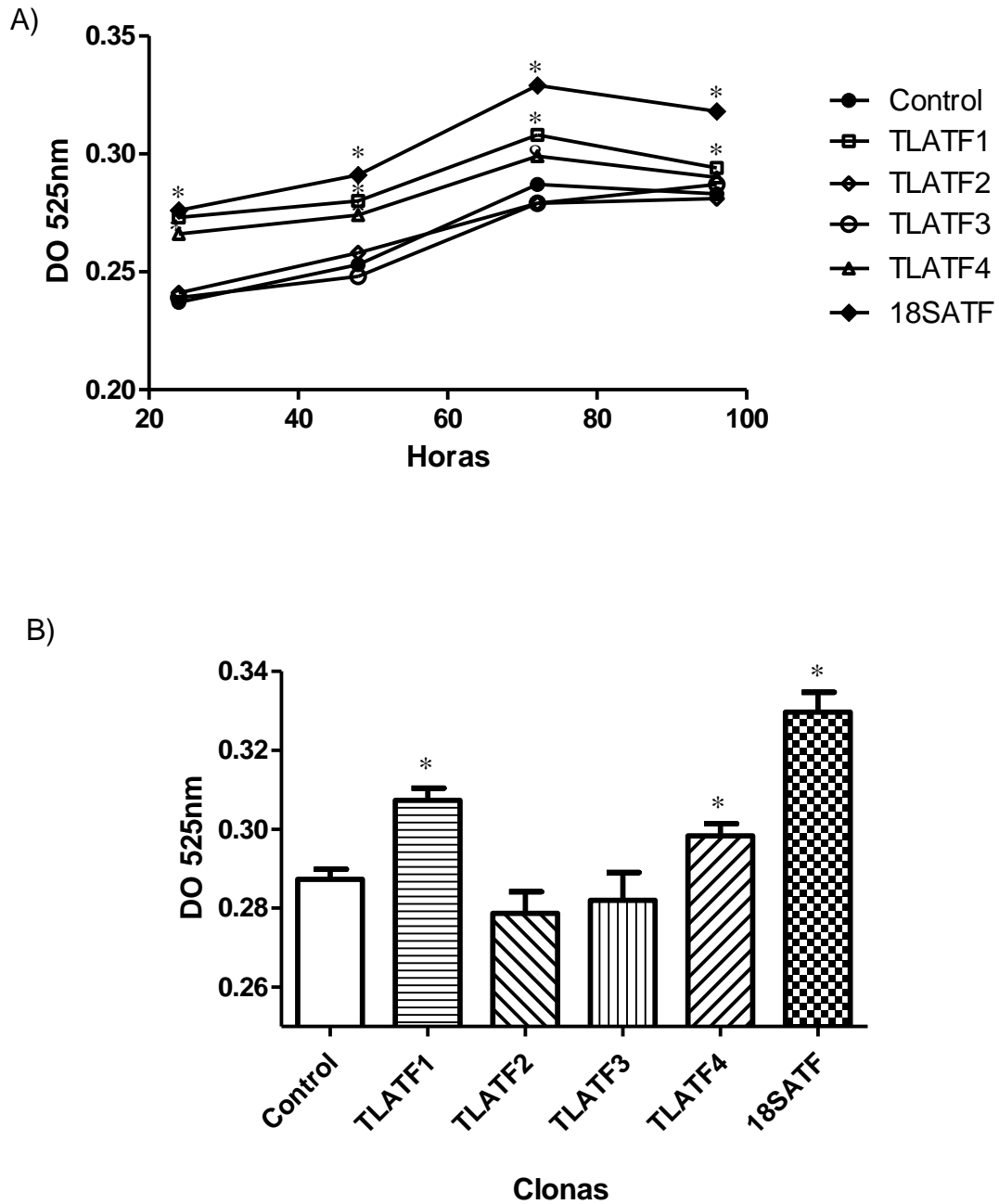


Figura 21. Ésteres totales. Gráficas que muestran el comparativo de los ésteres totales medidos por método colorimétrico, donde A) Densidad óptica promedio de tomas de muestra a diferentes tiempos de fermentación y B) Grafica de barras, donde se muestra al tiempo 72 H el promedio de 3 experimentos y la desviación estándar. ANOVA una vía, $P \leq 0.001$.

En base a los resultados, se puede observar que durante las primeras 72 horas de fermentación las clonas TLATF1, TLATF4 y 18SATF producen una mayor cantidad de ésteres totales comparando con la cepa control, manteniéndose la tendencia de 18SATF hasta las 96 horas de fermentación; a las 72 horas, es el tiempo al que se observa la máxima producción de ésteres.

En la figura 20B se representan en barras los resultados más altos detectados a las 72 horas, observando que entre TLATF1 y TLATF4, se nota una mejor respuesta con TLATF1, por lo que se seleccionan TLATF1 y 18SATF para continuar trabajando, a razón de que son las dos clonas que muestran mejor producción total de ésteres.

5. Evaluación del número de copias y la expresión del gen *ATF1*.

Para determinar el número de copias del gen *ATF1* presentes en las levaduras transformadas, se realiza un q-PCR, con apoyo del laboratorio estatal de salud pública, a través de Marco Iván Valle Maldonado. En la tabla 12, se muestran los resultados de los CT (ciclos umbrales) promedio de 4 experimentos diferentes y el resultado del número de copias de acuerdo a la fórmula indicada a continuación:

$$Copias = 2^{(\Delta CT_{act}) - (\Delta CT_{atf})}$$

Tabla 12. Números de copias del gen *ATF1* en TLATF y 18SATF.

CEPA	CT ACTINA	CT ATF1	COPIAS
Control	14.28 ± 0.16	27.31 ± 0.25	1
TLATF	14.14 ± 0.11	26.15 ± 0.08	2.03 ~ 2
18SATF	14.11 ± 0.12	25.53 ± 0.09	3.05 ~ 3

Se muestra promedio y desviación estándar de 4 experimentos.

Los resultados indican que la cepa silvestre muestra una sola copia del gen *ATF1*, tal como indica *Lertwattanasakul* en 2015; mientras que la cepa TLATF muestra dos copias del gen y 18SATF tres.

Para evaluar la expresión del gen *ATF1* en las dos clonas seleccionadas previamente por determinación de ésteres totales, se realiza RT-PCR en tiempo real, igualmente, con apoyo de Marco Iván Valle Maldonado; haciéndolo en diferentes tiempos de fermentación, con el fin de determinar el nivel de ARN mensajero presente en la célula a los distintos tiempos fermentativos. Los resultados se muestran en la figura 22.

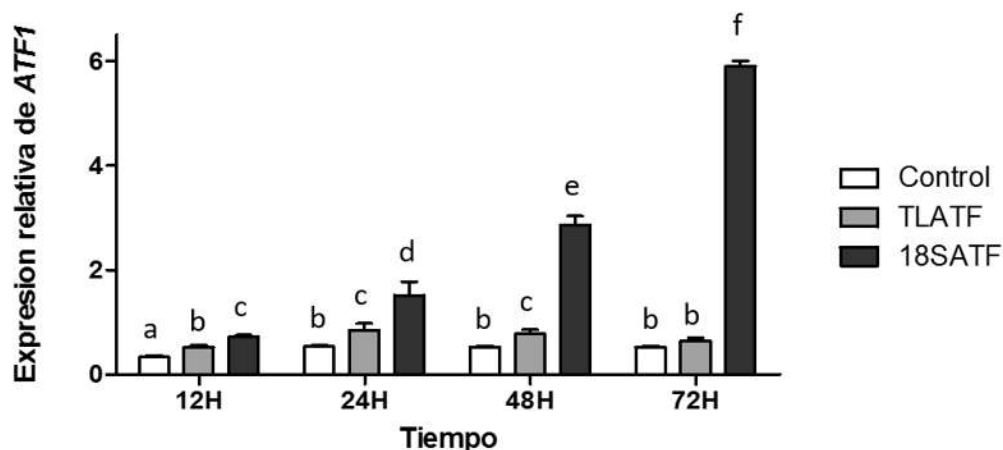


Figura 22. Expresión de *ATF1*. Gráfica que muestra los resultados de la expresión del gen *ATF1* respecto a Actina en *Kluveromyces marxianus*. Se muestra el promedio y la desviación estándar de 3 experimentos.

Como puede observarse, respecto al control existe poca diferencia de la expresión del gen en la clona TLATF para los tiempos 12, 24 y 48 H, no así para las 72 H; mientras que la expresión por 18ATF, tiene un incremento sucesivo con relación al tiempo; por lo que esta alta expresión sugiere que la actividad de la alcohol acetil transferasa también podría mostrar un incremento, aumentando así la producción de ésteres en la fermentación.

6. Fermentaciones en medio YPD.

Para realizar las fermentaciones, se usaron levaduras de una resiembra fresca (fig. 23), para asegurar con esto que la fermentación se realiza de forma adecuada con levaduras jóvenes. Para poder comenzar con una DO 600 nm inicial igual en todos los frascos, se realizó primero un preinóculo, en tubo de ensaye, con 10 mL de medio YPD 2% y se dejó en agitación constante toda la noche.

Las fermentaciones en laboratorio se realizaron por triplicado para cada experimento, en frascos de vidrio de 118 mL de capacidad, tapados no herméticamente, para permitir el flujo de gases; con un volumen de medio YPD 10% de 90 mL (fig. 25), inoculadas a una DO 600 nm inicial de 0.1 en cada uno de los frascos, se mantuvieron en incubadora a 30 °C con agitación manual eventual.

Se hizo toma de muestra a diferentes tiempos, en esterilidad para mantener la fermentación en proceso sin contaminación. Comenzando desde tiempo cero, donde se revisó en microscopio para verificar que la morfología de las levaduras e inocuidad del medio (fig. 24).

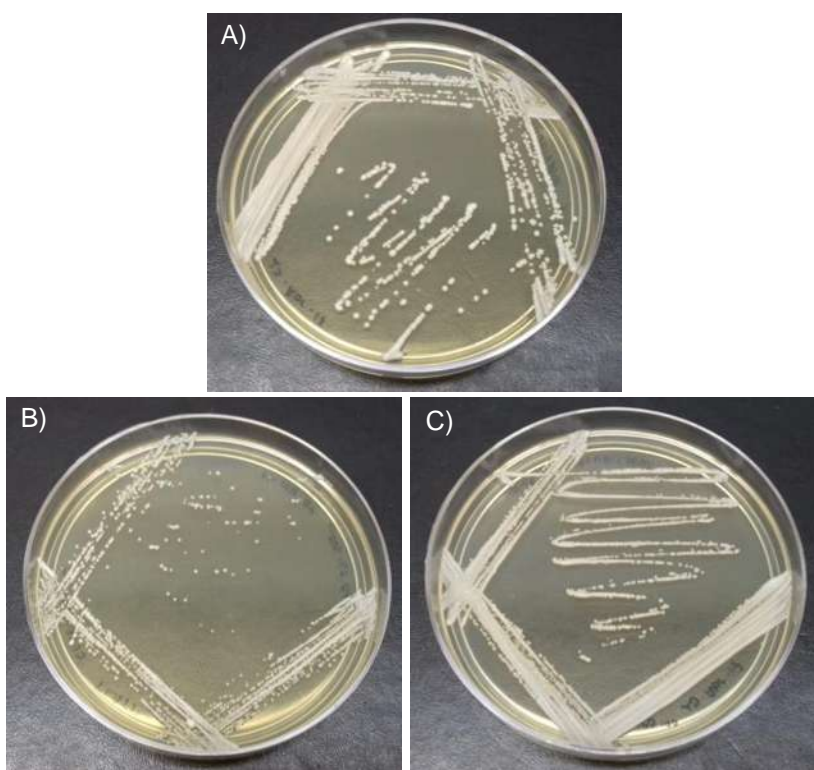


Figura 23. Levaduras en agar YPD. En las fotografías se muestran las levaduras utilizadas para la inocular los medios de fermentación, donde A) Levadura silvestre, utilizada como control, B) TLATF y C) 18SATF.

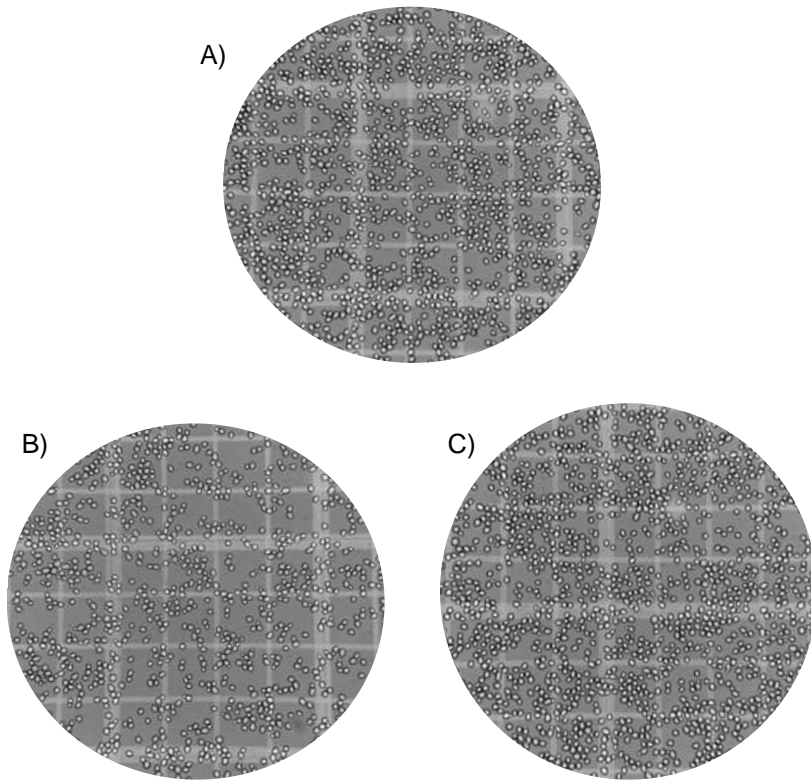


Figura 24. Morfología celular. En las fotografías se muestra la morfología de las levaduras mostrada al microscopio a 40X; donde A) Control, B) TLATF y C) 18SATF.



Figura 25. Biorreactores en fermentación. En la imagen se muestran los frascos utilizados como biorreactores para las fermentaciones llevadas a cabo en el laboratorio con medio YPD 10%. La foto fue tomada a las 48 H de fermentación, por lo que ya no contiene el volumen inicial.

7. Cinética de crecimiento.

Para obtener la cinética de crecimiento de las levaduras durante la fermentación, se midió con espectrofotómetro la densidad óptica a longitud de onda de 600 nm, de muestras del medio de cultivo a diferentes tiempos de fermentación.

Previamente, con un cultivo celular independiente de las fermentaciones, se hacen pruebas con diluciones del mismo, midiendo la DO 600 nm y haciendo un conteo celular en microscopio con cámara de Neubauer, como se indica en materiales y métodos, para determinar la relación entre DO y células en el medio; en donde se obtienen y grafican los siguientes resultados.

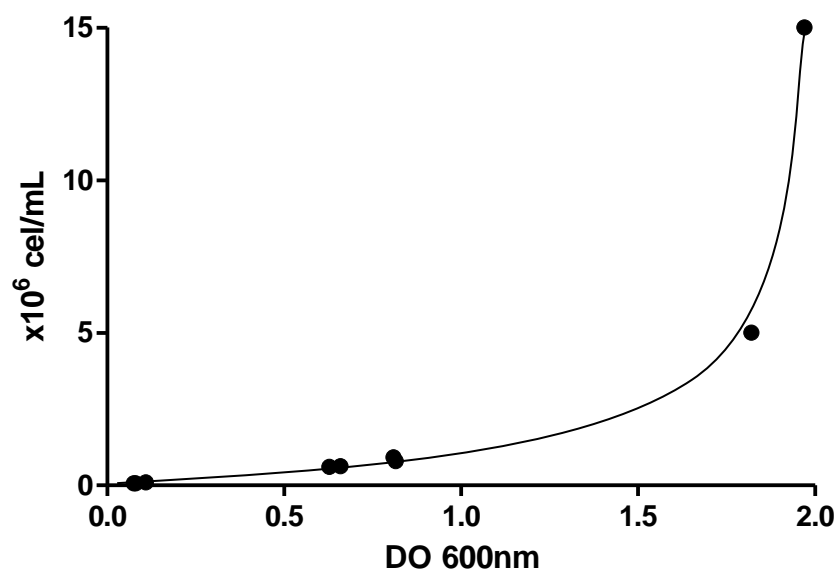


Figura 26. Correlación entre DO 600 nm y células por mililitro, para *Kluyveromyces marxianus*. Gráfica que muestra la relación no lineal entre la densidad óptica medida por espectrofotómetro a 600 nm y la cantidad de células presentes en el medio de cultivo analizado.

De acuerdo a lo observado en la curva de correlación anterior, se determina que hasta una DO 600 nm = 1.0 existe una relación lineal, pero a partir de este dato, la relación es no lineal, por lo que para la cinética de crecimiento se mide la densidad óptica de forma directa a valores ≤ 1.0 y en diluciones 1:10 a valores > 1.0 ;

posteriormente se hace conteo celular de 6 diferentes muestras, determinando que la relación media es de:

$$X \frac{cel}{mL} = (DO_{600} medido) \times (2.5 \times 10^7)$$

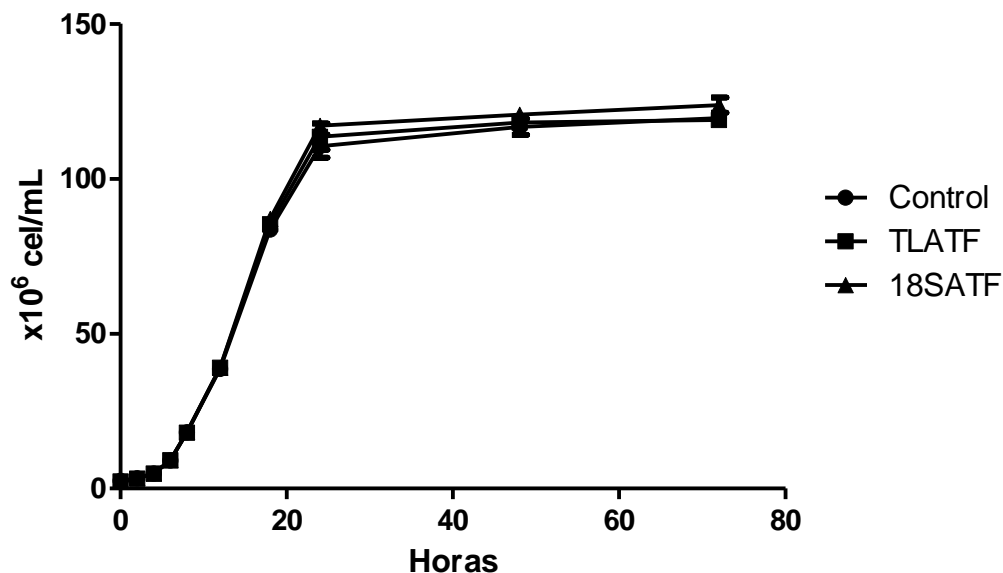


Figura 27. Cinética de crecimiento celular de *Kluyveromyces marxianus* en condiciones fermentativas. Gráfica de cinética, en condiciones fermentativas de las cepas control, TLATF y 18SATF. Se grafica la media y la desviación estándar, n = 3; análisis de varianza ANOVA de una vía, tukey; p ≤ 0.05.

Como se puede observar no existe diferencia entre las cinéticas de crecimiento de las tres cepas, por lo que cualquier diferencia en la concentración de compuestos volátiles evaluada posteriormente, no está determinada por la cantidad de biomasa en el medio y se puede también concluir que las transformaciones genéticas no afectaron el ciclo celular de las levaduras ni su morfología macroscópica y microscópica, como puede observarse en las figuras 23 y 24.

8. Viabilidad celular.

La viabilidad celular en el medio de cultivo, se tomó por citometría de flujo a las 72 horas de fermentación, para determinar el porcentaje de levaduras vivas en el medio. Se tomó como control de células muertas, muestra expuesta a calor, a una temperatura de 80°C durante 10 minutos, obteniendo para esta muestra una viabilidad de 1.5% de células vivas. Los datos de la viabilidad de las tres cepas, se muestran en la siguiente gráfica.

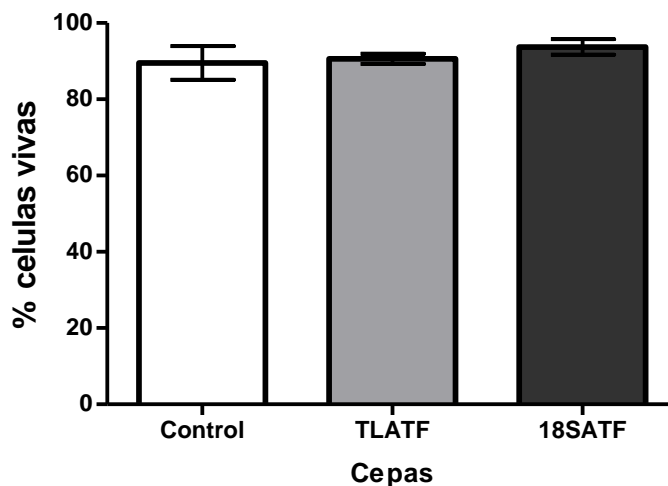


Figura 28. Viabilidad celular. Grafica que muestra la viabilidad celular a las 72 horas de fermentación, medido por citometría de flujo. Se realizó análisis de varianza ANOVA de una vía, Bonferroni; $n = 3$; $p \leq 0.05$.

Como se observa, no existe diferencia estadísticamente significativa, por lo que se concluye que a las 72 horas de fermentación y con las mismas condiciones, tanto la cantidad de células presentes en el medio, como la cantidad de células vivas en él, es igual para las tres cepas.

9. pH durante la fermentación.

Con el fin de monitorear el cambio de pH durante la fermentación, se hace toma de muestra del medio de cultivo de las tres cepas a diferentes tiempos, obteniendo la siguiente gráfica:

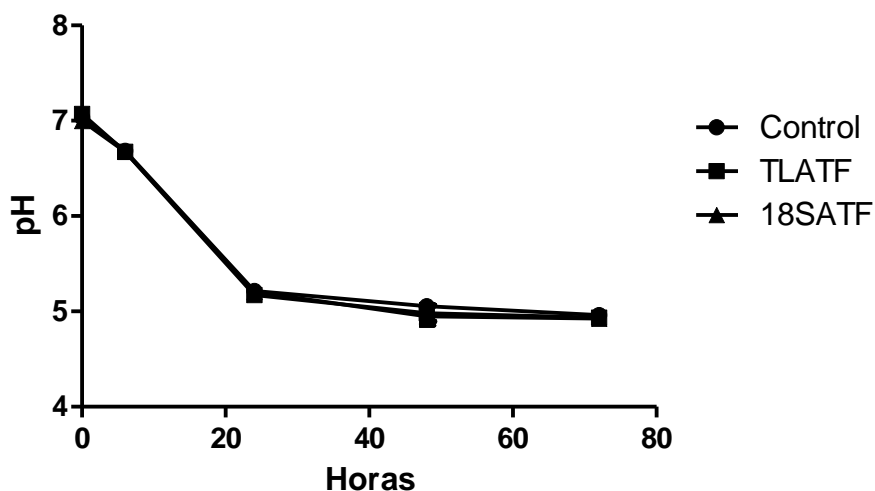


Figura 29. pH del medio de cultivo durante la fermentación. Gráfica que muestra los cambios de pH a diferentes tiempos de fermentación.

Observando con esto que el pH en el medio se va acidificando conforme al tiempo, tal como en una fermentación alcohólica cotidiana ocurre, no existiendo diferencias entre los medios fermentados con cualquiera de las tres cepas, lo que nos indica que el proceso de acidificación del medio durante la fermentación se conserva en las cepas transformadas y que cualquier variación de compuestos volátiles en el medio de fermentación con una cepa respecto a otra, no será determinado por factores de estrés debido a diferencias en el pH.

10. Consumo de glucosa – Producción de etanol.

Para medir el consumo de glucosa durante la fermentación y la producción acumulada de alcohol durante el mismo proceso, se analizaron por HPLC muestras del medio de fermentación a diferentes tiempos, con las condiciones indicadas en materiales y métodos; corriendo previamente muestras preparadas a diferentes concentraciones de glucosa-etanol para obtener curva de calibración.

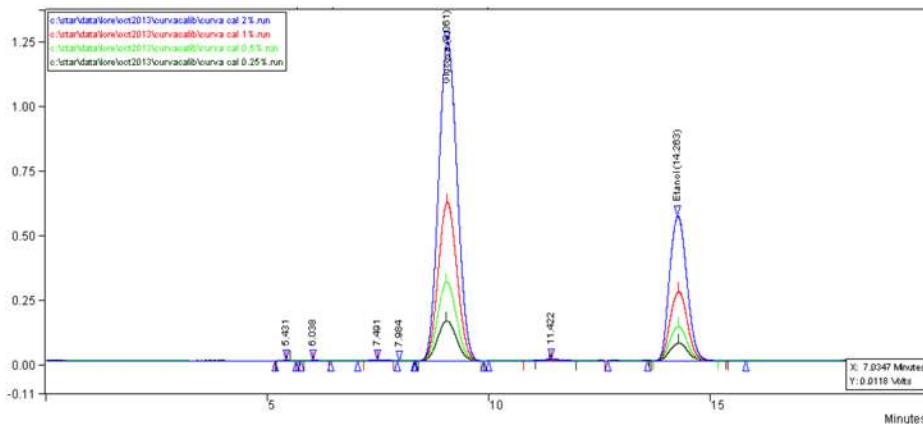


Figura 30. Curva de calibración glucosa-etanol por HPLC. Gráfica a diferentes concentraciones glucosa-etanol.

Obtenidos los datos del área bajo la curva de los picos obtenidos en el HPLC y su relación en concentración de glucosa-etanol, se grafican los resultados:

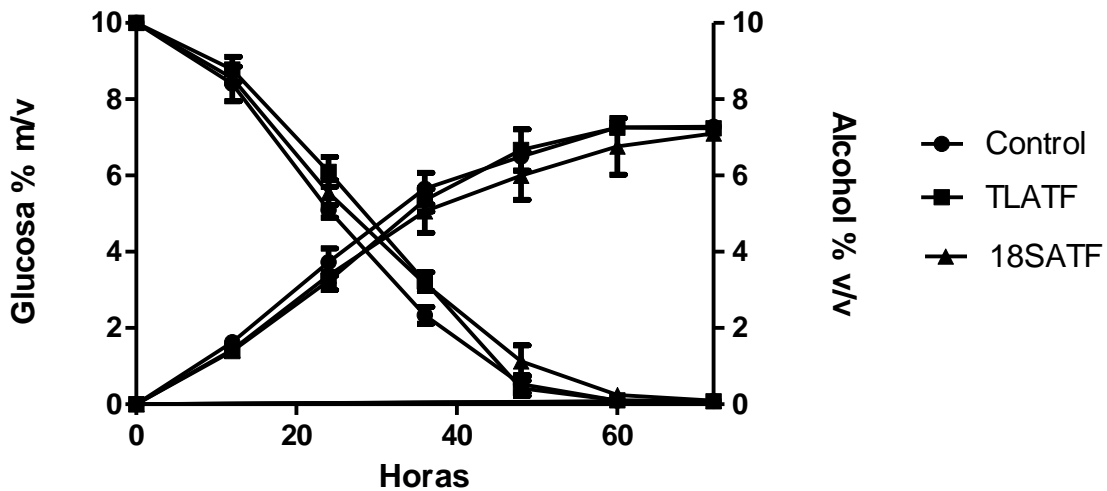


Figura 31. Glucosa-Etanol. Gráfica que muestra en el eje Y izquierdo consumo de glucosa en % masa/volumen y eje Y derecho producción de etanol en % volumen/volumen. Se grafica media y desviación estándar de n=3.

Como puede observarse, tanto en el consumo total de glucosa, como en la producción de etanol, no existen diferencias significativas de la cepa control con las dos transformadas; por lo que las transformaciones genéticas no generaron una alteración en la producción de etanol durante el proceso fermentativo.

11. Determinación de parámetros fermentativos.

Tomando como base los datos obtenidos tanto en la cinética de crecimiento, como en la producción de etanol y el consumo de sustrato, se calculan los parámetros fermentativos de las tres cepas con base a la ecuación de Monod; donde la velocidad máxima de crecimiento, la tasa de crecimiento máxima y el tiempo de duplicación celular, se calcularon en base a la cinética; el rendimiento de sustrato para la generación de biomasa, tomando en cuenta el consumo de glucosa y la biomasa en peso seco; el máximo consumo de glucosa, máxima producción de etanol y la eficiencia teórica de etanol, con los datos de producción de etanol y consumo de glucosa obtenidos por HPLC. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 13. Parámetros fermentativos.

PARÁMETRO		CONTROL	TLATF	18SATF
Velocidad de crecimiento máxima	V_{max} * (cel·hr ⁻¹) X10 ⁶	5.98 ± 4.7%	6.21 ± 5.2%	6.50 ± 0.91%
Tasa de crecimiento máxima	μ_{max} * (hr ⁻¹)	0.155 ± 0.007	0.159 ± 0.008	0.166 ± 0.005
Tiempo de duplicación celular	T (hr)	4.47 ± 0.21	4.35 ± 0.22	4.16 ± 0.20
Acumulación de biomasa peso fresco	(mg·mL ⁻¹)	9.44 ± 0.21	9.52 ± 0.14	9.67 ± 0.17
Acumulación de biomasa peso seco	(mg·mL ⁻¹)	2.83 ± 0.07	2.73 ± 0.06	2.77 ± 0.07
Rendimiento sustrato p/ biomasa	Y_{s total} (gr·gr ⁻¹)	0.0270 ± 0.0012	0.0269± 0.0013	0.0281± 0.0013
Máximo consumo de glucosa	g·(L·h) ⁻¹	2.75 ± 0.22	2.47 ± 0.18	2.50 ± 0.20
Máxima producción de etanol	g·(L·h) ⁻¹	1.16 ± 0.09	1.02 ± 0.08	1.07 ± 0.08
Eficiencia teórica producción de etanol	%	92.75 ± 1.13	91.78 ± 0.34	90.65 ± 1.30

Tabla que muestra los parámetros fermentativos calculados, la media y la desviación estándar de n=3.
* Velocidad máxima de crecimiento entre 12 y 24 horas de fermentación.

12. Determinación de compuestos orgánicos volátiles en medio YPD.

Para poder conocer y comparar los compuestos orgánicos volátiles presentes en el medio de fermentación se hace una extracción líquido-líquido de muestras del medio libre de células a las 72 horas de fermentación, con diclorometano como solvente y adicionando 2-pentanol como compuesto normalizador.

El extracto se analiza por cromatografía de gases con detector de ionización de flama (FID), con las condiciones indicadas en materiales y métodos. Se obtiene la abundancia relativa con el área bajo la curva de un total de 79 compuestos, normalizando los datos; las fermentaciones se llevaron a cabo por triplicado en dos experimentos independientes; se muestra un ejemplo de un cromatograma comparativo con las abundancias de los compuestos detectados en el medio fermentado por las tres cepas (fig 33).

Con los datos de las abundancias relativas obtenidas de los compuestos se hace un diagrama de correlación con el software STATISTICA, en el cual se correlacionan los datos de las abundancias de los tres medios fermentados con la levadura control y las dos transformadas, de todos los compuestos (fig. 34); en la gráfica se observa en la dimensión 1 el 80.38% de inercia y en la dimensión 2 el 19.62%; identificándose un grupo de datos a la izquierda del centro de gravedad de la gráfica, coordenada (0, 0), en medio de las coordenadas de la ubicación de las tres cepas, encerrados en un óvalo negro los datos que son coincidentes con las tres cepas, es decir, que no cambian durante la fermentación realizada con cualquiera de las tres. A la izquierda de la gráfica en óvalo verde se muestran los compuestos que son más abundantes en las fermentaciones con la cepa control que con las dos transformadas. La segregación de datos de numerosos compuestos con tendencia a las dos transformadas, dentro del óvalo azul, son los compuestos que incrementan en la fermentación de medio YPD con las cepas transformadas, con una inercia más marcada hacia 18SATF.

Una vez que se tuvieron los datos de abundancia relativa de los compuestos (picos) observados en los cromatogramas obtenidos por CG-FID, se analizan dos muestras por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, para determinar a qué compuesto corresponde cada uno de los picos del cromatograma. Se muestra un ejemplo de la visión de pantalla de la identificación de compuestos del análisis de gases-masas, usando la base de datos NIST-MS, de la biblioteca de datos 2014 (fig. 32), donde se observa el tiempo de retención, el análisis de iones, el nombre del compuesto, la fórmula química, un listado de sinónimos del compuesto y los índices de retención para columnas polares y no polares; que para nuestro caso, se toma el dato basado en columna polar (ZB-WAXPlus ZEBRON), donde las unidades fueron

estimadas por el índice de retención de Kovats, representando el intervalo de confianza.

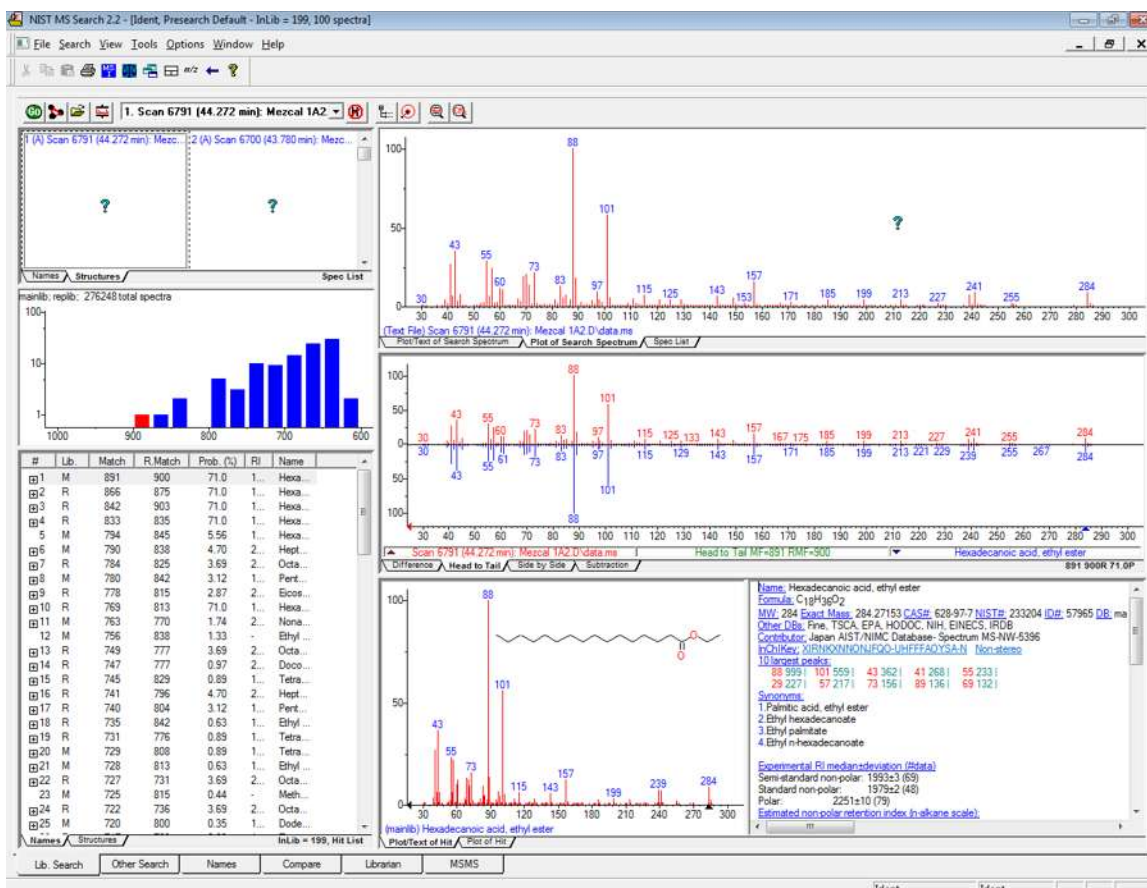


Figura 32. Reporte CG-masas. Ejemplo de la vista en pantalla del reporte de espectrometría de masas de NIST MS search 2.2, donde se observa el tiempo de retención, el reporte de los iones detectados, el comparativo con el compuesto de referencia, el nombre, fórmula química, peso molecular, número CAS y sinónimos del compuesto; los índices de retención para columnas no polares y polares, con su intervalo de confianza.

Los resultados del análisis de espectrometría de masas, junto con las abundancias obtenidas con cromatografía de gases acoplado a índice de detector de ionización de flama, se representan en la tabla 14, donde la abundancia relativa está expresada como unidades de área (mV), se representa la media de 6 datos y su coeficiente de error estándar expresado en porcentaje (%EE).

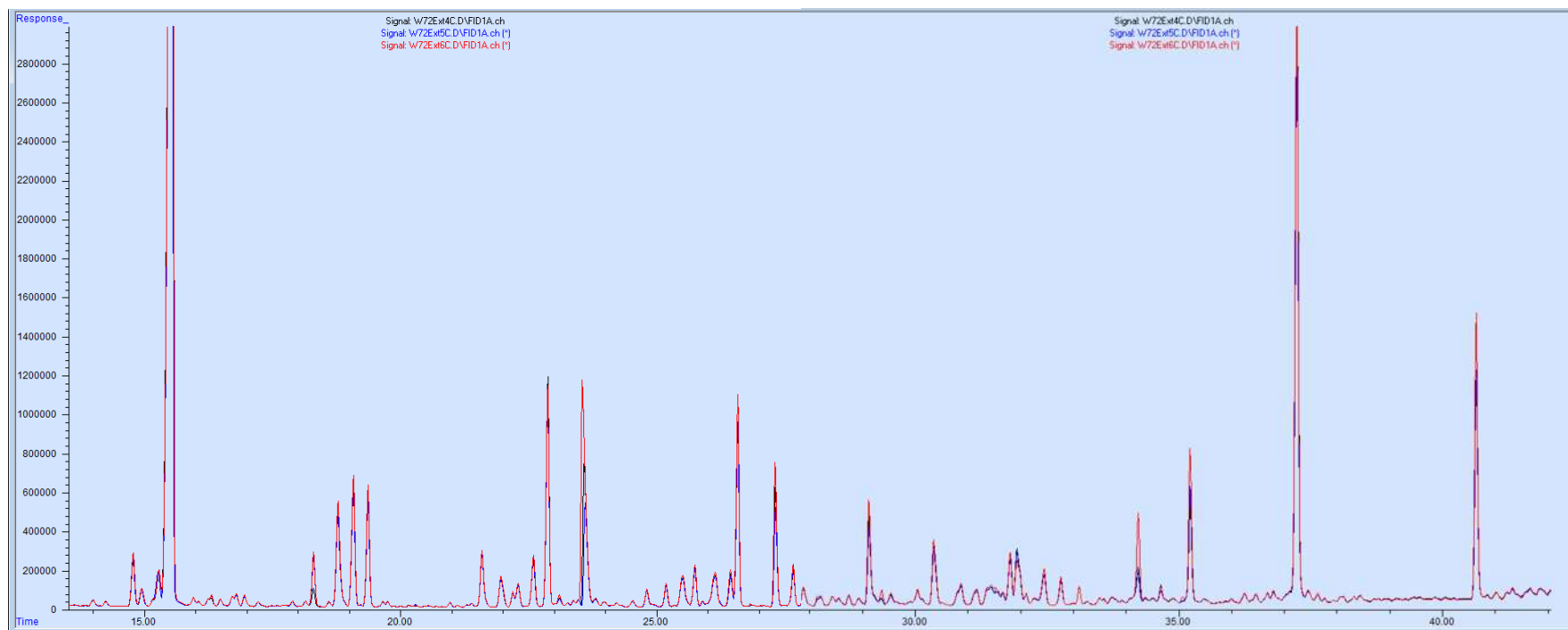


Figura 33. Cromatograma comparativo. Sección de un cromatograma empalmado, donde en línea negra representa al control, en azul a TLATF y en rojo a 18SATF

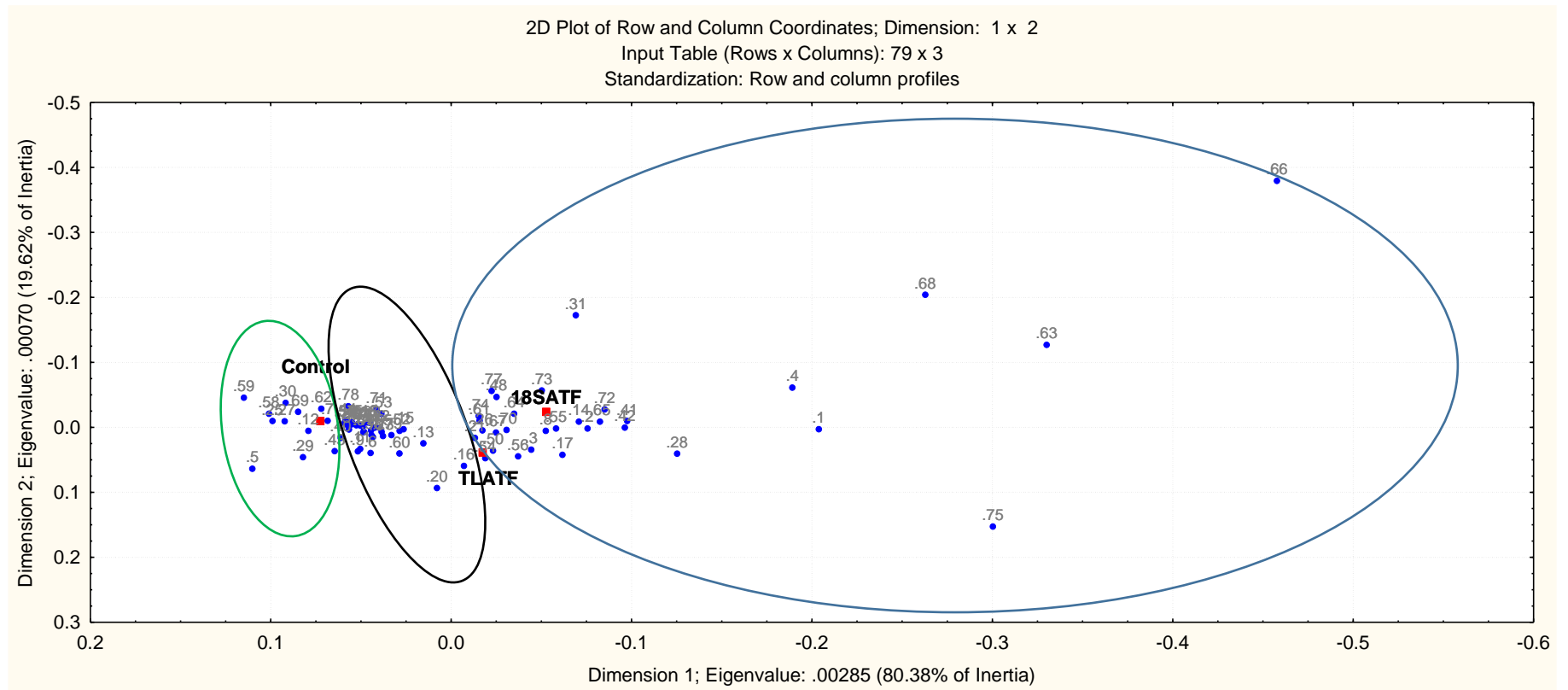


Figura 34. Análisis de Correlación. Gráfica que representa un análisis de correlación de las abundancias relativas de los compuestos detectados en los caldos de fermentación de medio YPD de las tres cepas a las 72 horas de fermentación; los puntos azules representan cada compuesto y los cuadros rojos representan las tres cepas. En óvalo negro se agrupan los compuestos que se mantienen sin cambios en las fermentaciones; en verde, se agrupan los compuestos que bajan en fermentación con las transformantes respecto al control y en azul los compuestos que aumentan con las dos transformantes respecto al control.

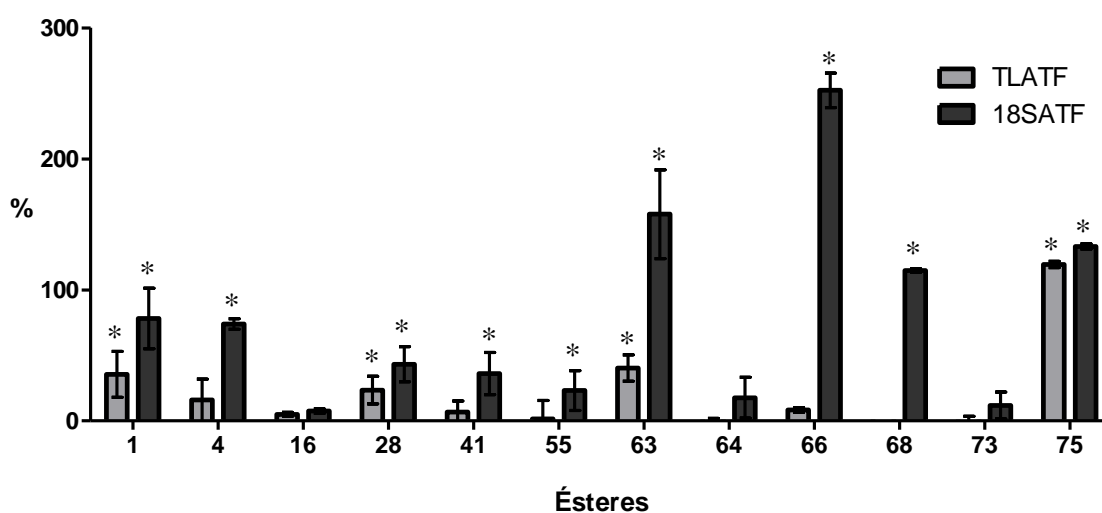
Tabla 14. Compuestos Orgánicos Volátiles en YPD. Análisis de compuestos volátiles minoritarios identificados en el medio de fermentación por *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1, por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

Compuesto No.	Tiempo de Retención (min)	Nombre del Compuesto	Índice de retención	UMPe-1 Control		Abundancia relativa		18SATF	
				Media	%E.E.	TLATF Media	%E.E.	Media	%E.E.
1	4.5	Acetato de etilo	800 ± 8	163,522	0.11	221,546	0.16	291,308	0.18
2	7.3	Acetal	892 ± 8	16,648	0.01	17,437	0.01	21,385	0.01
3	7.4	Metanol	903 ± 8	44,535	0.03	46,790	0.03	52,254	0.03
4	7.7	Acetato de isobutilo	1012 ± 8	13,915	0.01	16,132	0.01	24,205	0.01
5	7.8	2-Pentanona	981 ± 11	515,601	0.33	442,835	0.31	410,158	0.25
6	8.0	4-Metildecano	1030 ± 25	1,328,396	0.86	1,211,193	0.85	1,255,231	0.75
7	8.1	2,6 Dimetilnonano	1034 iu	1,664,096	1.07	1,334,991	0.94	1,533,421	0.92
8	8.5	1,8-Nonadien-3-ol	1058 iu	44,876	0.03	45,366	0.03	54,424	0.03
9	8.6	2-Hexanona	1083 ± 9	66,143	0.04	59,370	0.04	61,573	0.04
10	8.8	2-Metil-2-butanol	1008 ± 12	111,809	0.07	97,757	0.07	107,562	0.06
11	8.9	Triclorometano	1022 ± 6	231,035	0.15	206,579	0.15	216,157	0.13
12	9.0	2,4,6-Trimetildecano	1121 iu	147,277	0.09	119,594	0.08	131,141	0.08
13	9.1	2-Butanol	1025 ± 11	129,183	0.08	120,378	0.08	131,965	0.08
14	9.6	1-Propanol	1036 ± 9	876,115	0.56	891,895	0.63	1,117,355	0.67
15	9.7	7-Metil-4-deceno	1059 iu	293,305	0.19	258,003	0.18	295,556	0.18
16	10.6	Ácido butanoico 3 metil etil éster	1068 ± 8	99,160	2.12	102,043	3.02	104,885	3.96
17	11.3	2-Metil-1-propanol	1092 ± 9	3,751,606	2.42	4,123,974	2.91	4,576,573	2.75
18	11.7	1,4-Dimetilcyclooctano	1081 iu	992,641	0.64	828,671	0.58	960,669	0.58
19	11.8	2,7-Dimetil-1-octanol	1130 iu	1,242,329	0.80	1,035,517	0.73	1,182,263	0.71
20	13.2	1-Butanol	1142 ± 11	330,240	0.21	351,149	0.25	330,079	0.20
21	13.9	2-Hexanol	1220 ± 16	96,030	0.06	92,485	0.07	105,448	0.06
22	14.2	5-Etildecano	1150 iu	63,029	0.04	53,963	0.04	61,657	0.04

23	14.7	Ciclopentanona	1174 ± 16	718,505	0.46	632,285	0.45	700,979	0.42
24	14.8	3,9-Dimetilundecano	1185 iu	303,092	0.20	251,379	0.18	285,271	0.17
25	15.1	D-Limoneno	1200	672,102	0.43	514,682	0.36	577,486	0.35
26	15.4	3-Metil-1-butanol	1209 ± 9	43,295,081	27.89	41,123,037	29.00	48,308,997	29.03
27	15.9	Dodecano	1214 iu	123,713	0.08	95,778	0.07	107,931	0.06
28	16.3	Ácido hexanoico, etil éster	1233 ± 9	198,739	0.13	245,500	0.17	284,721	0.17
29	17.1	2-(Octiloxo)etanol	1285 ± 3	108,365	0.07	94,239	0.07	93,307	0.06
30	17.8	2,6,11-Trimetildodecano	1275 iu	109,326	0.07	80,287	0.06	97,194	0.06
31	18.2	Acetoina	1284 ± 12	675,257	0.43	488,322	0.34	912,818	0.55
32	18.7	1-Butil-2-propilciclopentano	1219 iu	1,883,748	1.21	1,578,156	1.11	1,827,947	1.10
33	19.0	2,4,6-trimetil-1,3-ciclohexanediona	1245 iu	2,148,515	1.38	1,786,762	1.26	2,051,571	1.23
34	19.3	2,4-Dietil-1-heptanol	1229 iu	1,733,626	1.12	1,451,112	1.02	1,658,266	1.00
35	21.5	4,6-Dimetildodecano	1285 iu	1,011,975	0.65	879,059	0.62	989,156	0.59
36	21.9	2,3,5,8-Tetrametildecano	1318 iu	632,438	0.41	539,612	0.38	615,108	0.37
37	22.1	4,6-Dimetildodecano	1325 iu	245,449	0.16	201,464	0.14	230,646	0.14
38	22.2	2,6,10-Trimetildodecano	1354 ± 6	390,243	0.25	339,069	0.24	375,336	0.23
39	22.5	Tetradecano	1400 iu	832,213	0.54	697,794	0.49	781,713	0.47
40	22.8	Benceno, 1,3-bis(1,1-dimetiletil)	1427 ± 7	2,927,936	1.89	2,495,641	1.76	2,698,960	1.62
41	23.4	Ácido octanoico, etil éster	1435 ± 6	86,329	0.06	92,209	0.07	117,542	0.07
42	23.6	Ácido acético	1449 ± 13	2,381,072	1.53	2,583,977	1.82	3,219,852	1.93
43	24.7	Furfural	1461 ± 11	273,088	0.18	240,080	0.17	246,589	0.15
44	25.1	2-Isopentil-5-propiltiofeno	1416 iu	423,629	0.27	345,162	0.24	399,485	0.24
45	25.4	Etanona, 1-(2-furanil)	1499 ± 10	774,716	0.50	637,994	0.45	735,295	0.44
46	25.7	4-Isopropil-1,7-dimetilciclodecano	1517 iu	740,325	0.48	612,678	0.43	701,071	0.42
47	26.1	2-Hexil-1-decanol	1504 iu	893,689	0.58	765,944	0.54	862,711	0.52
48	26.4	Ácido propanoico	1535 ± 11	626,934	0.40	547,500	0.39	729,950	0.44
49	26.5	2,3-Butanediol	1556 ± 11	3,718,468	2.39	3,182,223	2.24	3,552,820	2.13
50	27.3	2-Metil ácido propanoico	1570 ± 12	2,034,429	1.31	2,064,590	1.46	2,266,235	1.36
51	27.6	5-Metil-2-furancarboxaldehido	1570 ± 10	773,511	0.50	661,499	0.47	738,306	0.44

52	27.8	Hexadecano	1612 iu	446,399	0.29	393,079	0.28	447,019	0.27
53	28.1	2,6,10,15-Tetrametilheptadecano	1660 ± 0	233,593	0.15	192,707	0.14	231,877	0.14
54	29.1	Ácido butanoico	1625 ± 12	1,622,639	1.05	1,668,684	1.18	1,777,630	1.07
55	29.3	Ácido decanoico, etil éster	1638 ± 9	159,607	0.10	161,940	0.11	196,581	0.12
56	30.3	3-Metil ácido butanoico	1666 ± 11	1,304,487	0.84	1,377,419	0.97	1,496,055	0.90
57	30.8	1,2,3,4,5,6-Hexaetilciclohexano	1682 iu	487,780	0.31	398,866	0.28	458,912	0.28
58	31.1	Terpineol	1697 ± 10	475,126	0.31	355,057	0.25	409,441	0.25
59	31.7	4-Heptilanilina	1702 iu	993,063	0.64	692,618	0.49	842,836	0.51
60	31.9	Acetofloroglucina	1691 iu	1,235,410	0.80	1,158,025	0.82	1,212,002	0.73
61	32.4	2-Metil-1-hexadecanol	1890 iu	732,079	0.47	673,909	0.48	820,009	0.49
62	32.7	1-Heptadeceno	1746 ± 7	543,459	0.35	418,813	0.30	502,400	0.30
63	34.1	Ácido acético, 2-feniletil éster	1813 ± 15	493,770	0.32	693,149	0.49	1,272,649	0.76
64	34.6	Ácido dodecanoico, metiletil éster	1827 ± 6	247,732	0.16	231,203	0.16	291,608	0.18
65	35.2	Ácido hexanoico	1846 ± 12	2,280,732	1.47	2,371,591	1.67	2,992,458	1.80
66	35.2	Ácido pentadecanoico 3-metil butil éster	1863 ± 5	32,238	4.07	33,435	3.07	118,889	4.35
67	37.2	Feniletil alcohol	1906 ± 15	12,249,302	7.89	11,851,761	8.36	13,888,965	8.35
68	40.4	Ácido tridecanoico etil éster	2049 ± 11	13,721	3.56	13,680	2.87	29,504	3.67
69	40.6	Ácido octanoico	2060 ± 15	6,625,824	4.27	5,047,848	3.56	5,933,320	3.57
70	44.7	Ácido n-decanoico	2276 ± 14	15,994,775	10.30	15,517,555	10.94	18,425,566	11.07
71	45.3	2,4-Di-tert-butilfenol	2318 ± 10	2,761,683	1.78	2,241,010	1.58	2,734,388	1.64
72	45.5	3-Deoxiestradiol	2300 iu	213,725	0.14	215,531	0.15	284,288	0.17
73	45.7	Ác.10-octilundec-10-enoico, metil éster	2144 iu	478,339	0.31	428,024	0.30	592,894	0.36
74	47.8	2-Hexadecanol	2304 ± 9	440,459	0.28	400,036	0.28	494,273	0.30
75	47.9	Ácido linoleico etil éster	2521 ± 11	92,739	4.34	209,777	3.56	215,942	3.78
76	48.4	Ciclo(leucinaprolina)	2870 ± 0	3,163,437	2.04	2,663,274	1.88	3,032,153	1.82
77	50.3	3,4',5,6'-tetra-tert-butilbifenil-2,3'-diol	3116 iu	1,880,094	1.21	1,604,272	1.13	2,184,722	1.31
78	52.4	Decaetilen glicol	3178 iu	10,923,941	7.04	8,554,737	6.03	10,471,244	6.29
79	55.4	Ácido octadecanoico	3134 ± 13	5,880,908	3.79	5,200,228	3.67	5,805,365	3.49

Una vez identificados todos los compuestos presentes en el medio de fermentación a las 72 horas, con los datos de abundancias de los ésteres, se normalizan a 100% cada uno de ellos respecto al control y se representan en la siguiente gráfica (fig. 35) el incremento porcentual de cada uno de ellos, mostrando en barras gris claro los incrementos con la cepa TLATF y en barra gris oscuro con la cepa 18SATF, observándose que 4 de los ésteres tiene incremento significativo con TLATF, con un promedio de aumento de 21%, mientras que para 18SATF 9 de los 12 ésteres detectados tiene aumento respecto al control, mostrando un incremento máximo para el ácido pentadecanoico 3-metil butil éster de 250% y un promedio de incremento porcentual de todos los ésteres de 79%; determinando con esto que con la cepa 18SATF se tuvo mejor respuesta en la sobreproducción de ésteres en las pruebas con medio YPD.



- 1 Acetato de etilo
- 4 Acetato de isobutilo
- 28 Ácido hexanoico etil éster
- 41 Ácido octanoico etil éster
- 55 Ácido decanoico etil éster
- 63 Ácido tridecanoico propil éster
- 64 Ácido dodecanoico, metiletil éster
- 66 Ácido pentadecanoico 3-metil butil éster
- 68 Ácido tridecanoico etil éster
- 73 Ácido octilundecenoico metiletil éster
- 75 Ácido linoleico etil éster

Figura 35. Cambio porcentual de ésteres en YPD. Gráfica que muestra el incremento en porcentaje de los ésteres detectados en el caldo de fermentación YPD a las 72 horas respecto a los ésteres producidos por UMPe1 silvestre, normalizando cada uno de ellos a 100% para el control y mostrando el incremento a partir de éste. Mostrando en barra gris claro el incremento de los ésteres producidos por TLATF y en barra gris oscuro los producidos por 18SATF. Los números de los ésteres corresponden al número de compuesto de la tabla 14 y se enlistan los nombres. n = 6; ANOVA una vía, post Bartlett's test. $P \leq 0.01$.

13. Aplicación industrial de *Kluyveromyces marxianus* UMPe1 para elaboración de mezcal.

Con los datos obtenidos se determina que en las fermentaciones llevadas a cabo en YPD en laboratorio existe un incremento en la abundancia de ésteres producidos por las levaduras transformadas, siendo mayor para la cepa 18SATF, por lo que se selecciona ésta levadura para continuar con la experimentación.

Para evaluar el efecto de la levadura sobreproductora de ésteres *Kluyveromyces marxianus* UMPe1, cepa 18SATF sobre las características organolépticas de una de las bebidas tradicionales en Michoacán, “el mezcal”; se lleva el inóculo preparado como se indica en materiales y métodos a la empresa productora de mezcal “La flor del mezcal” de Etúcuaro, municipio de Madero, Michoacán; llevándose a cabo el proceso de elaboración artesanal como se muestra en el diagrama de flujo (Fig. 36) y posteriormente en las imágenes de los equipos de la empresa mezcalera (Fig. 37); cuidando cada parte del proceso en la empresa por el maestro mezcalero José Luis Sánchez Ibáñez.

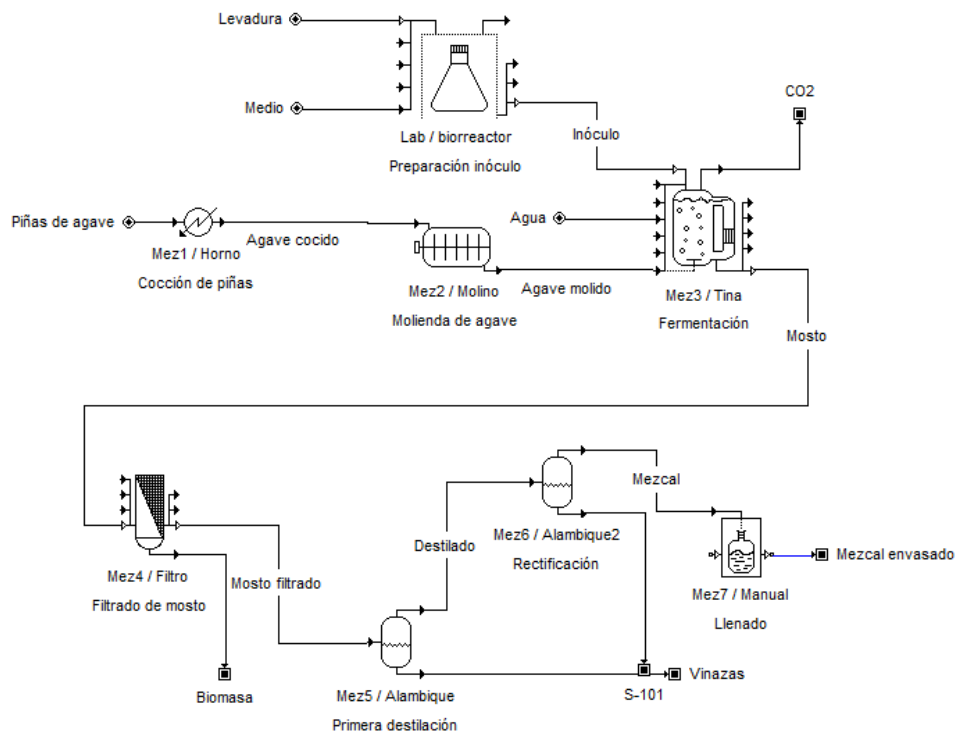


Figura 36. Diagrama de flujo representativo del proceso de elaboración del mezcal. Elaborado en el software de simulación de procesos SuperPro Designer 9.0.

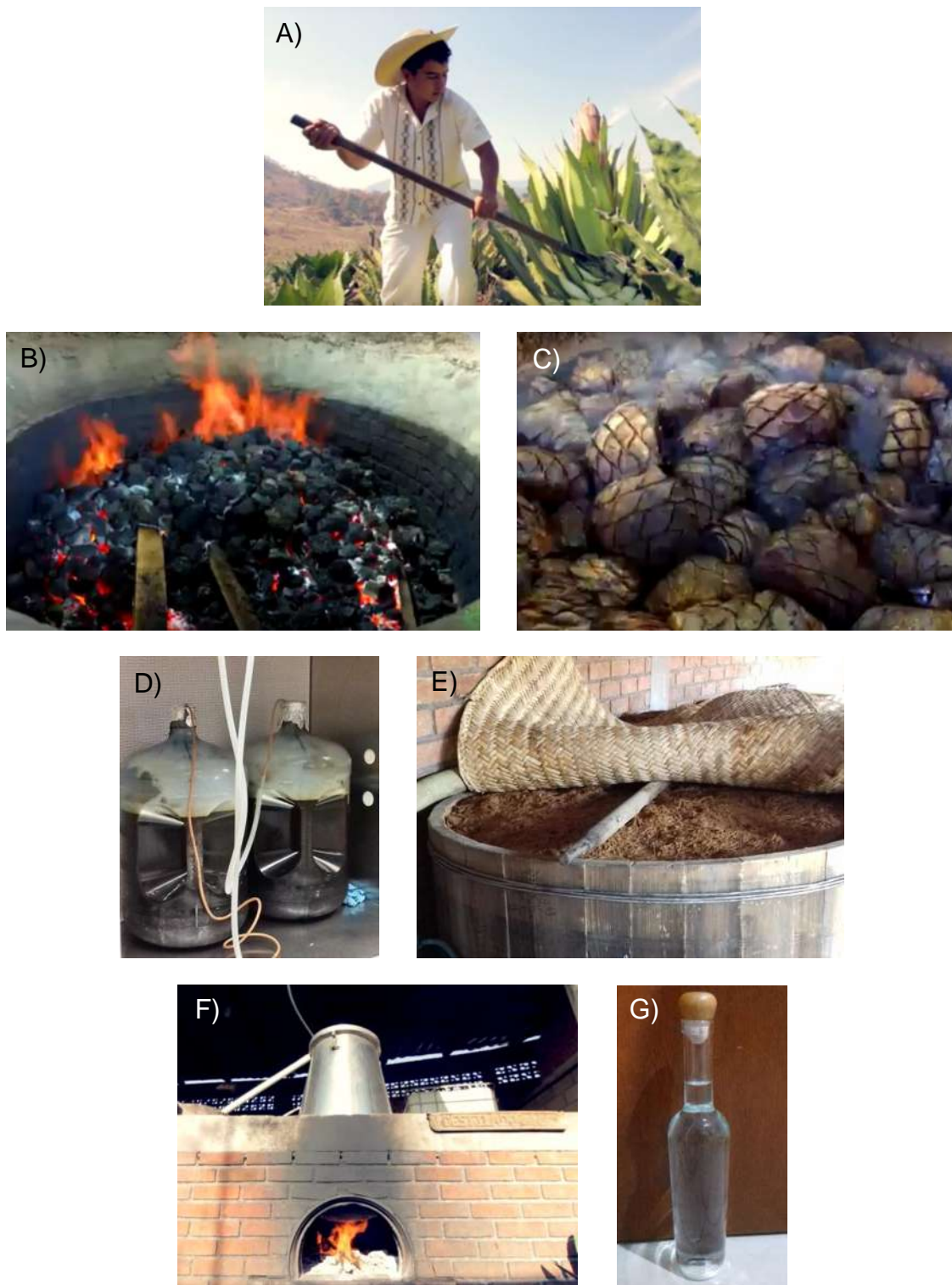


Figura 37. Imágenes de elaboración del mezcal. Secuencia de imágenes que representan el proceso de elaboración artesanal del mezcal que se elaboró para este trabajo en la fábrica “La flor del mezcal”; donde A) Jima del agave cupreata, B) Imagen del horno ancestral usado para la cocción de las piñas de agave, C) Piñas de agave cocidas que posteriormente se trituran para entrar a destilación, D) Inóculos usados para la fermentación producidos con miel de agave a $\sim 4^\circ$ Brix, uno con UMPe1 silvestre usado como control y el otro con UMPe1 18SATF; E) Tina de fermentación en proceso; F) Destilado en alambique; G) Producto terminado (Mezcal 45° GL).

Obtenido el mezcal, se hace una extracción líquido-líquido de 5 mL de cada muestra de mezcal por duplicado, con diclorometano como solvente y 2-pentanol como compuesto normalizador para ser analizado por cromatografía de gases acoplado a detector de ionización de flama y con esto obtener la abundancia relativa de los compuestos detectados; adicionalmente se analizan las muestras por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas para identificar cada uno de los 84 compuestos detectados; todos estos procesos con las condiciones indicadas en materiales y métodos. Con las abundancias obtenidas se hace una gráfica de correlación lineal (Fig. 38), relacionando los datos del mezcal producido con la cepa control contra el mezcal de la cepa transformada 18SATF.

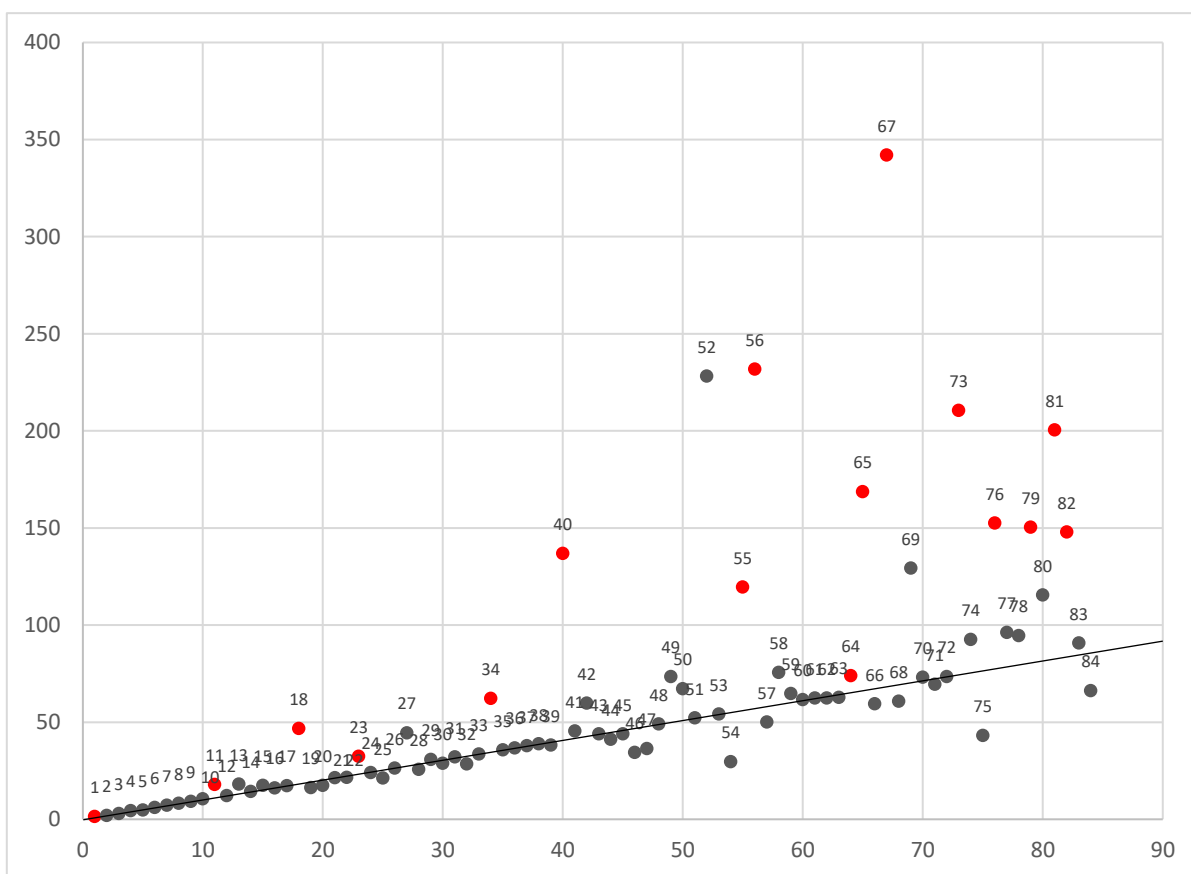


Figura 38. Correlación lineal de mezcales. Gráfica de correlación lineal, donde se muestra la correlación que existe entre las abundancias de los compuestos producidos por la cepa control UMPe1 contra los producidos por la transformada 18SATF; la línea muestra la tendencia de los compuestos que no tienen cambios durante la fermentación con ambas cepas; los que se encuentran por arriba de la línea son los compuestos que son más abundantes en el mezcal de 18SATF; los puntos marcados en rojo son los ésteres.

En la tabla 15 se muestran los datos obtenidos: tiempo de retención, nombre del compuesto, índice de retención, abundancias relativas, cuantificación en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ basados en la curva de calibración de alcoholes y el error estándar en porcentaje.

Tabla 15. Compuestos Orgánicos Volátiles en mezcal. Análisis de compuestos volátiles minoritarios identificados en mezcal, producto destilado de fermento por *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 en mosto de agave cupreata, por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

Compuesto No.	Tiempo de Retención (min)	Nombre del Compuesto	Índice de retención	UMPe1 Control			UMPe1 18SATF		
				Abundancia (mV)	Cantidad (mg·L ⁻¹)	E.E. (%)	Abundancia (mV)	Cantidad (mg·L ⁻¹)	E.E. (%)
1	4.6	Acetato de etilo	800 ± 8	272,030	6.54	0.65	374,955	9.01	4.86
2	8.4	4-Metildecano	1030 ± 25	94,691	1.28	2.43	94,267	1.28	1.85
3	8.5	2,6 Dimetilnonano	1034 iu	55,005	0.75	2.32	54,272	0.74	1.28
4	9.0	1,8-Nonadien-3-ol	1058 iu	4,235	0.06	4.57	4,703	0.07	0.98
5	9.1	2-Hexanona	1083 ± 9	11,438	0.28	1.96	10,822	0.27	3.19
6	9.2	2-Metil-2-butanol	1008 ± 12	8,412	0.20	4.71	8,581	0.21	2.11
7	9.3	Triclorometano	1022 ± 6	7,818	0.14	4.23	8,025	0.14	2.09
8	9.5	2,4,6-Trimetildecano	1121 iu	43,000	0.49	4.60	43,888	0.50	1.81
9	9.7	2-Butanol	1025 ± 11	9,006	0.26	5.00	9,198	0.26	2.32
10	10.0	1-Propanol	1036 ± 9	3,942,556	138.93	1.70	4,170,210	146.95	0.80
11	10.5	Ácido butanoico 3 metil etil éster	1068 ± 8	12,836	0.21	1.62	20,920	0.34	2.98
12	10.6	3-Metilbutanal, dietil acetal	1065 ± 3	9,706	0.13	3.66	9,903	0.13	1.57
13	11.1	2,7-dimetil, 1-octanol	1130 iu	20,734	0.28	2.58	29,033	0.39	2.74
14	11.2	3,7-Dimetil-1-octanol	1130 iu	30,326	0.41	4.73	31,015	0.42	1.99
15	11.6	Isobutanol	1092 ± 9	18,891,105	539.75	1.61	22,034,277	629.55	0.88
16	11.7	1,4-Dimetilciclooctano	1081 iu	43,291	0.65	5.75	43,930	0.66	1.31
17	11.9	2,7-Dimetil-1-octanol	1130 iu	157,052	2.10	6.33	159,382	2.13	1.85
18	12.2	Acetato de isoamilo	1122 ± 7	49,053	0.80	5.59	127,340	2.07	1.54
19	13.2	1-Butanol	1142 ± 11	332,945	9.51	0.85	285,796	8.17	1.27
20	14.7	Ciclopentanona	1174 ± 16	468,575	11.79	0.16	410,262	10.33	1.46

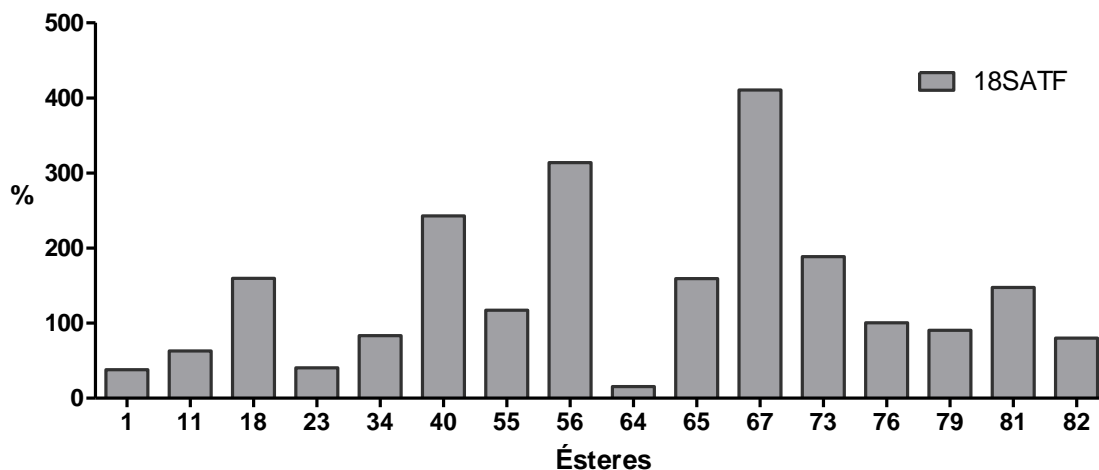
21	14.9	3,9-Dimetilundecano	1185 iu	158,961	1.83	4.82	162,365	1.87	2.20
22	15.7	Alcohol isoamílico	1209 ± 9	159,477,817	3831.61	0.45	156,024,637	3748.64	1.27
23	16.2	Ácido hexanoico etil éster	1233 ± 9	21,916	0.32	2.15	30,827	0.45	1.86
24	16.8	2-Etil, 1-Hexanetiol	1056 iu	96,138	1.39	3.22	96,074	1.39	2.16
25	17.3	Dihidro 3-metil, 2-furanona	1268 ± 15	361,129	7.64	0.25	307,114	6.49	1.48
26	17.8	2,6,11-Trimetildodecano	1275 iu	39,946	0.40	4.46	40,594	0.40	2.20
27	18.1	Acetoina	1284 ± 12	1,026,498	24.66	0.50	1,693,384	40.69	1.30
28	18.6	2-Metil, 1-decanol	1293 iu	238,803	2.94	5.37	219,274	2.70	1.10
29	18.7	Ciclopentanol	1299 ± 16	513,076	12.61	2.02	544,350	13.38	1.86
30	18.9	2-Butil octanol	1277 iu	223,893	2.51	1.72	211,947	2.41	0.86
31	19.1	2,4,6-trimetil-1,3-ciclohexanediona	1245 iu	181,102	2.49	4.00	187,414	2.57	2.03
32	19.4	3-Metil, pentanol	1325 ± 9	107,954	2.24	3.26	96,415	2.00	1.49
33	19.8	2-Heptenal	1323 ± 11	39,031	0.74	4.69	39,720	0.75	2.14
34	20.0	Etil lactato	1347 ± 9	1,627,118	29.15	6.25	2,980,409	53.40	5.88
35	20.3	Ciclopentenona	1345 ± 10	91,340	2.36	5.04	93,296	2.41	2.24
36	21.4	Tetradecano	1400 iu	138,280	1.48	5.05	141,472	1.51	2.26
37	21.7	2,3,5,8-Tetrametildecane	1318 iu	88,960	0.95	4.71	90,950	0.97	2.12
38	22.3	2-Metilciclopentanol	1344 ± 0	77,013	1.63	4.97	78,671	1.66	2.24
39	22.6	4,6-Dimetil dodecano	1325 iu	274,430	2.96	5.33	272,425	2.91	3.56
40	22.9	Ácido octanoico etil éster	1435 ± 6	108,507	1.34	1.93	372,022	4.57	4.11
41	23.0	Ácido acético	1449 ± 13	22,654,098	798.29	4.45	25,124,851	885.35	2.35
42	23.9	Furfural	1461 ± 11	487,958	10.75	0.58	695,183	15.31	1.22
43	24.2	Oxido de linalol	1444 ± 19	68,067	0.85	4.97	69,567	0.87	2.16
44	25.3	Acetil furano	1499 ± 10	582,248	11.19	1.90	545,926	10.49	2.60
45	25.5	2 hexil 1 decanol	1504 iu	109,305	0.95	2.71	106,839	0.93	0.71
46	26.1	Ácido propanoico	1535 ± 11	617,636	17.65	1.47	461,925	13.20	0.86
47	26.3	Butanediol	1556 ± 11	230,476	5.41	2.61	178,837	4.20	2.13
48	26.6	2,3-Dimetil,2-ciclopentenona	1535 ± 12	44,652	0.86	4.82	45,656	0.88	2.11
49	27.0	Ácido isobutanoico	1570 ± 12	1,159,992	27.87	2.20	1,738,533	41.77	1.41

50	27.4	5-Metil furfural	1570 ± 10	523,295	10.06	2.39	703,680	13.53	1.22
51	28.3	4 Terpineol	1602 ± 9	21,960	0.81	4.41	96,352	0.83	2.03
52	27.6	Hexadecano	1612 iu	86,268	0.30	4.84	88,248	1.32	2.18
53	28.7	5-Metil,2-acetilfurano	1606 ± 10	72,617	1.40	4.95	74,240	1.43	2.24
54	28.8	Ácido butanoico	1625 ± 12	336,168	8.08	2.72	185,096	4.45	0.54
55	29.1	Ácido decanoico etil éster	1638 ± 9	218,219	2.31	3.90	474,051	5.01	0.78
56	29.7	Ácido octanoico etil hexil éster	1688 iu	5,033	0.04	2.94	20,838	0.17	4.67
57	29.9	2-Furanmetanol	1660 ± 9	701,665	15.14	3.77	616,548	13.30	1.12
58	30.0	3-Metil ácido butanoico	1666 ± 11	2,794,304	57.92	3.28	3,644,613	75.55	1.51
59	31.0	Terpineol	1697 ± 10	293,428	4.03	3.26	322,015	4.42	2.26
60	31.4	4-Heptilanilina	1702 iu	129,638	1.44	2.94	133,024	1.47	2.18
61	31.6	Acetofloroglucina	1691 iu	59,723	0.75	3.24	61,146	0.77	3.14
62	32.1	2-Metil-1-hexadecanol	1890 iu	148,814	1.23	5.48	149,976	1.24	2.03
63	32.4	1-Heptadeceno	1746 ± 7	100,741	0.89	1.71	100,432	0.89	0.77
64	34.4	Ácido acético 2-fenil etil éster	1813 ± 15	485,181	6.25	3.29	560,845	7.23	1.65
65	34.8	Ácido dodecanoico etil éster	1841 ± 9	75,897	0.70	2.48	196,961	1.83	1.32
66	34.9	Ácido hexanoico	1846 ± 12	273,216	4.98	3.70	245,991	4.48	0.30
67	35.3	Ácido pentadecanoico 3-metil butil éster	1863 ± 5	10,667	0.09	5.26	52,974	0.45	4.45
68	36.9	Fenil etil alcohol	1906 ± 15	5,164,152	89.50	3.29	4,622,353	80.11	1.52
69	38.0	Dodecanol	1966 ± 10	69,275	0.82	4.50	136,249	1.54	3.62
70	39.0	3-Metil fenol	2091 ± 18	109,950	2.15	1.11	114,878	2.25	0.95
71	39.2	Fenol	2000 ± 15	220,100	4.95	3.85	215,722	4.85	1.85
72	39.8	Nerolidol	2034 ± 14	73,784	0.70	4.84	75,372	0.72	2.16
73	40.0	Ácido tridecanoico etil éster	2049 ± 11	19,410	0.16	1.01	55,994	0.46	3.60
74	40.3	Ácido octanoico	2060 ± 15	956,457	14.04	2.53	1,197,664	17.58	1.18
75	43.7	Ácido hexadecanoico	2931 ± 0	4,581,837	37.84	0.74	2,636,159	21.77	0.34
76	44.3	Ácido hexadecanoico etil éster	2251 ± 10	147,979	1.10	4.77	296,848	2.21	2.57
77	44.6	Ácido decanoico	2276 ± 14	1,249,388	15.36	2.40	1,561,466	19.19	0.97
78	45.2	2,4-Diterbutil fenol	2318 ± 10	371,210	3.79	5.74	448,132	4.60	1.67

79	46.4	Ác.10-octilundec-10-enoico, metil éster	2144 iu	15,331	0.10	5.90	29,186	0.20	2.35
80	47.6	Ácido dodecanoico	2498 ± 11	421,211	4.45	2.51	608,333	6.43	0.98
81	48.4	Ácido linoleico etil éster	2521 ± 11	60,963	0.42	1.41	150,907	1.04	0.90
82	49.6	Gliceril linoleato	2705 iu	41,424	0.25	1.50	74,717	0.45	0.02
83	51.6	Ácido tetradecanoico	2694 ± 20	163,025	1.51	3.99	178,353	1.65	0.10
84	54.5	Ácido octadecanoico	3134 ± 13	1,530,013	11.39	1.73	1,207,145	8.99	0.13
sn	na	Metanol	903 ± 8		703.85			632.03	

* Metanol determinado en CIDAM con apoyo de la MC Lorena Farías Rosales, por cromatografía de gases con columna SUPELCO SPB20.

Con los datos de los ésteres presentes en el mezcal y su abundancia, se normalizan a 100% respecto al control cada uno de los 16 identificados y se representa en barras el incremento porcentual de cada uno de los ésteres detectados en el mezcal obtenido a través de la fermentación con la cepa de *Kluyveromyces marxianus* UMPE1 18SATF en la siguiente gráfica (Fig. 39) , todos con notoria diferencia, desde el 15% como el menor incremento de todos para el ácido acético 2-fenil etil éster, hasta el 410% de incremento para el ácido pentadecanoico 3-metil butil éster, con un promedio de sobreproducción de ésteres de 140%.



- 1 Acetato de etilo
- 11 Ácido butanoico 3 metil etil éster
- 18 Acetato de Isoamilo
- 23 Ácido hexanoico etil éster
- 34 Lactato de etilo
- 40 Ácido octanoico etil éster
- 55 Ácido decanoico etil éster
- 56 Ácido octanoico etil hexil éster
- 64 Ácido acético 2-fenil etil éster
- 65 Ácido dodecanoico, etil éster
- 67 Ácido pentadecanoico 3-metil butil éster
- 73 Ácido tridecanoico etil éster
- 76 Ácido hexadecanóico étil éster
- 79 Ácido octilundecenoico metiletil éster
- 81 Ácido linoleico etil éster
- 82 Gliceril linoleato

Figura 39. Cambio porcentual de ésteres en mezcal. Gráfica que muestra el incremento en porcentaje de los ésteres detectados en el mezcal destilado, fermentado con UMPE1 18SATF, respecto a los ésteres producidos por UMPE1 silvestre, normalizando cada uno de ellos a 100% para el control y mostrando el incremento a partir de éste. Mostrando en barras el incremento de los ésteres producidos por 18SATF. Los números de los ésteres corresponden al número de compuesto de la tabla 15 y se enlistan los nombres.

Adicionalmente al análisis de presencia y abundancia de ésteres en el mezcal a través de cromatografía de gases, se hizo también un análisis organoléptico del mismo, con un panel de 13 catadores certificados (Fig. 40A), pertenecientes a la Cervecería Heineken - Cuauhtémoc-Moctezuma, planta Toluca; a los cuales se les presentó para su catado, tres de los mezcales de marca comercial de “La flor del mezcal” y los dos mezcales elaborados con las levaduras proporcionadas por el laboratorio de Biotecnología microbiana de la UMSNH, *Kluyveromyces marxianus* UMPe1 silvestre y UMPe1 transformada (18SATF).

Se les presentaron las muestras a evaluar en vasos de vidrio, acompañado con cítricos para limpiar el paladar entre cada prueba (Fig. 40B) y se les dio un formato de evaluación donde se indicaron las características de aroma y sabor; solicitándoles a los catadores, que además de la descripción de los productos, se indicara la preferencia entre las muestras de mezcal evaluadas.



Figura 40. Catado del mezcal. Imágenes que muestran en A) Una fracción de los catadores participantes en la evaluación y B) La presentación como se dio a evaluar organolépticamente a los mezcales.

Con los resultados obtenidos, se realizó la siguiente tabla (Tabla 16), en donde se muestra el listado de descriptores de aroma y sabor, además del porcentaje de preferencia; se indica con el símbolo “+” las veces que se indicó haber detectado el descriptor entre los evaluadores y con “ * ” la selección duplicada que se hizo por parte de dos de los catadores, los cuales seleccionaron dos de los mezcales como preferidos.

Como se puede observar los mezcales elaborados con las levaduras proporcionadas por el laboratorio de biotecnología microbiana, tanto la cepa silvestre como la transformada, tuvieron mayor preferencia entre los evaluadores, siendo el mezcal obtenido de la fermentación con la cepa sobreproductora de ésteres el que tuvo mayo selección de preferencias.

Tabla 16. Descriptores característicos del catado del mezcal.

MEZCAL	AROMA	SABOR	PREFERENCIA
1 UMPe1 18SATF	Ahumado, tierra, herbal, frutal(+++), dulce, madera, pasto, raíz, agave, alcohol intenso, seco, campo	Sabor fuerte, resabio ligero, dulce, frutal, tierra, astringente, agave, ahumado, ligero cítrico.	48%
2 UMPe1 Silvestre	Ahumado, herbal, cítrico, frutal(++), madera, etilo, tierra, dulce	Sabor más suave, resabio ligero y largo, cierta dulzura, frutal madera, tierra, acido, amargo, astringente, herbal	30%
Joven	Ahumado, herbal, frutal, cítrico, agave, tierra	Menor percepción alcohólica que los otros, dulce, tierra, herbal, acido, astringente, amargo, sabor ligero.	7%
Ensamble	Madera, ahumado, ligero, agave, tierra, humedad, frutal, cítrico	Sabor fuerte con resabio moderado agradable, ligero ácido, ahumado, dulce, amargo.	15%*
Ahumado	Barricas, añejo, ahumado, notas frutales, agave, madera, etilo, ligero dulce, herbal	Herbal, ahumado, sabor moderado con resabio medio muy agradable, buen balance de agaves, notas de miel de agave	15%

(+) Cantidad de veces mencionado

* Preferencia duplicada (dos personas eligieron otro y ensamble)

DISCUSIÓN

Los ésteres aportan a las bebidas fermentadas características de olor y sabor agradable para el consumidor (*Mason and Dufour, 2000*), por lo que para el sector industrial productor de bebidas alcohólicas ha sido de importancia lograr de diferentes maneras el incremento en la producción de éstos para mejorar el bouquet de las bebidas fermentadas, además de obtener alto rendimiento alcohólico en el proceso fermentativo; por lo que para este trabajo se seleccionó una levadura industrial aislada de residuos de fermentos de agave azul (*López-Álvarez et al, 2012*), *Kluyveromyces marxianus* UMPe1 con características deseables en la industria, como termotolerancia, alta producción de etanol, (superior al 90% de rendimiento, variando dependiendo de las condiciones de fermentación); además de que esta levadura puede ser usada para fermentación en mostos de agave con alto contenido de azúcares fermentables (hasta 220 g·L⁻¹), sin efectos inhibitorios por contenido de azúcar y toxicidad por etanol producido.

Utilizando la cepa de *K. marxianus* UMPe1, se logró incrementar la producción de ésteres durante la fermentación alcohólica, a través del aumento de la expresión del gen *ATF1*, insertando en la levadura las construcciones TLATF y 18SATF. Ambas construcciones se diseñaron para integrarse en los respectivos loci, mediante recombinación homóloga, con el objetivo de incrementar la expresión del gen, para el caso de la construcción TLATF, insertando una segunda copia del elemento de respuesta a hipoxia (LORE), en posición tándem respecto a la copia silvestre, en el promotor del gen *ATF1*, para promover la transcripción genética durante la fermentación, tiempo en que la levadura se expone a condiciones de bajo nivel de oxígeno en el medio. Para el caso de la construcción 18SATF, mediante la fusión de *ATF1* dentro del gen ribosomal 18S, con el fin de aumentar el número de copias del gen y con esto aumentar también la cantidad de RNA mensajero. Ya que estas integraciones se hacen por recombinación homóloga, se sugiere que estas transformaciones son estables genéticamente.

Verificando que las inserciones hayan quedado dentro del genoma, se realizaron pruebas con levaduras de múltiples resiembras; de q-PCR (tabla 12) para determinar el número de copias que tienen las levaduras tanto la silvestre que de acuerdo a los antecedentes (*Lertwattanasakul et al; 2015*) contiene una sola copia del gen *ATF1*, como las transformadas; y se realizó RT-q-PCR (Fig. 22) para determinar la expresión del gen en las tres cepas y así validar y comparar tanto las copias del gen en el ADN como la actividad que se tiene del mismo cuantificando el nivel de mensajero; determinando que la cepa control contiene una sola copia, TLATF 2 copias y 18SATF 3 copias; en los datos de la expresión del gen, se observa un incremento de cerca de 1.5 veces la expresión de TLATF respecto al control manteniéndose similar a los diferentes tiempos de fermentación, a diferencia de 18SATF que muestra un

incremento gradual a lo largo del tiempo de fermentación, llegando a una expresión de hasta casi 6 veces el valor de la cepa control a las 72 horas de fermentación; estos resultados indican que con la sobre-expresión del gen, la actividad de la enzima alcohol acetil transferasa fue exitosamente incrementada como se esperaba en las dos transformantes, pero con mayor significancia en la clona recombinante 18SATF.

Con los datos obtenidos diferentes características, como el fenotipo macroscópico (Fig. 23), morfología celular (Fig. 24), cinética de crecimiento (Fig. 27), viabilidad celular (Fig. 28), pH en el medio (Fig. 29), consumo de glucosa y producción de etanol (Fig. 31) y todos los parámetros fermentativos obtenidos (tabla 13), se puede deducir que la transformación genética no tuvo ningún efecto secundario en las características de fermentación de la levadura, ya que no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros o características evaluadas entre la cepa control y las dos transformantes, como el consumo de glucosa y la producción de etanol en $\text{g}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$ y las eficiencia teórica de producción de etanol, siendo para las pruebas en laboratorio con medio YPD de 91% en promedio para las tres cepas; adicional al hecho de que se obtuvo un incremento en la producción de ésteres en la fermentación y se puede descartar que la sobreproducción de éstos sea a causa estrés por pH, puesto que se mantiene igual para las tres fermentaciones o de diferencias en la cantidad de biomasa en el medio, ya que la cinética de crecimiento y la viabilidad celular de las tres cepas se muestra sin diferencias, además de que la tasa de crecimiento máxima que se dio entre las 12 y 24 horas de fermentación fue similar para las tres, con un promedio de 0.16 hr^{-1} ; y la acumulación de biomasa al término de las fermentaciones tanto en peso fresco con un promedio de las tres de $9.53 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, como en peso seco con $2.77 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

En la determinación de compuestos orgánicos volátiles presentes en el medio a las 72 horas de fermentación con medio YPD se detectaron 79 compuestos, de los cuales, 32 de ellos incrementaron con las dos cepas transformadas (Fig. 34), mostrando en la gráfica de correlación una tendencia más marcada hacia la cepa 18SATF. De los 32 compuestos que incrementaron, 12 de ellos son ésteres (Fig. 35), de los cuales solo 4 de ellos tiene un incremento significativo respecto al control para el caso de TLATF que fueron el acetato de etilo, el ácido hexanoico etil éster, ácido tridecanoico propil éster y ácido linoleico etil éster, con un promedio de incremento del 21%; sin embargo para el medio fermentado con 18SATF todos tuvieron incremento, pero con significancia estadística 9 de los 12 la tienen, con un promedio de aumento porcentual del 79% y un máximo de 250%. Por lo que con estos datos se determinó que la clona recombinante con mayor éxito tanto de número de copias del gen *ATF1*, la expresión del gen y la respuesta en actividad de la enzima *atf1* con el respectivo incremento de ésteres en el medio fermentativo fue 18SATF; y por tal motivo se seleccionó para hacer las pruebas en la elaboración del mezcal.

El mezcal fue elaborado en la fábrica “la flor del mezcal” con el proceso artesanal que ellos utilizan, con la diferencia que en el proceso cotidiano no se inocula el mosto de agave, sino que la fermentación se lleva a cabo de manera espontánea y para nuestras pruebas el mosto de agave distribuido en dos tanques de fermentación fue inoculado con la levadura silvestre de *K. marxianus* y con la levadura transformada 18SATF, lo que llevó a que en primera instancia el proceso fermentativo fuese más rápido de lo habitual, ya que no fue necesario esperar varios días a que comenzara la fermentación espontánea por organismos presentes en el ambiente. Una vez que se dio por terminada la fermentación, el producto fue destilado y rectificado de la misma manera que se lleva a cabo convencionalmente para los productos fabricados cotidianamente.

Al igual que en el medio YPD fermentado, se determinaron los compuestos orgánicos volátiles del producto terminado por cromatografía de gases, obteniendo 84 compuestos (tabla 15); los cuales se cuantificaron y se compararon con la NOM-070-SCFI-2016; verificando que se cumplió con todos los estándares para mezcales indicados en la norma, donde el rango para etanol medido a 20°C es de entre 35 y 55% de alcohol en volumen, y los mezcales de las pruebas se ajustaron a 45% alcohol; alcoholes superiores con concentración entre 100 y 400 mg por 100 mL, obteniendo para el mezcal control 287 mg y para 18SATF 279 mg; el furfural con un máximo de 5 mg por 100 mL, detectando 1.07 mg para el control y 1.5 mg en 100 mL para 18SATF; aldehídos con un máximo de 40 mg/100 mL, obteniendo un resultado de 2.15 mg para el control y 1.6 mg para 18SATF; metanol entre 30 y 300 mg/100 mL, detectando una concentración de 70.4 mg para control y 63.2 mg para 18SATF; mostrando con esto que todos los valores de las especificaciones fisicoquímicas de la norma se encuentran dentro de rango para el mezcal terminado elaborado con las dos cepas de *K. marxianus*.

De los 84 compuestos identificados, para el mezcal fermentado por la cepa silvestre el 80.1% corresponde a alcoholes (excluyendo el etanol), 15.5% ácidos orgánicos, 0.48% alcanos, 6% aldehídos y cetonas, 1.76% furanos y terpenos y 1.34% de ésteres; en contraste con los compuestos del producto fermentado por 18SATF, donde el 78.1% son alcoholes, 16% ácidos orgánicos, 0.47% alcanos, 4.6% aldehídos y cetonas, 1.89% furanos y terpenos y 2.48% corresponde a ésteres. Como se puede observar en el diagrama de correlación lineal (Fig. 38) 33 de los compuestos aumentan en la fermentación con 18SATF respecto a la cepa silvestre; de éstos 16 son ésteres; que analizándolos de manera individual (Fig. 39) se observa que todos ellos tienen un incremento, siendo el máximo de 410% con un promedio de sobreproducción de los 16 ésteres de 140%; con estos resultados se demuestra que el contenido de ésteres en el mezcal incrementó exitosamente como se esperaba.

Para evaluar de manera sensorial este incremento en el contenido de ésteres, se realizó el análisis organoléptico por un grupo de catadores profesionales, los cuales seleccionaron su favorito de las muestras que se les presentaron (3 mezcales de venta al público producidos en la misma fábrica de las pruebas y los dos mezcales prueba inoculados con *K. marxianus*). Los resultados muestran que la preferencia fue mayor para los mezcales fermentados con las levaduras UMPe1, con un 30% de preferencia para el mezcal con la cepa silvestre y 48% de preferencia del mezcal elaborado con la levadura modificada genéticamente 18SATF en los resultados del mezcal obtenido con 18SATF, quedando el 22% de preferencias repartidos entre los mezcales “joven”, “ensamble” y “ahumado”. Los catadores indicaron para olor características de ahumado, tierra, herbal, frutal, dulce, madera, pasto, raíz, agave, alcohol intenso, seco, campo; y en sabor, características de dulzura, frutal, tierra, astringente, agave, ahumado, ligero cítrico. Estos aromas y sabores, son asociados directamente con el contenido de ésteres de acetato y ésteres de ácidos grasos; compuestos que fueron incrementados significativamente con la modificación genética al aumentar el número de copias del gen *ATF1*.

El incremento en el contenido de ésteres mejora la calidad y las propiedades organolépticas del mezcal, sugiriendo que la modificación genética realizada por recombinación homóloga usando el gen ribosomal 18S fue exitosa y puede ser implementada en procesos de fermentación de bebidas alcohólicas, en las cuales el incremento de ésteres sea una característica deseada, mejorando así el bouquet de la bebida, manteniendo la producción de la misma de forma económicamente viable, sin modificar condiciones de proceso, dejando el incremento en la producción de ésteres a la levadura.

CONCLUSIONES

La producción de ésteres en el medio de fermentación fue incrementada en correlación con la sobreexpresión de ATF1 en las cepas recombinantes de *K. marxianus* UMPe1, siendo más significativo en la fusión del gen con ADNr 18S que con el duplicado del elemento LORE en el promotor, teniendo un impacto positivo en la elaboración de mezcal, mejorando sus características organolépticas.

REFERENCIAS

Arrizon J., Concetta F., Acosta G., Romano P., Gschaedler A. (2005). Fermentation behavior and volatile compound production by agave and grape must yeast in high sugar *Agave tequilana* and grape must fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek*.

Ceballos-Magaña S. G., De Pablos F., Jurado J. M., Martín M. J., Alcázar A., Muñiz-Valencia R., Gonzalo-Lumbreras R., Izquierdo-Hornillos R. (2012). Characterisation of tequila according to their major volatile composition using multilayer perceptron neural networks. *Food Chemistry*. 136: 1309-1315.

Chang M. J., Burgess S. M. (2002). Yeast as a Model Genetic Organism. *Encyclopedia of life sciences*. 1-8.

De Leon-Rodriguez A., Escalante-Minakata P., Jimenez-Garcia, M. I., Ordonez-Acevedo L. G., Flores-Flores J. L., Barba de la Rosa A. P. (2008). Characterization of Volatile Compounds from Ethnic Agave Alcoholic Beverages by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Food Technology and Biotechnology*. 46: 448-455.

Diaz-Maroto M. C., Schneider R., Baumes R. (2005). Formation Pathways of Ethyl Esters of Branched Short-Chain Fatty Acids during Wine Aging. *J. Agric. Food Chem.* 53: 3503-3509.

Elis-Peral. (2015). Paso a paso: Cata del mezcal. *Revista el Conocedor*.

Farias-Rosales L. (2014). Expresión del gen *ATF1* en *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 y evaluación de su efecto en el contenido de ésteres producidos en la fermentación alcohólica. Laboratorio de Biotecnología Microbiana, IIQB, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tesis de maestría. Morelia, Michoacán.

Fonseca G. G., Heinzle E., Wittmann C., Gombert A. K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol*. 79: 339–354.

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. *Appl Environ Microbiol*. 60: 2786-2792.

Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Jentsch, S. (2000). Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasomedependent processing. *Cell*, 102, 577-586.

Jiang, A., Vasconcelles, M.J., Wretzel, S., Light, A., Martin, C.E., Goldberg, M.A. (2001). MGA2 is involved in the low-oxygen response element-dependent hypoxic induction of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cell Biology*, 21, 6161-6169.

Kotséridis, K. (1999). Study on aroma of Merlot and Cabernet Sauvignon wines from Bordeaux region. Thesis, Université Victor Segalen Bordeaux II.

Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma: a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21, 97-129.

Lee, S.J., Rathbone, D., Asimont, S., Adden, R., Ebeler, S.E. (2004). Dynamic changes in ester formation during chardonnay juice fermentations with different yeast inoculation and initial Brix conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55, 346-354.

León-Rodríguez A., González-Hernández L., Barba de la Rosa A. P., Escalante-Minakata P., López M. G. (2006). Characterization of Volatile Compounds of Mezcal, an Ethnic Alcoholic Beverage Obtained from *Agave salmiana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 1337-1341.

Lertwattanasakul N., Kosaka T., Hosoyama A., Suzuki Y., Rodrussamee N., Matsutani M., Murata M., Fujimoto N., Suprayogi, Tsuchikane K., Limtong S., Fujita N., Yamada M. (2015). Genetic basis of the highly efficient yeast *Kluyveromyces marxianus*: complete genome sequence and transcriptome analyses. *Biotechnology for biofuels*. 8:47.

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: 744-753.

López-Alvarez A., Díaz-Pérez A. L., Sosa-Aguirre C., Macías-Rodríguez L., Campos-García J. (2012). Ethanol yield and volatile compound content in fermentation of agave must by *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 comparing with *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast used in tequila production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 113: 614-618.

Loser C., Urit T., Bley T. (2012). Formation of ethyl acetate by *Kluyveromyces marxianus* on whey during aerobic batch and chemostat cultivation at iron limitation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 96: 658-696.

Malcorps P, Dufour JP. (1992). Short-chain and mediumchain aliphatic-ester synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem.* 210: 1015-1022.

Martínez-Guerra J. J. (2014). Bioquímica, capítulo 12. Universidad autónoma de Aguascalientes.

Mason A. B., Dufour J-P. (2000). Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast.* 16: 1287-1298.

Mathews, C.K., Van Holde, K.E., Ahern, K.G. (2002). Bioquímica. Madrid, España. Pearson Education. Capítulo 13, 501-536, Capítulo 18, 701-744.

Miranda-Mendoza A. L. (2010). Evaluación de los parámetros fermentativos de una levadura de *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* modificada genéticamente. Laboratorio de Biotecnología Microbiana, IIQB, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Residencias profesionales. Morelia, Michoacán.

Morrisey John P., Estchmann Maria M. W., Schrader Jens, de Billerbeck Gustavo M. (2015). Cell Factory applications of the yeast *Kluyveromyces marxianus* for the biotechnological production of natural flavor and fragrance molecules. *Yeast.* 32: 3-16.

Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016, BEBIDAS ALCOHÓLICAS- MEZCAL-ESPECIFICACIONES. SINEC-20160815180244200. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 22 de Febrero de 2017.

Ornelas-Hernández L. C.; García-Aguirre Y. P. (2000). Lecciones de Bioquímica. Instituto Tecnológico de Morelia. Cap IV: 102.

Peddie, H.A.B. (1990). Ester formation in brewery fermentations. *Journal of the Institute of Brewing,* 96, 327-331.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donéche, B., Lonvaud, A. (2006). Handbook of Enology, The microbiology of wine and vinifications, Volume 1, Edition 2. Chichester, Inglaterra. John Wiley & Sons. Chapter 2, 53-77.

Rojas V., Gil J. V., Piñaga F., Manzanares P. (2003). Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International journal of food microbiology*. 86: 181-188.

Saerens, S.M., Verstrepen, K.J., Van Laere, S.D., Voet, A.R., Van Dijck, P., Delvaux, F.R., Thevelein, J.M. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* *EHT1* and *EEB1* genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *The Journal of Biological Chemistry*. 281:4446-4456.

Saerens S. M. G., 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: 454-461.

Sanchez-Ibañez J. L. (2017). Maestro Mezcalero de “La Flor del Mezcal”, Etúcuaro, Michoacán.

Styger G., Prior B., F. Bauer F. (2011). Wine flavor and aroma. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 38:1145-1159.

Sumby, K.M., Grbin, P.R., Jiranek, V. (2010). Microbial modulation of aromatic esters in wine: current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*, 121, 1-16.

Swiegers, J.H., Pretorius, I.S. (2005). Yeast modulation of wine flavor. *Advances in Applied Microbiology*, 57, 131-175.

Van Laere S.D.M., Saerens S. M. G., Verstrepen K. J., Van Dijck P., Thevelein J. M., Delvaux F. R. (2008) Flavour formation in fungi: characterisation of KIAtf, the *Kluyveromyces lactis* orthologue of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferases Atf1 and Atf2. *Appl Microbiol Biotechnol*. 78:783-792

Vasconcelles, M.J., Jiang, A., Mcdaid, K., Gilooly, L., Wretzel, S., Porter, D.L., Martin, C. E., Goldberg, M.A. (2001). Identification and characterization of a low oxygen response element involved in the hypoxic induction of a family of *Saccharomyces cerevisiae* genes. Implications for the conservation of oxygen sensing in eukaryotes. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 14374-14384.

Verstrepen K. J., Derdelinckx G., Dufour J. P., Winderickx J., Pretorius I. S., Thevelein J. M., Delvaux F. R. (2003). The *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyl transferase gene *ATF1* is a target of the cAMP/PKA and FGM nutrient-signalling pathways. *FEMS Yeast research*. 4:285-296.

Wim de Jong B., Shi S., Valle-Rodriguez J. O., Siewers V., Nielsen J. (2014). Metabolic pathway engineering for fatty acid ethyl ester production in *Saccharomyces cerevisiae* using stable chromosomal integration. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 42:477-486

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: 15-20.

Yoshimoto, H., Fukushige, T., Yonezawa, T., Sone, H. (2002). Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 501-508.

Yoshioka K, Hashimoto H. 1981. Ester formation by alcohol acetyltransferase from brewers' yeast. *Agric Biol Chem* 45: 2183-2190.

Zhao X., Procopio S., Becker T., (2015). Flavor impacts of glycerol in the processing of yeast fermented beverages: a review. *J Food Sci Technol.* 52:7588-7598