Este manuscrito ha sido aceptado después de una revisión a doble-ciego por pares y será publicado en una futura edición de esta revista. Su contenido es definitivo y únicamente cambiará en la versión final la información relativa al volumen, número, fecha de publicación y paginado.

DESDE 2013
https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/icbi/issue/archive
Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI
ISSN: 2007-6363

Publicación Semestral Pädi Vol. 0 No. 0 (2024) 1-7

Fermentación alcohólica de guayaba (Psidium guajava L.) por Kluyveromyces marxianus
Guava (Psidium guajava L.) alcoholic fermentation by Kluyveromyces marxianus

C. R. Sosa-Aguirre[a], C. I. Santiago-Barajas[b], D. García-Hernández[c], J. Campos-García[a,*], J. A. Mejía-Barajas[c,*]

[a] *Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio B-3, Ciudad Universitaria, 58030 Morelia, Michoacán, México.*
[b] *Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Morelia. Av Tecnológico 1500. Col. Lomas de Santiago, C.P. 58120 Morelia, Michoacán, México.*
[c] *Universidad Tecnológica de Morelia. Av Vicepresidente Pino Suarez, 750. Col. Ciudad Industrial, 58200 Morelia, Michoacán, México.*

Resumen

La guayaba (*Psidium guajava L.*) es una fruta tropical con una elevada producción mundial; sin embargo, es altamente perecedera. Previamente se ha reportado su fermentación alcohólica con levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, sin existir antecedentes con levaduras de otras especies como *Kluyveromyces marxianus*. En este trabajo se llevo a cabo la fermentación alcohólica de guayaba utilizando la levadura *K. marxianus* UMPe-1, comparando los resultados con los obtenidos de la levadura *S. cerevisiae* Ethanol Red®. En el producto de la fermentación con la levadura UMPe-1, se registraron 4.30 g/100 mL de etanol, 0.08 g/100 mL de metanol, y 0.26 g/100 mL de azúcares residuales; mientras que en el producto de la fermentación con la levadura Ethanol Red® se detectaron 0.44 g/100 mL de etanol, 0.06 g/100 mL de metanol y 6.5 g/100 mL de azúcares residuales. Para nuestro conocimiento, este es el primer trabajo en el que se lleva a cabo la fermentación alcohólica de guayaba utilizando una cepa *K. marxianus*, en el cual debido a las diferencias significativas en el producto de fermentación, se demuestra una mayor eficiencia fermentativa respecto a *S. cerevisiae*.

Palabras Clave: Etanol, fruta tropical, levaduras no-*Saccharomyces*.

Abstract

Guava (*Psidium guajava L.*) is a tropical fruit with high global production; however, it is highly perishable. Its alcoholic fermentation with yeasts of the species *Saccharomyces cerevisiae* has been previously reported, without any history with yeasts of other species such as *Kluyveromyces marxianus*. In this work, the alcoholic fermentation of guava was carried out using the yeast *K. marxianus* UMPe-1, comparing the results with those obtained from the yeast *S. cerevisiae* Ethanol Red®. In the fermentation product with UMPe-1 yeast, 4.30 g/100 mL of ethanol, 0.08 g/100 mL of methanol, and 0.26 g/100 mL of residual sugars were recorded; while in the fermentation product with Ethanol Red® yeast, 0.44 g/100 mL of ethanol, 0.06 g/100 mL of methanol and 6.50 g/100 mL of residual sugars were detected. To our knowledge, this is the first work in which alcoholic fermentation of guava is carried out using a *K. marxianus* strain, in which due to the significant differences in the fermentation product, a greater fermentative efficiency is demonstrated compared to *S. cerevisiae*.

Keywords: Ethanol, tropical fruit, non-*Saccharomyces* yeasts.

1. Introducción

La guayaba (*Psidium guajava L.*) presenta una producción mundial estimada en 40 millones de toneladas (Gutierrez-Montiel *et al*., 2023); no obstante, debido a su corta vida de anaquel de 5 a 7 días, se estima que más del 50% de esta fruta es desechada (Moreno *et al*., 2014; González-Arias *et al*., 2021). La guayaba esta compuesta de pectina, minerales, fibra y azúcares fermentables tales como sacarosa, glucosa y fructosa, por lo que previamente ha sido empleada en la producción de etanol mediante su fermentación con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (Shankar *et al*., 2003; Kocher & Pooja, 2011; Sevda & Rodrigues, 2011; Younis *et al*., 2014; Bertagnolli *et al*., 2017; Minh *et al*., 2019; Palachum *et al*., 2020), sin considerar el empleo de levaduras no-*Saccharomyces*, tales como *Kluyveromyces marxianus.*

Las levaduras *K. marxianus* que son clasificadas como QPS (Qualified Presumption of Safely) y GRAS (Generally recognized as safe), presentan un amplio potencial biotecnológico debido a su alta tasa de crecimiento,

*Autor para la correspondencia: jorge.mejia@ut-morelia.edu.mx
Correo electrónico: csosa@biofermich.com (Carlos Rubén Sosa Aguirre), cynthia_isaa@outlook.com (Cynthia Isabel Santiago Barajas), david.garcia@ut-morelia.edu.mx (David García Hernández), jcgarcia@umich.mx (Jesús Campos García), jorge.mejia@ut-morelia.edu.mx (Jorge Arturo Mejía-Barajas).

Historial del manuscrito: recibido el 01/11/2023, última versión-revisada recibida el 24/01/2024, aceptado el 13/02/2024, en línea (postprint) desde el 04/03/2024, publicado el DD/MM/AAAA. **DOI:** https://doi.org/10.29057/icbi.v12i23.12017

El DOI puede ser empleado para citar este manuscrito, pero será habilitado hasta la publicación en Pädi.

Este manuscrito ha sido aceptado después de una revisión a doble-ciego por pares y será publicado en una futura edición de esta revista. Su contenido es definitivo y únicamente cambiará en la versión final la información relativa al volumen, número, fecha de publicación y paginado.

producción de etanol, capacidad para metabolizar diferentes azúcares y diversidad en la producción de compuestos volátiles (Mehmood *et al*., 2018; Nurcholis *et al*., 2020; Karim *et al*., 2020). Las levaduras *K. marxianus* han sido empleadas en la fermentación de azúcares de agave para la producción de vino, mezcal y tequila (Graciano-Fonseca *et al*., 2008; López-Alvarez *et al*., 2012; Amaya-Delgado *et al*., 2013; Lara-Hidalgo *et al*., 2017), así como en la producción de etanol a partir de suero de queso y material lignocelulósico (Carvalho *et al*., 2021; Tesfaw *et al*., 2021; Leonel *et al*., 2021; Nini *et al*., 2023), sin existir antecedentes de su uso en la fermentación de guayaba. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la fermentación alcohólica de guayaba por la levadura *K. marxianus* UMPe-1, usando para su comparación la levadura *S. cerevisiae* Ethanol Red®.

2. Procedimiento para el Envío de Artículos

2.1. Cepas de levaduras

La levadura *K. marxianus* UMPe-1 utilizada en el presente trabajo, fue previamente aislada y purificada de una fermentación espontánea de agave, y se encuentra resguardada en la Colección de Cultivos Microbianos y Banco de Genes del Instituto de Tecnología Microbiana Chandigarh, India, MTCC 5309 (Campos-García *et al*., 2009; Patente Mexicana MX/a/2007/014445, No. 271316). Para el estudio comparativo se utilizó la levadura comercial productora de etanol *S. cerevisiae* Ethanol Red® (Lesaffre, France).

2.2. Selección de guayaba (Psidium guajava L.)

Las guayabas fueron obtenidas de la zona productora de Zitácuaro, Michoacán, México. Se utilizaron guayabas blandas al tacto que denotaron una madurez avanzada, y cumplieran con las especificaciones de aceptación o rechazo de la Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, "Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios".

2.3. Obtención de la pulpa de guayaba

Posterior a la selección de guayaba se realizó un lavado y desinfección de la fruta utilizando una solución de cloro de 200 ppm. Tras el lavado se procedió a su picado manual hasta obtener cubos de aproximadamente 1 cm^3, a continuación se efectuó la molienda en una licuadora convencional (EM-ICE;SHARP, Japón), operada a una velocidad de 1 durante 5 min. A la pulpa obtenida se le determinó pH y °Brix usando un potenciometro Digimed®, DM-22, Campo Grande, SP, Brazil, y un refractómetro digital Reichert r2i300, respectivamente. La pulpa se almacenó a -20 °C hasta su uso.

2.4. Aclaramiento enzimático de la pulpa de guayaba

Utilizando 1 L de pulpa de guayaba obtenida como se mencionó anteriormente, se mezcló con la enzima pectinasa 162 L, Biocatalysts, en una proporción del 1% v/v (10 mL), con agitación a 100 rpm por 24 h a 45 °C. Posteriormente se esterilizó a 15 psi por 15 min, y se pasó por un filtro con un poro de 3 mm. El producto obtenido fue esterilizado nuevamente para ser inoculado con las levaduras respectivas.

2.5. Recuento de células de levaduras

El número de células de levadura para el inóculo y durante la fermentación se determinó utilizando un microscopio óptico y una cámara de recuento de Neubauer.

2.6. Inoculación de levaduras

Previo a la inoculación de las levaduras *K. marxianus* UMPe-1 y *S. cerevisiae* Ethanol Red® en la pulpa de guayaba aclarada, las levaduras fueron crecidas en medio YPD (Yeast Peptone Dextrose) con agitación a 120 rpm y 30 °C, durante 24 h. El número de células en el inóculo fue cuantificado como se mencionó anteriormente, ajustado con agua esterilizada a 1 x 10^7 células/mL y agregado a la pulpa hidrolizada en un volumen del 10% v/v. La preparación del pre-inoculo y su inoculación se llevó a cabo de acuerdo a metodología reportada por Sevda and Rodrigues, (2011).

2.7. Fermentación

La fermentación se realizó utilizando 1 L de la pulpa de guayaba aclarada, esterilizada e inoculada como se describió previamente. La fermentación se llevo a cabo a 26 °C, en reposo y hasta detectar un consumo de más del 90% de los azúcares reductores por alguna de las levaduras inoculadas. Las muestras para su análisis fueron tomadas cada 72 h. Como se describe a continuación, la determinación de azúcares reductores se realizó mediante el método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), los azúcares residuales y contenido de etanol en el producto final de la fermentación se analizaron por HPLC, mientras que la concentración de metanol por cromatografía de gases.

2.8. Determinación de azúcares reductores

La concentración de azúcares reductores presentes durante el transcurso de la fermentación se evaluó mediante la prueba del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), para lo cual se adicionaron 0.5 ml del reactivo DNS a 0.5 ml de la muestra previamente centrifugada y filtrada. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro a 540 nm, de acuerdo a lo reportado por Bello-Gil *et al*. (2006). La reacción generada entre azúcares reductores y el reactivo DNS se graficó haciendo uso del software GraphPad Prism 5.0.

2.9. Cuantificación de azúcares residuales y etanol por HPLC

Para la determinación y cuantificación de los azúcares residuales en la fermentación, se utilizó 1 mL de la muestra, el cual se transfirió a tubos y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min. Una vez centrifugada la muestra, se filtró y se inyectó en el loop del HPLC de la marca Perkin Elmer. Se utilizó una columna REZEX, RNM-Carbohydrate de 300 x 7.8 mm. Como fase móvil se utilizó agua grado HPLC con una tasa de flujo de 0.2 mL/min, a una temperatura de 80 °C. Para el análisis de los datos obtenidos se usó el programa UT60E

Aceptado/Accepted

Este manuscrito ha sido aceptado después de una revisión a doble-ciego por pares y será publicado en una futura edición de esta revista. Su contenido es definitivo y únicamente cambiará en la versión final la información relativa al volumen, número, fecha de publicación y paginado.

Interface Program_Ver.2.02. Los valores obtenidos fueron analizados con el programa CHROMULAN.

2.10. Determinación de metanol por cromatografía de gases

La concentración de metanol se determinó mediante inyección directa del destilado del producto de la fermentación, a un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de ionización de llama (Agilent 7890B). Se utilizó una columna de stabilwax (Restek Corporation) de polietilenglicol (60,00 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de película), y helio como gas portador a una tasa de flujo de 2 ml/min. La temperatura inicial del horno fue de 32 °C durante 5 min, con un incremento progresivo a 80 °C a una velocidad de 4 °C/min, el inyector y las temperaturas del detector fueron de 250 °C. La cuantificación se realizó usando un estándar comercial (Sigma Aldrich). Los factores de calibración se determinaron utilizando un estándar externo y la creación de modelos de regresión lineal.

2.11. Análisis estadístico

Los resultados son el promedio de tres réplicas de tres experimentos independientes que se analizaron con el software estadístico GraphPad Prism 5.0. Los resultados se expresaron como el promedio ± el error estándar (EE).

3. Resultados y discusión

La guayaba es una fruta que contiene altas concentraciones de nutrientes, pero una vida útil corta, por lo que su transformación en productos que permitan prolongar su uso y aprovechamiento es esencial (Bhat *et al*., 2015; Gutierrez-Montiel *et al*., 2023). El potencial del uso de guayaba para la producción de vino fue analizado por Singh and Puyo, (2014), mientras que Younis *et al*. (2014), elaboraron vino utilizando guayaba y ciruela india (Ziziphus mauritiana), Nikhanj *et al*. (2017), realizaron la fermentación de guayaba tras una hidrólisis enzimática, y Bertagnolli *et al*. (2017), desarrollaron y caracterizaron un vino espumoso de guayaba. En los trabajos mencionados la fermentación se llevó a cabo utilizando levaduras *Saccharomyces*, sin embargo, se ha reportado que las levaduras no-*Saccharomyces*, pueden aumentar la concentración de glicerol, disminuir la acidez y estabilizar el color, así como producir diversos compuestos que generan productos con características diferentes a los elaborados con levaduras *Saccharomyces* (Gamero *et al*., 2016; Varela, 2016; Benito *et al*., 2019; Morata *et al*., 2019), como es en la fermentación de cacao por una levadura *Kluyveromyces* (Santos *et al*., 2020), y la producción de "comiteco", mediante la fermentación de miel de panela y Agave americana por la levadura *K. marxianus* LEV-03-ITTG (Lara-Hidalgo *et al*., 2017). Por lo anterior, en el presente trabajo se llevó a cabo la fermentación alcohólica de guayaba usando la levadura *K. marxianus* UMPe-1. Para la comparación de los resultados obtenidos se utilizó la levadura *S. cerevisiae* Ethanol Red®, la cual fue desarrollada y es comercializada para la producción industrial de etanol (Lesaffre, France). La guayaba utilizada en el presente trabajo fue recolectada de la región productora de Zitácuaro, Michoacán, México, en donde se llegan a desechar grandes cantidades debido a problemas de poscosecha, así como por existir una mayor producción que la demanda del mercado (Gutierrez-Montiel *et al*., 2023). La guayaba seleccionada como se menciona en materiales y métodos, fue sometida a un proceso de troceado, molido, y aclarado mediante una hidrólisis enzimática con la pectinasa 162 L de Biocatalysts.

La pulpa de color rosado obtenida mediante el troceado y molido de la guayaba presentó 10.93 °Brix con un pH de 4.15, parámetros que cambiaron tras la hidrólisis enzimática, filtrado y esterilizado, ya que se obtuvo un jugo de menor viscosidad, color rojo intenso, y olor característico, con 14.30 °Brix y un pH de 4.67. El aclaramiento de la pulpa de guayaba mediante la hidrólisis enzimática permitió reducir de manera significativa la cantidad de pectina, concordando con lo reportado por Rai *et al*. (2004), en donde mencionan que el tratamiento enzimático de la pulpa de guayaba es un proceso importante para llevar a cabo su fermentación ya que disminuye la viscosidad y cantidad de sólidos insolubles en alcohol, contribuyendoa las posteriores operaciones de clarificación. Una vez aclarada la pulpa de guayaba se procedió a su ajuste a 14 °Brix, ya que la concentración de azúcares iniciales en la materia a fermentar, es un parámetro importante en la producción final de etanol y calidad sensorial del producto de fermentación (Shadbahr *et al*., 2017).

Las levaduras *K. marxianus* son capaces de producir etanol mediante la fermentación de diferentes sustratos, metabolizar pentosas y hexosas, son reconocidas como GRAS (Generally recognaized As Safe), y presentan una tasa de crecimiento mayor que las levaduras *S. cerevisiae* (Mo *et al*., 2019), sin embargo, no existen antecedentes de su empleo para la fermentación de los azúcares de guayaba. La levadura *K. marxianus* UMPe-1 utilizada en el presente trabajo, fue aislada de agave pútrido y agave fermentado, y seleccionada mediante su capacidad para metabolizar glucosa y fructosa en la fermentación de mostos de agave (López-Alvarez *et al*., 2012). La inoculación de la pulpa de guayaba se realizó utilizando un pre-inóculo del 10% v/v como es mencionado por Ortiz *et al*. (2008). La cantidad de células en el pre-inóculo determinada mediante un microscopio óptico y una cámara de recuento de Neubauer, fue ajustada para inocular igual cantidad de células (1×10^7 células/mL) de la levadura *K. marxianus* UMPe-1 y *S. cerevisiae* Ethanol Red®. Una vez inoculadas las levaduras las muestras de la fermentación fueron tomadas cada 72 h, hasta detectar un consumo mayor al 90% de los azúcares, lo cual se registro a las 432 h de haber iniciado la fermentación con la levadura *K. marxianus* UMPe-1 (figura 1). El consumo de azúcares de la levadura UMPe-1 fue mayor desde las 144 h al consumo generado por la levadura Ethanol Red®, comportamiento que se mantuvo hasta el final del registro de la fermentación (figura 1). En la fermentación con la levadura *S. cerevisiae* Ethanol Red® el máximo consumo de azúcares fue del 58%, alcanzando tal valor a las 216 h, sin presentar desde ese momento cambios estadísticamente significativos hasta la ultima toma de muestra a las 432 h de fermentación (figura 1).

El mayor consumo de azúcares por la levadura UMPe-1 respecto a la levadura Ethanol Red®, observado en el presente trabajo, es similar con lo reportado por Fonseca et al. (2013),

Aceptado/Accepted

Este manuscrito ha sido aceptado después de una revisión a doble-ciego por pares y será publicado en una futura edición de esta revista. Su contenido es definitivo y únicamente cambiará en la versión final la información relativa al volumen, número, fecha de publicación y paginado.

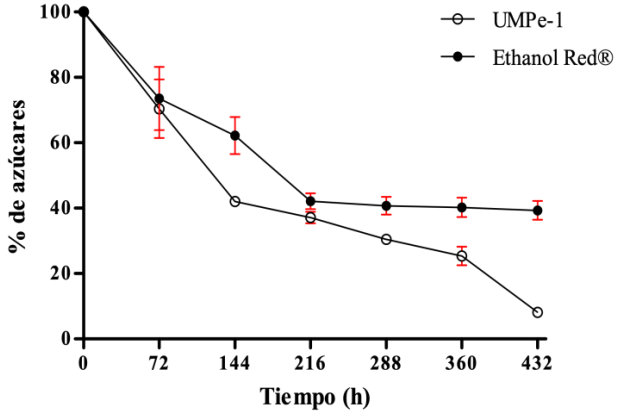

Figura 1: Consumo de azúcares reductores en la fermentación de pulpa de guayaba con las levaduras *K. marxianus* UMPe-1 y *S. cerevisiae* Ethanol Red®. El 100% de azúcares es equivalente a 14 g/L. El experimento se repitió en tres ocasiones y se graficó el promedio ± EE.

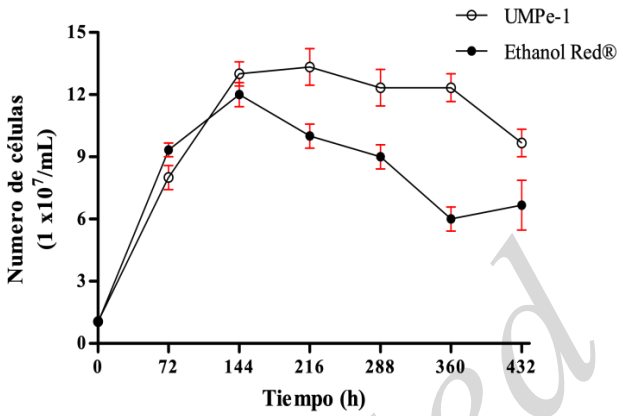

Figura 2: Número de células de las levaduras *K. marxianus* UMPe-1 y *S. cerevisiae* Ethanol Red® durante la fermentación de pulpa de guayaba. El experimento se repitió en tres ocasiones y se graficó el promedio ± EE.

en donde indican que la levadura K. marxianus CBS-6556 presentó un mayor consumo de glucosa, fructosa y sacarosa, en un período de tiempo más corto que las levaduras S. cerevisiae. López-Alvarez et al. (2012), reportaron que la levadura K. marxianus UMPe-1 presentó mejores cualidades fermentativas que la levadura S. cerevisiae Pan-1, en la elaboración de tequila, debido a una mayor producción de compuestos volátiles y etanol, con una mejor adaptación a estrés osmótico y etanólico. No obstante, no existen antecedentes de la comparación del consumo de azúcares entre una levadura K. marxianus y una S. cerevisiae, utilizando como sustrato pulpa de guayaba. Para las levaduras K. marxianus se ha observado la capacidad de llevar a cabo la fermentación de diferentes mostos en un amplio rango de temperaturas y condiciones (Bilal et al., 2022), características que pudieron favorecer el consumo de los azúcares por la levadura K. marxianus UMPe-1 (figura 1).

En la figura 2 se muestra el número de células de las levaduras K. marxianus UMPe-1 y S. cerevisiae Ethanol Red®, determinadas durante la fermentación como se menciona en material y métodos. Para ambas levaduras se observó el mayor aumento de células durante las primeras 72 h, manteniendo un crecimiento exponencial hasta las 144 h; posteriormente la levadura UMPe-1 mantuvo un número de células sin diferencias significativas hasta las 360 h, mientras que la levadura Ethanol Red® presentó un decremento progresivo.

El aumento exponencial de células para ambas levaduras en las primeras 144 h de la fermentación (figura 2), coincide con la reducción de los azúcares reductores (figura 1). En la muestra tomada a las 216 h de la fermentación ya existe una diferencia significativa en el número de células entre las levaduras utilizadas, diferencia que se incrementó conforme avanzo la fermentación, siendo significativamente mayor el número de células de la levadura *K. marxianus* UMPe-1 (figura 2), tal diferencia entre las levaduras utilizadas podría estar relacionada con su capacidad para consumir los diferentes azúcares de la guayaba, ya que las levaduras *K marxianus* se caracterizan por metabolizar diferentes azúcares así como por presentar una alta tasa de replicación (Mo et al., 2019).

La figura 3 representa los cromatogramas de HPLC de las fermentaciones con las levaduras K. marxianus UMPe-1 (figura 3a) y S. cerevisiae Ethanol Red® (figura 3b). En la figura 3a correspondiente al producto de la fermentación con la levadura K. marxianus UMPe-1, se observa a los 20.72 min una señal que corresponde a pectina, mientras que a los 26.02 y 38.27 min, se encuentran las señales que corresponden a la sacarosa y fructosa, respectivamente. La concentración de etanol fue determinada con la señal que se encuentra a los 44.53 min. En el cromatograma de la fermentación realizada con la levadura *S. cerevisiae* Ethanol Red® (figura 3b), se observa en el minuto 20.77 la señal correspondiente a pectina, mientras que a los 25.77, 32.45, y 36.33 min las señales de sacarosa, glucosa y fructosa, respectivamente. La señal detectada a los 44.72 minutos del cromatograma de la figura 3b, corresponde al etanol producido.

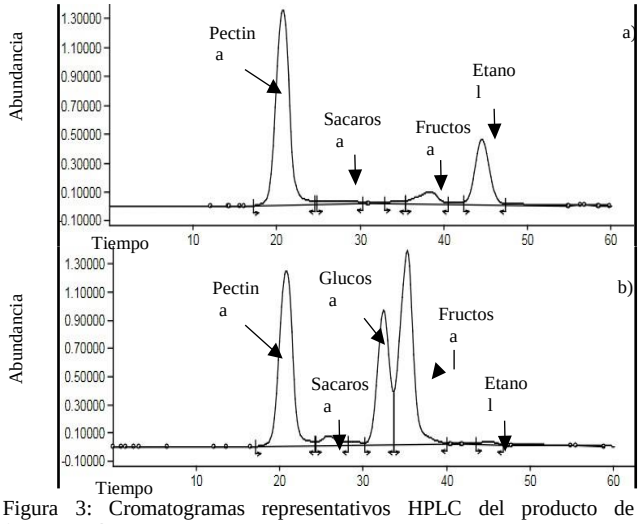

Figura 3: Cromatogramas representativos HPLC del producto de la fermentación de pulpa de guayaba utilizando la levadura *K. marxianus* UMPe-1 (a) y *S. cerevisiae* Ethanol Red® (b).

La señal detectada a los 44.72 minutos del cromatograma de la figura 3b, corresponde al etanol producido. En la figura 3a, no se aprecia la señal correspondiente a glucosa que se observa a los 32.45 minutos en la figura 3b. Los tiempos de elución de los azúcares y etanol fueron determinados previamente

Aceptado/Accepted

Este manuscrito ha sido aceptado después de una revisión a doble-ciego por pares y será publicado en una futura edición de esta revista. Su contenido es definitivo y únicamente cambiará en la versión final la información relativa al volumen, número, fecha de publicación y paginado.

mediante curvas de calibración con soluciones estándar de los compuestos mencionados.

Tabla 1: Concentración de azúcares detectados en los productos de las fermentaciones de pulpa de guayaba con las levaduras *K. marxianus* UMPe-1 y *S. cerevisiae* Ethanol Red®. Se muestra el promedio de tres experimentos ± EE.

Levadura	**Azúcares (g/100 mL)**			
Cepa	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Total
UMPe-1	0.19 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.01	0.26 ± 0.02
Ethanol Red®	0.25 ± 0.02	2.52 ± 0.01	3.73 ± 0.03	6.50 ± 0.04

La diferencia en el consumo de azúcares entre las levaduras *K. marxianus* UMPe-1 y *S. cerevisiae* Ethanol Red® (tabla 1), podría deberse a las diferencias metabólicas derivadas de las enzimas presentes en estas especies de levaduras (Tronchoni *et al*., 2009),ya que para cepas *K. marxianus* se ha reportado un consumo más eficiente de fructosa y sacarosa (Lane and Morrissey, 2010; Anagnostopoulos *et al*., 2017), mientras que en cepas de *S. cerevisiae* existe una preferencia por el consumo de glucosa sobre la fructosa y sacarosa (Berthels *et al*., 2004). Un consumo preferente de glucosa sobre fructosa por la levadura *S. cerevisiae* Ethanol Red®, conduce al estancamiento de la fermentación observado en la figura 1, debido a la mayor proporción de fructosa sobre glucosa (tabla 1) (Guillaume *et al*., 2007; Berthels *et al*., 2008). Lo anterior es un problema común e importante en la industria de los vinos en los cuales se emplea materia prima con altas concentraciones de fructosa (Blateyron and Sablayrolles, 2001), y que podría ser superado mediante el uso de cepas de levaduras como la *K. marxianus* UMPe-1.

La concentración de etanol y metanol generadas en la fermentación con la levadura UMPe-1 y Ethanol Red®, y determinadas mediante HPLC y cromatografía de gases, respectivamente, se muestran en la tabla 2. En el producto de la fermentación de la levadura *K. marxianus* UMPe-1 se detectaron 4.30 g/100 mL de etanol, concentración significativamente mayor que la del producto de la fermentación con la levadura *S. cerevisiae* Ethanol Red®, en donde se detectaron 0.44 g/100 mL, siendo esta concentración 10 veces menor (tabla 2). La concentración de metanol en el producto de la fermentación con la levadura *S. cerevisiae* Ethanol Red® (0.06 g/100 mL) fue ligeramente menor al determinado en la fermentación con la levadura *K. marxianus* UMPe-1, ya que para esta levadura la cantidad de metanol fue de 0.08 g/100 mL (tabla 2).

Al ser el etanol un producto del metabolismo de los azúcares por las levaduras, existe una relación entre el consumo de estos y el etanol generado, por lo que la menor cantidad de etanol registrado en el producto de fermentación de la levadura *S. cerevisiae* Ethanol Red®, se debe a los azúcares de la guayaba que no fueron utilizados por esta levadura (tabla1), posiblemente debido al estancamiento de la fermentación por la mayor concentración de fructosa sobre glucosa (Berthels *et al*., 2008).

Tabla 2: Concentración de alcoholes detectados en los productos de las fermentaciones de pulpa de guayaba con las levaduras *K. marxianus* UMPe-1 y *S. cerevisiae* Ethanol Red®. Se muestra el promedio de tres experimentos ± EE.

Levadura	**Alcoholes (g/100 mL)**		
Cepa	Etanol	Metanol	Total
UMPe-1	4.30 ± 0.05	0.08 ± 0.01	4.38 ± 0.02
Ethanol Red®	0.44 ± 0.03	0.06 ± 0.00	0.50 ± 0.01

El metanol es un compuesto que se encuentra en la mayoría de las bebidas frutales fermentadas (Botelho *et al*., 2020), ya que es generado principalmente por la hidrólisis de pectina procedente de las frutas (Mendonca *et al*., 2011). La concentración de metanol detectado en los productos de la fermentación realizada por las levaduras utilizadas en este trabajo (tabla 2), se encuentra en los límites establecidos para la presencia de este compuesto en bebidas alcohólicas de acuerdo a la NOM-199-SCFI-2017, "Bebidas alcohólicas denominación, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba", por lo que su presencia no representa un riesgo para potenciales consumidores del producto de la fermentación de pulpa de guayaba. La baja concentración de metanol detectada fue promovida por la reducción de pectina generada mediante el proceso de aclaramiento enzimático realizado.

4. Conclusión

De acuerdo al consumo de azúcares y producción de etanol registrados en este trabajo, la levadura *K. marxianus* presentó mejor capacidad fermentativa de pulpa de guayaba que la levadura *S. cerevisiae*, por lo que la fermentación alcohólica con la cepa *K. marxianus* UMPe-1, representa una opción para el uso, transformación, y valorización de esta fruta.

Referencias

Amaya-Delgado, L., Herrera-Lopez, E. J., Arrizon, J., Arellano-Plaza, M., Gschaedler, A., (2013). Performance evaluation of *Pichia kluyveri*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in industrial tequila fermentation. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 29: 875–881.

Anagnostopoulos, D., Bozoudi, D., Tsaltas, D., (2017). Yeast Ecology of Fermented Table Olives: A Tool for Biotechnological Applications. InTech. DOI: 10.5772/intechopen.70760.

Bello, G. D., Carrera, B. E., Díaz, M. Y., (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. 2:45-50.

Berthels, N. J., Cordero, O. R., Bauer, F. F., Thevelein, J., Pretorius, I., (2004). Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by

Aceptado/Accepted

Este manuscrito ha sido aceptado después de una revisión a doble-ciego por pares y será publicado en una futura edición de esta revista. Su contenido es definitivo y únicamente cambiará en la versión final la información relativa al volumen, número, fecha de publicación y paginado.

wine yeast strains. FEMS Yeast Research. 4(7): 683– 689. DOI: 10.1016/j.femsyr.2004.02.005.

Berthels, N. J., Cordero, O. R., Bauer, F. F., Pretorius, I. S., Thevelein, J., (2008). Correlation between glucose/fructose discrepancy and hexokinase kinetic properties in different *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. Applied Microbiology and Biotechnology. 77(5): 1083- 1091. DOI: 10.1007/s00253-007-1231-2

Benito, Á., Calderón, F., Benito, S., (2019). The influence of *non-Saccharomyces* species on wine fermentation quality parameters. Fermentation. 5(3): 54-72. DOI: 10.3390/fermentation5030054

Bertagnolli, S., Bernardi, G., Donadel, J., Fogaça, A., Wagner, R., Penna, N., (2017). Natural sparkling guava wine: Volatile and physicochemical characterization. Ciência Rural. 47: 1-7. DOI:10.1590/0103-8478cr20151509

Bhat, R., Suryanarayana, L. C., Chandrashekara, K. A., Krishnan, P., Kush, A., Ravikumar, P., (2015). *Lactobacillus plantarum* mediated fermentation of *Psidium guajava* L. fruit extract. Journal of Bioscience and Bioengineering. 119: 430–432. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.09.007

Bilal, M., Ji, L., Xu, Y., Xu, S., Lin, Y., Iqbal, H. M. N., Cheng, H., (2022). Bioprospecting *Kluyveromyces marxianus* as a Robust Host for Industrial Biotechnology. Frontiers in bioengineering and biotechnology. 10: 1-18. DOI: 10.3389/fbioe.2022.851768

Blateyron, L., Sablayrolles, J. M., (2001). Stuck and slow fermentations in enology: statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. Journal of Bioscience

Botelho, G., Anjos, O., Estevinho, L. M., Caldeira, I., (2020). Methanol in grape derived, fruit and honey spirits: A critical review on source, quality control, and legal limits. Processes. 8: 1-21. DOI: 10.3390/pr8121609.

Campos-García, J., Sosa, C., Reyes de la Cruz, H., López-Alvarez, A., (2009). Levadura fermentadora para la elaboración de bebidas alcohólicas (Tequila, mezcal, vino, ron, charanda y otros destilados). Patente: MX/a/2007/014445, No. 271316.

Carvalho, P., Costa, C. E., Baptista, S. L., Domingues, L., (2021). Yeast cell factories for sustainable whey-to-ethanol valorisation towards a circular economy. Biofuel Research Journal. 32: 1529-1549. DOI: 10.18331/BRJ2021.8.4.4

Fonseca, G. G., de Carvalho, N. M. B., Gombert, A. K., (2013). Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. Applied Microbiology and Biotechnology. 97: 5055–5067. DOI: 10.1007/s00253-013-4748-6

Gamero, A., Quintilla, R., Groenewald, M., Alkema, W., Boekhout, T., Hazelwood, L., (2016). High-throughput screening of a large collection of non-conventional yeasts reveals their potential for aroma formation in food fermentation. Food Microbiology. 60: 147–159. DOI: 10.1016/j.fm.2016.07.006

González-Arias, S., Zúñiga-Moreno, A., García-Morales, R., Elizalde-Solis, O. V., Sánchez, F. J., Flores-Valle, S. O., (2021). Gasification of *Psidium guajava* L. Waste using supercritical water: evaluation of feed ratio and moderate temperatures. Energies. 14(9): 1-17. DOI: 10.3390/en14092555

Graciano-Fonseca, G., Heinzle, E., Witmann, C., Gombert, A. K., (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. Applied Microbiology and Biotechnology. 79: 339–354.

Guillaume, C., Delobel, P., Sablayrolles, J. M., Blondin, B., (2007). Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a mutated HXT3 allele enhances fructose fermentation. Applied and Environmental Microbiology. 73(8): 2432-2439. DOI: 10.1128/AEM.02269-06

Gutierrez-Montiel, D., Guerrero-Barrera, A. L., Chávez-Vela, N. A., Avelar-Gonzalez, F. J., Ornelas-García, I. G., (2023). *Psidium guajava L.*: From byproduct and use in traditional Mexican medicine to antimicrobial agent. Frontiers in Nutrition. DOI: 10:1108306. 10.3389/fnut.2023.1108306

Karim, A., Gerliani, N., AÃder, M., (2020). *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. International Journal of Food Microbiology. 333(6): 108818. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108818

Kocher, G. S., Pooja., (2011). Status of wine production from guava (*Psidium guajava L.*): A traditional fruit of India. African Journal of Food Science. 5 (16): 851-860. DOI: 10.5897/AJFSX11.008

Lane, M. M. Morrissey, J. P., (2010). *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow, Fungal Biology Reviews. 24: 17–26. DOI: 10.1016/j. fbr.2010.01.001

Lara-Hidalgo, C., Grajales-Lagunes, A., Ruiz-Cabrera, M. A., Ventura-Canseco, C., Gutierrez-Miceli, F. A., Ruiz-Valdiviezo, V. M., Abud A. M., (2017). *Agave americana* honey fermentation by *Kluyveromyces marxianus* strain for "Comiteco" production, a spirit from mexican southeast. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 16(3): 771-779.

Leonel, L., Arruda, P., Chandel, A., Felipe, M., Sene, L., (2021). Critical Reviews in Biotechnology *Kluyveromyces marxianus*: a potential biocatalyst of renewable chemicals and lignocellulosic ethanol production. Critical Reviews in Biotechnology. 41. DOI: 10.1080/07388551.2021.1917505

López-Alvarez, A., Díaz-Perez, 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. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.12.015

Mehmood, N., Alayoubi, R., Husson, E., Jacquard, C., Büchs, J., Sarazin, C., Gosselin, I., (2018). *Kluyveromyces marxianus*, an Attractive Yeast for Ethanolic Fermentation in the Presence of Imidazolium Ionic Liquids. International Journal of Molecular Sciences. 19(3): 887-902. DOI: 10.3390/ijms19030887

Mendonca, A. R., Geocze, C. A., Maria, S. C., Souza, O. E., (2011). Potential application of *Saccharomyces cerevisiae* strains for the fermentation of banana pulp. African Journal of Biotechnology. 10(18): 3608–3615.

Mo, W., Wang, M., Zhan, R., Yu, Y., He, Y., Lu, H., (2019). *Kluyveromyces marxianus* developing ethanol tolerance during adaptive evolution with significant improvements of multiple pathways. Biotechnology for Biofuels 12(1): 63-78. DOI: 10.1186/s13068-019-1393-z

Morata, A., Escott, C., Banuelos, M. A., Loira, I., Fresno, J. M. D., Gonzalez, C., Suarez-Lepe, J. A., (2019). Contribution of non- *Saccharomyces* yeasts to wine freshness. A review. Biomolecules, 10(1): 34-60. DOI: 10.3390/biom10010034

Moreno, M., Zampini, C., Costamagna, M., Sayago, J., Ordoñez, R., Isla, M., (2014). Phytochemical Composition and Antioxidant Capacity of *Psidium guajava* Fresh Fruits and Flour. Food and Nutrition Sciences. 5: 725-732. DOI: 10.4236/fns.2014.58082

Minh, N. P., Pham, V. T., Tre, T. T., Kieu, T. T., Nhu, N. T., Thi, T., Van,C.,(2019). Different factors affecting Guava (*Psidium guajava*) wine fermentation. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 11(4): 1458-1463.

Nikhanj, P., Kocher, G., Boora, R., (2017). Fermentative production of *guava* wine from pectinase treated and untreated juice of 'punjab pink' cultivar of *Psidium guajava L*. Agricultural Research Journal. 54: 244. DOI: 10.5958/2395-146X.2017.00044.8.

Nini, Z., Feier, W., Marknoah, C., Nwamba, D., Wang, J. H., (2023). Enhancing tolerance of *Kluyveromyces marxianus* to lignocellulose-derived inhibitors and its ethanol production from corn cob via overexpression of a nitroreductase gene. Industrial Crops and Products. 117-136. DOI: 10.1016/j.indcrop.2023.117136.

Nurcholis, M., Lertwattanasakul, N., Rodrussamee, N., Kosaka, T., Murata, M.,Yamada, M., (2020). Integration of comprehensive data and biotechnological tools for industrial applications of *Kluyveromyces marxianus*. Applied Microbiology and Biotechnology. 104: 475– 488. DOI: 10.1007/s00253-019-10224-3

Ortiz, Á., Reuto, J., Fajardo, E., Sarmiento, S., Aguirre, A., Arbeláez, G., Gómez, D., Quevedo-Hidalgo, B., (2008). Evaluación de la capacidad probiótica "*in vitro*" de una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae*. Universitas Scientiarum. 13(2): 138-148.

Palachum, W., Choorit, W., Manurakchinakorn, S., Chisti, Y., (2020). Guava pulp fermentation and processing to a vitamin B12-enriched product. Journal of Food Processing and Preservation. 44(8): 1-15. DOI: 10.1111/jfpp.14566

Rai, P., Majumdar, G. C., Dasgupta, S. De, S., (2004). Optimizing pectinase usage in pretreatment of mosambi juice for clarification by response surface methodology. Journal of Food Engineering. 64: 397-403. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2003.11.008

SAGARPA. (2017). Aumenta 8.2 por ciento producción de guayaba en México en el ultimo trienio. Accesado: julio 2023 [En linea]. Disponible en:*http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/nayarit/boletines/Paginas/BNSAGENE072017.aspx#.*

Santos, D. S., Rezende, R. P., Santos, T. F., Marques, E. L. S., Ferreira, A. C. R., Silva, A. B. C., (2020). Fermentation in fine cocoa type *Scavina*: change in standard quality as the effect of use of starters yeast in fermentation. FoodChemistry.328:7-12.DOI:10.1016/j.foodchem.2020.127110

Sevda, S. B., Rodrigues, L., (2011). Fermentative behavior of *saccharomyces* strains during guava *(Psidium guajava L*) must fermentation and optimization of guava-wine production. Journal of Food Processing & Technology. 2: 118-27. DOI: 10.4172/2157- 7110.1000118

El DOI puede ser empleado para citar este manuscrito, pero será habilitado hasta la publicación en Pädi.

Este manuscrito ha sido aceptado después de una revisión a doble-ciego por pares y será publicado en una futura edición de esta revista. Su contenido es definitivo y únicamente cambiará en la versión final la información relativa al volumen, número, fecha de publicación y paginado.

Shadbahr, J., Khan, F., Zhang, Y., (2017). Kinetic modeling and dynamic analysis of simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to bioethanol. Energy Conversion and Management. 141: 236-243.

Shankar, S., Dilip, J., Narayana, R. Y., (2006). Fermentation of guava pulp with grape grown yeast (*S.cerevisae* var. *ellipsoideus*) for wine production. Indian Journal of Horticulture. 63: 171-173.

Singh, E., Puyo, A., (2014). Wine production process from guava (*Psidium guajava* L.). International Journal of Enology and Viticulture. 1(8): 89-97.

Tesfaw, A., Toksoy, O., Ebru, Assefa, F., (2021). Evaluating crude whey for bioethanol production using non-*Saccharomyces* yeast, *Kluyveromyces marxianus*. SN Applied Sciences. 3: 42-50. DOI: 10.1007/s42452-020-03996-1

Tronchoni, J., A. Gamero, F. N. A. Lopez, E. Barrio, A. Querol., (2009). Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. International journal of food microbiology. 134: 237-243. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.004

Varela, C., (2016). The impact of non-Saccharomyces yeasts in the production of alcoholic beverages. Applied Microbiology and Biotechnology. 100(23): 9861– 9874. DOI: 10.1007/s00253-016-7941-6

Younis, K., Siddiqui, S., Jahan, K., Dar, M. S., (2014). Production of wine from over ripe guava (Psidium guajava L Cv. Safada) and ber (Ziziphus mauritiana L Cv. Umran) fruits using Saccharomyces crevices Var. HAU IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology. 8: 93-96. DOI: 10.9790/2402-08149396

Aceptado/Accepted

El DOI puede ser empleado para citar este manuscrito, pero será habilitado hasta la publicación en Pädi.