



# Aislamiento y caracterización de levadura silvestre de frutas de *Morus nigra* para producción de bebidas alcohólicas regionales

## Isolation and characterization of wild yeast from *Morus nigra* fruits for production of regional alcoholic beverages

Darío Jorge Ferreyra<sup>1</sup>, Pablo Francisco Martina<sup>1,2\*</sup> <sup>1</sup>Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Posadas, Argentina. <sup>2</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Instituto de Biología Subtropical. Posadas, Argentina. \*Autor de correspondencia: pfmartina@hotmail.com.

Recibido: 3 de marzo 2022 Aceptado: 12 mayo 2022 Recibido en versión modificada: 8 julio 2022

Ferreyra, D. J. & Martina, P. M. (2022). Aislamiento y caracterización de levadura silvestre de frutas de *Morus nigra* para producción de bebidas alcohólicas regionales. *Investigaciones y estudios - UNA*, 13(2), 49-58. <https://doi.org/10.47133/IEUNA22205b>

**Resumen.** La fruta de la morera es no solo conocida por su exquisito sabor, sino también por sus cualidades nutricionales y elevado contenido de compuestos bioactivos. La elaboración de vino de mora es uno de sus múltiples usos. Con el objetivo de controlar el proceso de fermentación espontánea empleado en la elaboración de vinos artesanales, se procedió al aislamiento de levaduras silvestre en el jugo de mora. Se identificó por biología molecular *Saccharomyces cerevisiae* como especie predominante. El aislado M01-IX se caracterizó por su tolerancia al etanol y por cinética de consumo de carbohidratos. Los resultados muestran que M01-IX es capaz de consumir el 99% del azúcar presente en las condiciones ensayadas y podría ser empleado para producir bebidas fermentadas con un contenido de al menos 5% de alcohol.

**Palabras clave.** mora, fermentación, azúcar residual, alcohol etílico, *Saccharomyces cerevisiae*.

**Abstract.** The mulberry fruit is not only known for its exquisite taste, but also for its nutritional qualities and high content of bioactive compounds. The elaboration of blackberry wine is one of its many uses. In order to control the spontaneous fermentation process used in the production of artisanal wines, wild yeasts were isolated in blackberry juice. *Saccharomyces cerevisiae* was identified by molecular biology as the predominant species. The M01-IX isolate was characterized by its tolerance to ethanol and by the kinetics of carbohydrate consumption. The results show that M01-IX is capable of consuming 99% of the sugar present under the conditions tested and could be used to produce fermented beverages with a content of at least 5% alcohol.

**Keywords.** blackberry, fermentation, residual sugar, ethyl alcohol, *Saccharomyces cerevisiae*.

## INTRODUCCIÓN

La morera negra (*Morus nigra*, Línneo 1753) pertenece a la familia *Moraceae*. Esta fruta no climatérica se cosecha durante los meses de septiembre y octubre en el hemisferio sur. El fruto de la morera es de 2 a 4 cm de largo, de forma ovalada con un color rojo brillante antes de la plena madurez y es de color negro purpura cuando está completamente maduro (Darias-Martín et al., 2003; Tao et al., 2017). La mora es conocida por su alto valor nutricional y su rico contenido en compuestos bioactivos saludables como las antocianinas, tiene una temporada de cosecha corta y es susceptible de descomponerse durante el transporte y almacenamiento (Wang et al., 2013). El procesamiento completo de esta fruta incluye la elaboración de varios productos, como mermelada, jugo, jarabe, vinagre y bebidas alcohólicas (Tao et al., 2017).

*Saccharomyces cerevisiae*, utilizada en la industria de la panificación como agente leudante, es la principal cepa de levadura responsable de la fermentación alcohólica. La eficiencia de las cepas de levadura está determinada por su capacidad para utilizar sustancias azucaradas, su tolerancia y capacidad de producción de etanol (Karki et al., 2017). Sin embargo, otras características que a menudo se desean para la fermentación de bebidas son los efectos potenciadores de la calidad, como la generación de compuestos aromáticos deseables (Tao et al., 2017; Yezbick et al., 2013).

La producción de vino a partir de frutas distintas de la uva ha aumentado en los últimos años. Cualquier fruta que tenga una buena proporción de azúcar puede usarse para hacer vino. Los vinos

reciben principalmente el nombre de la fruta con la que se han preparado (Varakumar et al., 2013). Hay diferentes tipos de bebidas alcohólicas relacionadas con la mora, como el vino de mora (Juan et al., 2012), el Yakju bebida alcohólica tradicional coreana enriquecida con morera (Kwak et al., 2012) y un destilado producido por fermentación en estado sólido de morera negra en Galicia (Alonso González et al., 2010).

En algunas localidades de zonas turísticas de la provincia de Misiones existe una tendencia creciente de emprendedores a elaborar vinos artesanales con frutas regionales. Sin embargo, los mismos no cuentan prácticas de corrección en el proceso de elaboración y conocimiento microbiológico que garantice un estándar de calidad, dificultando en última instancia, la difusión del producto. En este contexto, este trabajo se centró en la identificación y caracterización de la levadura más representativa de las pulpas frescas de moras con capacidad fermentadora para la producción de vino de mora.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección de muestras

Los frutos de tres ejemplares sanos del árbol de mora ("mora", morera negra) se recolectaron en Posadas, provincia de Misiones (27°24'12.6" S - 55°56'40.4" W), en bolsas de plástico de polietileno estéril y se transportaron refrigeradas al laboratorio.

### Fermentación del jugo de mora y aislamiento de levaduras tolerantes

Las frutas fueron lavadas dos veces en agua destilada y luego procesadas en una licuadora. El jugo de mora con etanol (99,5%, Cicarelli, Argentina) al 3% (p/v), se mantuvo un tanque de

fermentación de 1 litro a 20°C, con una atmósfera estable y casi completamente oscura durante 72 h. La fermentación se analizó para seleccionar las levaduras tolerantes al etanol en la flora nativa presente (Wang et al., 2013).

Una alícuota (5 ml) de jugo fermentado se diluyó en serie ( $10^{-1}$ - $10^{-5}$ ) y se sembraron (100  $\mu$ l) en placa con medio Saboraud-agar (Britania S.A., Argentina) suplementado con antibiótico (cloranfenicol, 50 mg/L; Britania S.A., Argentina) y se incubó a 28°C  $\pm$  0,5% (San Jor SL30C, Argentina) durante 2-4 días (Peña y Arango, 2009). Las colonias de levaduras obtenidas se subcultivaron hasta obtener colonias purificadas que se almacenaron en medio mínimo Cary-Blair con glicerol a -20°C.

### Identificación genética de levaduras tolerantes

La identificación de las levaduras con tolerancia al etanol se realizó utilizando la técnica de PCR y comparación de secuencias de ADN<sub>r</sub> descrita por White y col. (White et al., 1990). La mezcla de reacción contenía cebadores específicos para la región D1 / D2 de la gran subunidad ribosómica (28S rDNA), NL-1 (5-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3) y NL-4 (5-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3). La PCR se inició a 94°C durante 3 min y 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación (*annealing*) 55°C durante 1 min, extensión a 72°C durante 5 min, con una extensión final a 72°C por 5 min. Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v) y se tiñeron con SYBR Green (Invitrogen, USA). Luego, los productos se purificaron usando kit AccuPrep (Bioneer, Corea del Sur). La secuenciación se realizó en MacroGen (Seúl, Corea del Sur) utilizando el kit de reacción listo para

secuenciación del ciclo terminador BigDye (Applied Biosystems). Las secuencias se editaron manualmente y se alinearon para generar una secuencia consenso usando la herramienta Clustal W (Thompson et al., 1994). Las búsquedas de similitud se llevaron a cabo usando el programa BLAST N del sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Altschul et al., 1990).

### Tolerancia al etanol

Se adoptó el criterio de tolerancia como la concentración de etanol que reduce el crecimiento de las levaduras en un 50% ( $I_{50}$ ) (Ramírez-Cota et al., 2021). Empleando el medio sintético en condiciones estáticas investigamos la capacidad de tolerancia al etanol de la cepa M01-IX. Se midió el crecimiento de las cepas de levadura a distintas concentraciones de etanol, según You con modificación (You et al., 2003). Cada cultivo se inició inoculando matraces Erlenmeyer de 50 ml que contenían 10 ml de medio líquido YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) (extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, glucosa 20 g/l) suplementado con 5%, 7% y 10% (v/v) de etanol a una densidad óptica (DO) a 660 nm ( $DO_{660}$ ) 0,02 ( $2,5 \times 10^5$  células por ml) con células de cultivos en fase media logarítmica en crecimiento activo y se incubaron a 30°C durante 3 días (72 h). El crecimiento fue monitoreado por DO cada 24 h. La cepa comercial *Saccharomyces cerevisiae* (Calsa S.A., Argentina) se utilizó como referencia.

Los valores medios y sus desviaciones estándar del crecimiento celular se calcularon a partir de muestras por sextuplicado. Los resultados de los experimentos fueron evaluados mediante análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey post-hoc para determinar diferencias con significación estadística a un nivel de confianza del 95%. El  $I_{50}$  se

estimó mediante la regresión logística no lineal de cuatro parámetros conocida como ecuación de Hill (Gadagkar & Call, 2015). Todos los análisis fueron realizados con el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI.

### Fermentación discontinua estática

Las fermentaciones discontinuas se realizaron a escala de laboratorio en matraces de agitación de 250 ml que contenían 100 ml de medio YPD, suplementado con sacarosa e inoculados a DO 0,02 ( $2,5 \times 10^5$  células por ml). En medio sintético luego de la esterilización en autoclave a 121°C por 15 minutos se produce aparición de fructosa por la hidrólisis de sacarosa (Chen, 2004).

El contenido de carbohidratos en la mora se encuentra entre un 5-11%, lo que resulta insuficiente para alcanzar contenido alcohólico aceptable por lo que se adiciona sacarosa para alcanzar 16°Brix (Darias-Martín et al., 2003; Juan et al., 2012). El pH inicial fue de 6,5 para todos los ensayos. Los matraces se incubaron a 30°C durante aproximadamente 120 h. Al comienzo de los experimentos y cada 8 a 12 h, las muestras fueron recogidas para su análisis. La densidad óptica y el consumo de azúcar se midieron en el caldo como se describe en Métodos analíticos. Cada ensayo se realizó por duplicado.

### Determinación de parámetros cinéticos de crecimiento y rendimiento

Los parámetros cinéticos velocidad específica de crecimiento, tiempo de latencia y tiempo de generación se calcularon utilizando el modelo de Gompertz. Los parámetros de ajuste del modelo de Gompertz fueron calculados por regresión no lineal con el programa estadístico Statgraphics Centurion (versión 16.0) utilizando el algoritmo Marquard

(Rivas et al., 2014). El rendimiento de biomasa  $Y_{X/S}$  (gramos de biomasa producidos por gramo de azúcar consumido) y el rendimiento de etanol  $Y_{E/S}$  (gramos de etanol producidos por gramo de azúcar consumido) se calcularon como la pendiente, ajustada por regresión lineal, de los valores correspondientes de biomasa o etanol producido versus azúcar total consumido en los intervalos de tiempo correspondientes (Rodrigues et al., 2015).

### Métodos analíticos

La DO se midió usando un espectrofotómetro (Shimadzu UV-2550, Japón) a 660 nm. Los valores se convirtieron en concentración de biomasa (g/l) mediante el uso de una curva estándar. La biomasa se determinó mediante centrifugación (Zelían S.A., Argentina) de 1 ml de cultivo en tubos pesados previamente a 5.000 rpm durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y el sedimento se secó en estufa y se pesó en una balanza de precisión (APX-200, Denver Instrument, USA), hasta peso constante (Peña y Arango, 2009).

Los análisis de azúcares se realizaron por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) utilizando muestras previamente centrifugadas a 13.000 g durante 5 min. Los análisis se realizaron en un HPLC Shimadzu Prominence LC20 AT (Japón) equipado con un detector de índice de refracción ERC 7522 (ERMA INC, Japón). Para analizar las concentraciones de azúcar se usó una columna Zorbax amino NH<sub>2</sub> 4,6 x 250 mm, 5 μm (Agilent, USA) con una fase móvil de acetonitrilo/agua (85:15), elución isocrática con un flujo de 2 ml/min. a 35°C.

## RESULTADOS

### Selección e identificación de levaduras

A partir de los muestreos realizados, 10 cepas recuperadas de la fermentación alcohólica del jugo de mora mostraron el carácter morfológico de la levadura en placas con medio selectivo. El aislado M01-IX fue seleccionado debido a su abundancia relativa, y los otros nueve aislados no fueron estudiados. El análisis de la secuencia parcial (606 pb) del aislado M01-IX (GenBank: MH844381.1) determinó un alto porcentaje (100%) de similitud con *Saccharomyces cerevisiae* (MK908002.1).

### Prueba de tolerancia al etanol

El crecimiento a diferentes concentraciones de etanol se presenta en la Tabla 1. Los resultados muestran que la cepa silvestre M01-IX puede crecer a todas las concentraciones ensayadas, sin embargo, el crecimiento se redujo significativamente en función del incremento de alcohol. En la cepa de referencia las diferencias en el crecimiento son significativas a partir de 7% de alcohol. En la Tabla 2, se presentan los parámetros de la ecuación Hill, los cuales indican que las cepas presentan diferentes tolerancias al etanol, siendo  $I_{50}$  5% y 8% para las cepas M01-IX y referencia, respectivamente.

**Tabla 1. Tolerancia al etanol en cultivos estáticos a 30°C.**

Cepa	Horas	Control	5%	7%	10%
<i>S. cerevisiae</i> M01-IX	24	1,195 ± 0,14	0,270 ± 0,72 <sup>a</sup>	0,162 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,108 ± 0,03 <sup>a</sup>
	48	3,512 ± 0,26	1,343 ± 0,24 <sup>b</sup>	0,451 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,136 ± 0,03 <sup>b</sup>
	72	7,590 ± 0,54	4,050 ± 0,60 <sup>c</sup>	0,826 ± 0,12 <sup>c</sup>	0,256 ± 0,07 <sup>c</sup>
<i>S. cerevisiae</i> (referencia)	24	2,946 ± 0,15	2,412 ± 0,17	2,014 ± 0,16 <sup>e</sup>	0,220 ± 0,07 <sup>d</sup>
	48	7,250 ± 0,25	6,760 ± 0,33	5,327 ± 0,45 <sup>e</sup>	1,183 ± 0,84 <sup>d</sup>
	72	7,980 ± 0,46	6,890 ± 0,53	6,298 ± 0,20 <sup>e</sup>	2,190 ± 1,79 <sup>d</sup>

Los valores de crecimiento corresponden al valor promedio de DO<sub>(660 nm)</sub> corregidos y sus desvió estándar. <sup>a,b,c</sup>Presentan diferencias significativas con respecto al control (0% de etanol) de la cepa M01-IX para 5%, 7% y 10% de etanol a las 24, 48 y 72 hs (respectivamente). <sup>d,e</sup>Presentan diferencias significativas con respecto al control (0% de etanol) de la cepa de referencia para 7% y 10% de etanol a las 24, 48 y 72 hs (respectivamente).

**Tabla 2. Parámetros de la ecuación de Hill para *S. cerevisiae*.**

Cepa	R <sup>2</sup>	Coefficiente	Estimador	Error estándar	Intervalo de confianza 95%
<i>S. cerevisiae</i> M01-IX	99,7	C	0,01	0,11	-0,24 a 0,27
		D	8,03	0,09	7,82 a 8,23
		$I_{50}$	<b>5,02</b>	0,04	4,92 a 5,12
		b	6,57	0,58	5,29 a 7,85
<i>S. cerevisiae</i> (referencia)	83,6	C	0,22	6,47	-13,50 a 13,95
		D	7,38	0,47	6,37 a 8,39
		$I_{50}$	<b>8,34</b>	3,54	0,83 a 15,84
		b	5,35	5,32	-5,93 a 16,63

C es el crecimiento de las levaduras en la concentración máxima de etanol utilizada en cada serie experimental, D es el crecimiento de las levaduras en ausencia de etanol,  $I_{50}$  es la concentración de etanol que reduce el crecimiento del microorganismo en 50%, b es la pendiente de Hill, R<sup>2</sup> es el coeficiente de determinación de la regresión no lineal. Todos los modelos y coeficientes resultaron significativos ( $p \leq 0.05$ ).

### Fermentación discontinua estática

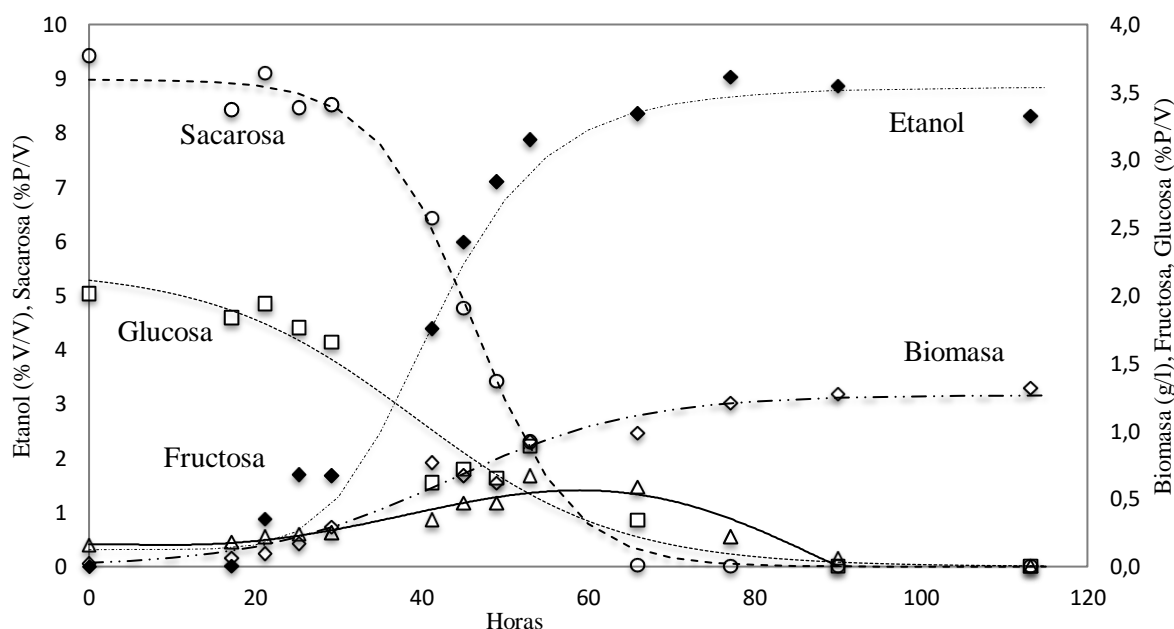
El crecimiento, el consumo de azúcar y la producción de etanol se muestra para la cepa M01-IX en la Figura 1. La cepa silvestre M01-IX se caracterizó por (1) un crecimiento exponencial inicial que alcanzó la fase estacionaria cuando solo se habían consumido más del 84% de azúcares, (2) 96% del etanol se produjo durante la fase de crecimiento y 4% durante la fase estacionaria, (3) a las 60 hs se alcanzó el máximo de fructosa en solución (15%) y (4) menos del 2% del azúcar residual permaneció sin consumir después de 95 h

de cultivo. Se obtuvieron perfiles de crecimiento típicos para levaduras en ambas cepas (M01-IX y referencia) y los valores correspondientes de los parámetros cinéticos y energéticos se muestran en la Tabla 3. Las tasas de crecimiento específico ( $\mu$ ) mostraron diferencias entre las cepas, no así el porcentaje de consumo total de azúcar que fue similar para las cepas M01-IX y referencia. La M01-IX exhibe un  $t_{\text{stat}}$  más largo, el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria. Los rendimientos de biomasa y producción de etanol para M01-IX y referencia no mostraron diferencias aparentes.

**Tabla 3. Parámetros cinéticos en batch estático a 30°C.**

Cepa	$\mu^{(h^{-1})}$	$\lambda$ (h)	$t_{\text{stat}}$ (h)	$T_{\text{HC}}$ (%)	$Y_{\text{X/S}}$ (g/g)	$Y_{\text{E/S}}$ (g/g)
M01-IX	0,06	10,5	50,12	99,88	0,027	0,408
Referencia	0,19	9,26	23,97	98,07	0,025	0,438

$\mu^{(h^{-1})}$  velocidad específica de crecimiento,  $\lambda$ (h) tiempo de latencia,  $t_{\text{stat}}$ (h) tiempo para alcanzar la fase estacionaria,  $T_{\text{HC}}$ (%) azúcar consumida,  $Y_{\text{X/S}}$ (g/g) rendimiento de biomasa,  $Y_{\text{E/S}}$ (g/g) rendimiento de etanol. Se indican valores medios.



**Figura 1. Cinética de consumo de azúcares, producción de biomasa y etanol durante fermentación estática con *S. cerevisiae* M01-IX. Fructosa (triángulo), Glucosa (cuadrado), Sacarosa (círculo), Biomasa (rombo blanco) y Etanol (rombo negro).**



## DISCUSIÓN

Las frutas son fuentes importantes de levaduras debido a su gran cantidad de azúcares simples y a la frecuente visita de vectores. La microbiota natural de las frutas está compuesta comúnmente de levaduras y hongos levaduriformes de los géneros *Aureobasidium*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Brettanomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Hanseniaspora* y raramente *Saccharomyces* y *Schizosaccharomyces* (Lee et al., 2011; Mambuscay et al., 2013). En un reporte previo se menciona que, en el jugo de mora la mitad de las especies (*Pichia kluyveri*, *Hansenia sporauvarum* y *Candida oleophila*) reportadas solo cuentan con un aislado, mientras que la especie *Wickerhamomyces pijperi* está representada por 13 de las 28 cepas aisladas. Las especies *Hanseniaspora uvarum* y *Candida boidinii* presentan 6 y 5 cepas respectivamente (Mambuscay et al., 2013). Sin embargo, en nuestro estudio *S. cerevisiae* fue la especie más abundante.

### Tolerancia al etanol

Nuestros resultados indican que la cepa silvestre *S. cerevisiae* M01-IX tolera hasta un 5% de etanol en el medio de cultivo. Estos resultados están de acuerdo a otros estudios, en donde el rango de tolerancia al etanol en las levaduras fue entre 5 – 12% (Matapathi et al., 2004; Tikka et al., 2013). En *S. cerevisiae*, el aumento de la concentración de etanol como principal producto de fermentación, influye en la fluidez de membrana, el metabolismo celular y en la biosíntesis de macromoléculas, lo que lleva a la inhibición del crecimiento e incluso a la muerte (Ding et al., 2009; You et al., 2003). Los

resultados de análisis de genoma completo y de regulación de transcripción, informan que los genes asociados con la función de la vacuola y la biosíntesis de aminoácidos son importantes para la tolerancia al etanol. La importancia del primero puede estar relacionada con la necesidad de funciones basadas en vacuolas, como la homeostasis del pH intracelular, el mantenimiento de la concentración de iones y la degradación de proteínas, en un momento en que el estrés por etanol ha alterado los gradientes electroquímicos e iniciado una considerable renovación de proteínas en la célula (Stanley et al., 2010; Yang & Tavazoie, 2020).

### Fermentación discontinua estática

La capacidad fermentativa se ve influenciada por diferentes factores, como la temperatura, la concentración de azúcares, el pH, y algunas otras variables que influyen en el crecimiento de los microorganismos, es decir, son responsables para una disminución en el rendimiento de biomasa (Rodrigues et al., 2015; Wang et al., 2016). El rendimiento de biomasa en M01-IX fue bajo. Esto es una ventaja en procesos en los que los productos y no la biomasa son el objetivo industrial. Reportes para cepas silvestres de *S. cerevisiae* indicaron valores de rendimiento de biomasa entre 0,022 – 0,644 g/g (González-Leos et al., 2017). El rendimiento de etanol/azúcar obtenido para M01-IX (0,408 g/g) se encuentra entre los mejores rendimientos reportados para producción de etanol en condiciones similares para cepas silvestres que van de 0,048 – 0,505 g/g (González-Leos et al., 2017). No obstante, reportes indican una clara reducción en la tasa de crecimiento de la levadura cuando el etanol está presente en concentraciones

entre 4 y 10 % (p/v) (Lee et al., 2011; Lima-Costa et al., 2012). En este caso, la acumulación de etanol en el medio de cultivo al final de la fase exponencial alcanzó concentraciones del 6,8% (v/v) (Figura 1). Esto sugirió que el etanol presente en el caldo puede ser el factor etiológico de la inhibición del consumo de azúcar y la consiguiente inhibición del crecimiento. Sin embargo, también quedó claro que ambos procesos no se vieron afectados de la misma manera, debido al desacoplamiento entre el crecimiento de biomasa y la producción de etanol en la fase estacionaria, y la capacidad de las células de no crecimiento para mantener una producción lenta de etanol.

### Cinética del consumo de azúcares

La tasa de crecimiento puede ser afectada por cambios en la tasa específica de consumo de azúcar (Lima-Costa et al., 2012). El jugo de mora natural posee cantidades similares de glucosa y fructosa, pero no contiene sacarosa (Makhoul et al., 2017). Para obtener mostos fermentables óptimos para la elaboración de vinos debe suplementarse con la adición de azúcar (Darias-Martín et al., 2003). Para conocer el comportamiento de la cepa M01-IX se midió el consumo de los diferentes azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) presentes en el curso de la fermentación (ver, Figura 1). Al inicio ( $t_0$ ) la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa en el medio de cultivo eran 20, 4 y 94 g/l., respectivamente. Durante la fase “lag” y la primera fase de crecimiento exponencial ( $t_{22}$  h), solo se consumió glucosa. Durante la segunda fase de crecimiento, la sacarosa se hidroliza, la glucosa es mantenida en concentraciones bajas decreciente, mientras que la concentración de fructosa en ese periodo se triplicó, lo que indica que los

monosacáridos producidos por la hidrólisis de la sacarosa se consumieron con diferente preferencia. La tercera fase de crecimiento, fase estacionaria, continua la hidrólisis de sacarosa hasta agotamiento, la glucosa se mantiene en valores bajos e inicia el consumo de fructosa. Nuestras observaciones están en concordancia con reportes previos (Lima-Costa et al., 2012; Rodrigues et al., 2015). En los cultivos de *S. cerevisiae* la sacarosa es hidrolizada por la enzima invertasa, codificada por el producto del gen *Suc2*.

En presencia de glucosa en concentraciones mayores a 18mM la síntesis de invertasa es reprimida (Meijer et al., 1998). Por ello, al inicio de la fermentación cuando la glucosa está presente en alta concentración (más de 20 g/l en este caso), la síntesis de invertasa se reprime y no se hidroliza sacarosa. La hexosa permeasa solo transporta monosacáridos al interior de la levadura, siendo la glucosa mucho más afín. La concentración de glucosa se mantiene baja debido a que es metabolizada a medida que está disponible, en simultáneo la concentración de fructosa aumenta un poco, lo que implica que la tasa de hidrólisis del azúcar es más alta que las tasas de transporte de monosacáridos. En general, la menor afinidad de los transportadores de hexosas por la fructosa en comparación con la glucosa explica el predominio de la fructosa hacia el final de la fermentación (Rodrigues et al, 2015).

### CONCLUSIÓN

Las frutas maduras de la morera negra son fuente de levaduras silvestres con capacidad fermentativa. El aislado M01-IX, identificado como *Saccharomyces cerevisiae* presenta tolerancia al etanol en las condiciones ensayadas y es capaz de



metabolizar el 99% de azúcar disponible durante fermentación, por lo cual presenta una característica adecuada para la elaboración de bebidas de bajo contenido alcohólico y azúcar residual.

## AGRADECIMIENTO

Especialmente agradecemos a Tatiana E. Ziegler por la asistencia técnica brinda en el laboratorio. A Liliana S. Celaya por las sugerencias en la elaboración del manuscrito final.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso González, E., Torrado Agrasar, A., Pastrana Castro, L. M., Orriols Fernández, I. & Pérez Guerra, N. (2010). Production and Characterization of Distilled Alcoholic Beverages Obtained by Solid-State Fermentation of Black Mulberry (*Morus nigra* L.) and Black Currant (*Ribes nigrum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2529–2535. doi:10.1021/jf9037562
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215, 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Chen, J. (2004). Manual de azúcar de caña (2 ed.). Limusa SA.
- Darias-Martín, J., Lobo-Rodrigo, G., Hernández-Cordero, J., Díaz-Díaz, E. & Díaz-Romero, C. (2003). Alcoholic beverages obtained from black mulberry. *Food Technology and Biotechnology*, 41(2), 173–176.
- Ding, J., Huang, X., Zhang, L., Zhao, N., Yang, D. & Zhang, K. (2009). Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(2), 253–263. doi: 10.1007/s00253-009-2223-1
- Gadagkar, S. R. & Call, G. B. (2015). Computational tools for fitting the Hill equation to dose–response curves. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 71, 68–76. doi: 10.1016/j.vascn.2014.08.006
- González-Leos, A., Del Angel-Del Angel, J. A., González-Castillo, J. L., Rodríguez-Durán, N. & Bustos-Vázquez, G. (2017). Evaluación de levaduras nativas productoras de etanol presentes en el bagazo de caña de azúcar. *CienciaUAT*, 11(2), 80. doi:10.29059/cienciauat.v11i2.791
- Juan, C., Jianquan, K., Junni, T., Zijian, C. & Ji, L. (2012). The profile in polyphenols and volatile compounds in alcoholic beverages from different cultivars of mulberry. *Journal of Food Science*, 77(4), C430–C436. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02593.x
- Karki, T. B., Timilsina, P. M., Yadav, A., Pandey, G. R., Joshi, Y., Bhujel, S., Adhikari, R. & Neupane, K. (2017). Selection and characterization of potential baker's yeast from indigenous resources of Nepal. *Biotechnology Research International*, 2017, 1–10. doi:10.1155/2017/1925820
- Kwak, E.J., Yeon Lee, J. & Sook Choi, I. L. (2012). Physicochemical properties and antioxidant activities of Korean traditional alcoholic beverage, Yakju, enriched with mulberry. *Journal of Food Science*, 77(7), C752–C758. doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02753.x
- Lee, Y. J., Choi, Y. R., Lee, S. Y., Park, J. T., Shim, J. H., Park, K. H. & Kim, J. W. (2011). Screening wild yeast strains for alcohol fermentation from various fruits. *Mycobiology*, 39(1), 33–39. doi:10.4489/MYCO.2011.39.1.033
- Lima-Costa, M. E., Tavares, C., Raposo, S., Rodrigues, B. & Peinado, J. M. (2012). Kinetics of sugars consumption and ethanol inhibition in carob pulp fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fedbatch cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(5), 789–797. doi:10.1007/s10295-011-1079-4
- Makhoul, G., Mahfoud, H. & Baroudi, H. (2017). Some chemical characteristics of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry phenotypes in Tartus Syria. *International Journal of Agriculture & Environmental Science*, 4(2), 54–63. doi:10.14445/23942568/ijaes-v4i2p110
- Mambuscay M., L. A., A. López A., W., M. Cuervo M., R. A., Argote V., F. E. & Osorio C., E. (2013). Identification of yeast in the native pineapple juice, blackberry and grape. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(Num. Esp. 2), 136–144.
- Matapathi, S. S., Patil, A. B., Jones Nirmalnath, P. & Savalagi, V. V. (2004). Isolation and screening of efficient yeast strains for wine making. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 17(4), 736–740.
- Meijer, M. M. C., Boonstra, J., Verkleij, A. J. & Verrips, C. T. (1998). Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is related to the glucose concentration rather than the glucose flux. *Journal of Biological Chemistry*, 273(37), 24102–24107. doi:10.1074/jbc.273.37.24102
- Peña, C. & Arango, R. (2009). Evaluación de la producción de etanol utilizando cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de melaza de caña de azúcar. *Dynarev.fac.nac.minas*, 76(159), 153–161.
- Ramírez-Cota, G. Y., López-Villegas, E. O., Jiménez-Aparicio, A. R. & Hernández-Sánchez, H. (2021). Modeling the ethanol tolerance of the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745 for its possible use in a functional beer. *Probiotics and Antimicrobial*. *Proteins*, 13(1), 187–194. doi:10.1007/s12602-020-09680-5
- Rivas, E.-M., Gil de Prado, E., Wrent, P., Silóniz, M.-I., Barreiro Elorza, P., Correa Hernando, E. C., Conejero, F., Murciano, A. & Peinado, J. M. (2014). A simple mathematical model that describes the growth of the area and the number of total and viable cells in yeast colonies. *Letters in Applied Microbiology*, 59(6), 594–603. doi:10.1111/lam.12314
- Rodrigues, B., Peinado, J. M., Raposo, S., Constantino, A., Quintas, C., & Lima-Costa, M. E. (2015).

- Kinetic and energetic parameters of carob wastes fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Crabtree effect, ethanol toxicity, and invertase repression. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(6), 837–844. doi:10.4014/jmb.1408.08015
- Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P. J. & Stanley, G. A. (2010). The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, 109(1), 13–24. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04657.x
- Tao, Y., Wang, Y., Yang, J., Wang, Q., Jiang, N., Chu, D. T., Han, Y. & Zhou, J. (2017). Chemical composition and sensory profiles of mulberry wines as fermented with different *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Properties*, 20(00), 2006–2021. doi:10.1080/10942912.2017.1361970
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680. doi:10.1093/nar/22.22.4673
- Tikka, C., Osuru, H. P., Atluri, N., Raghavulu, P. C. V., Yellapu, N. K., Mannur, I. S., Prasad, U. V., Aluru, S., Varma K. N. & Bhaskar, M. (2013). Isolation and characterization of ethanol tolerant yeast strains. *Bioinformation*, 9(8), 421–425. doi:10.6026/9732063 0009421
- Varakumar, S., Naresh, K., Variyar, P. S., Sharma, A., & Reddy, O. V. S. (2013). Role of malolactic fermentation on the quality of mango (*Mangifera indica* L.) Wine. *Food Biotechnology*, 27(2), 119–136. doi:10.1080/08905436.2013.781506
- Wang, C., Yin, L.-Y. Y., Shi, X.-Y., Xiao, H., Kang, K., Liu, X. Y., Zhan, J. C., & Huang, W.-D. (2016). Effect of cultivar, temperature, and environmental conditions on the dynamic change of melatonin in mulberry fruit development and wine fermentation. *Journal of Food Science*, 81(4), M958–M967. doi:10.1111/1750-3841.13263
- Wang, C-Y, Liu, Y.-W., Jia, J.-Q., Sivakumar, T. R., Fan, T., & Gui, Z.-Z. (2013). Optimization of fermentation process for preparation of mulberry fruit wine by response surface methodology. *African Journal of Microbiology Research*, 7(3), 227–236. doi:10.5897/AJMR12.2090
- White, T., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics (PCR-Prot). Academic Press. In M.A Innis., D. H Gelfand., J.J. Shinsky and White, T.J., Eds., PCR. *Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc., New York. doi: 10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1
- Yang, J. & Tavazoie, S. (2020). Regulatory and evolutionary adaptation of yeast to acute lethal ethanol stress. *PLOS ONE*, 15(11), e0239528. doi:10.1371/journal.pone.0239528
- Yezbick, G., Ahn-Jarvis, J., Schwartz, S. J. & Vodovotz, Y. (2013). Physicochemical characterization and sensory analysis of yeast-leavened and sourdough soy breads. *Journal of Food Science*, 78(10), 1–17. doi:10.1111/1750-3841.12246.
- You, K. M., Rosenfield, C.-L. & Knipple, D. C. (2003). Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1499–1503. doi:10.1128/AEM.69.3.1499-1503.2003