



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO
FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y DE ALIMENTOS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS**

**DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS DE
IMPORTANCIA SENSORIAL PRODUCIDOS
POR LEVADURAS DURANTE LA
FERMENTACIÓN DE SIDRA**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO DE ALIMENTOS

WALDIR DESIDERIO ESTELA ESCALANTE

Callao, marzo de 2006

PERÚ

Id. Exemplar: 39188

**DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS DE
IMPORTANCIA SENSORIAL PRODUCIDOS
POR LEVADURAS DURANTE LA
FERMENTACIÓN DE SIDRA**

DEDICATORIA

A mi madre y hermanos
quienes siempre
estuvieron a mi lado en
los momentos más
difíciles de la vida

AGRADECIMIENTOS

- A mi asesora, **Ing. Mg. Dániza Guerrero Alva**. Profesora de la Facultad de Ingeniería Pesquera y de Alimentos de la Universidad Nacional del Callao, por guiarme y hacer posible la realización del trabajo de investigación.
- A un amigo Dr. MCsc. Mojmir Rychtera, Ing. Profesor de la Universidad de Tecnología Química en Praga, por sus consejos y colaboración en la realización de los experimentos.
- A la Blga. Mg. Elena L. Quillaza Polo. Profesora de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por facilitarme realizar algunos experimentos en el laboratorio de Biotecnología.
- Al la Dirección del Centro de Experimentación Tecnológica (CET), por facilitarme la utilización de sus laboratorios.
- A la Dirección de los laboratorios de Chuchito por facilitarme la utilización del laboratorio de microbiología.

INDICE GENERAL

RESUMEN	15
INTRODUCCIÓN	17
CAPITULO I: EL PROBLEMA	19
1.1. Formulación y definición del problema	19
1.2. Justificación	20
1.3. Importancia	22
CAPITULO II: OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo general	23
2.2. Objetivos específicos	23
CAPITULO III: MARCO TEÓRICO	25
3.1. Antecedentes del problema	25
3.2. Morfología, fisiología y metabolismo de levaduras	27
3.2.1. Levaduras en el medio ambiente natural	27
3.2.2. Criterios básicos para la clasificación e identificación de levaduras	28
3.2.3. Claves para la identificación de levaduras	29
3.2.3.1. Características morfológicas	29
3.2.3.2. Características fisiológicas	30
3.2.3.3. Biología molecular	30
3.2.4. Reproducción de levaduras y características morfológicas de células vegetativas	30
3.2.5. Características fisiológicas	32
3.2.5.1. Fermentación	33
3.2.6. Clasificación de levaduras	34
3.2.7. Metabolismo de azúcares por levaduras	35
3.2.8. Influencia de etanol sobre el metabolismo de levaduras	41
3.2.9. Influencia de sulfito en el metabolismo de levaduras	43
3.3. Sub-productos producidos por levaduras durante la fermentación	45

3.3.1. Producción de etanol por levaduras	45
3.3.2. Rendimiento de la fermentación alcohólica	46
3.3.3. Síntesis de ésteres por levaduras	47
3.3.4. Síntesis de alcoholes superiores por levaduras	49
3.3.5. Síntesis de glicerol por levaduras	53
3.3.6. Formación de terpenoides por levaduras	54
3.4. Elaboración de sidra	55
3.4.1. Manzanas para elaboración de sidra	56
3.4.2. Característica de las manzanas sidreras	57
3.4.3. Fermentación de sidra	59
3.4.4. Azúcares y tasa de fermentación	62
3.4.5. Levaduras en la fermentación de sidra	63
3.4.6. Elaboración de sidra	64
3.4.7. Prácticas comunes en la elaboración de sidra	67
3.4.7.1. Amelioración	67
3.4.7.2. Deficiencia de nitrógeno	68
3.5. Determinación de compuestos por cromatografía	68
3.5.1. Análisis por cromatografía de gas	69
3.5.2. Detector de ionización de flama (FID)	70
3.5.2.1. Linearidad del detector: Curva de calibración	70
3.5.2.2. Factores de respuesta del detector	71
3.5.3. Análisis cuantitativo por cromatografía de gas	72
3.5.3.1. Cuantificación de compuestos por GC usando estándares	73
3.5.3.2. Método del estándar interno	74
3.5.4. Cromatografía líquida	75
3.5.4.1. Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)	76
3.5.4.2. Detector del índice de refracción (RID)	76
3.5.4.3. Análisis cuantitativo por HPLC	77
3.5.4.4. Cuantificación de compuestos por HPLC usando estándares	78
CAPITULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS	80
A. Lugar de ejecución	80
B. Materia prima e insumos	82

C. Equipos y materiales	82
4.1. Estudio de la morfología, fisiología y metabolismo de levaduras	83
4.1.1. Cepas de levadura ensayadas	83
4.1.2. Mantenimiento de las cepas de levadura	83
4.1.2.1. Composición del medio de cultivo sólido	83
4.1.3. Ensayos para determinar la morfología de la levadura	84
4.1.3.1. Composición del medio de cultivo	84
4.1.4. Ensayos de fisiología en levaduras	85
4.1.4.1. Composición del medio de cultivo	85
4.2. Ensayos de producción de etanol por levaduras	86
4.2.1. Medio de cultivo y fermentación	86
4.2.2. Preparación de inóculo	86
4.2.3. Composición del medio de cultivo	87
4.3. Producción de etanol por levaduras en jugo de manzana	87
4.3.1. Medio de cultivo	87
4.3.2. Condiciones de fermentación	88
4.3.3. Preparación de inóculo	88
4.4. Ensayos de la influencia de etanol en levaduras	89
4.4.1. Tolerancia al etanol por levaduras en condiciones anaeróbicas	89
4.4.2. Tolerancia al etanol por levaduras en condiciones aeróbicas	89
4.4.3. Composición del medio	90
4.5. Ensayos de la influencia de sulfito en levaduras	90
4.5.1. Tolerancia al sulfito en condiciones anaeróbicas	90
4.5.2. Tolerancia al sulfito en condiciones aeróbicas	91
4.5.3. Composición del medio de cultivo	91
4.6. Elaboración de sidra y determinación de sub-productos producido por levaduras durante la fermentación	92
4.6.1. Cepas de levadura ensayadas	94
4.6.2. Medio de cultivo y fermentación	94
4.6.3. Preparación de inóculo	94
4.6.4. Condiciones de fermentación	95
4.7. Análisis de compuestos por cromatografía líquida y gaseosa	96

4.7.1. Cromatografía de gas	96
4.7.1.1. Preparación de curvas de calibración	97
4.7.1.2. Análisis de compuestos volátiles	99
4.7.1.3. Método de extracción	100
4.7.1.4. Ecuaciones para calcular la cantidad de analito en la muestra	101
4.7.2. Cromatografía líquida (HPLC)	102
4.7.2.1. Preparación de curvas de calibración	102
4.7.2.2. Análisis de compuestos no volátiles	104
4.7.2.3. Ecuaciones para calcular la cantidad de analito en la muestra	105
CAPITULO V: RESULTADOS	106
5.1. Estudio de morfología, fisiología y metabolismo de levaduras	106
5.1.1. Características morfológicas de levaduras	106
5.2. Fermentación de diferentes fuentes de carbono	110
5.3. Producción de etanol por levaduras	113
5.4. Tolerancia al etanol a condiciones aeróbicas y anaeróbicas	117
5.5. Tolerancia al sulfito a condiciones aeróbicas y anaeróbicas	123
5.6. Determinación de sub-productos del metabolismo de levaduras	128
5.6.1. Cromatografía de gas y líquida de soluciones estándares. Búsqueda de condiciones óptimas de análisis	128
5.7. Análisis de compuestos sensoriales producidos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas	130
CAPITULO VI: DISCUSIÓN DE RESULTADOS	133
CAPITULO VII: CONCLUSIONES	143
CAPITULO VIII: RECOMENDACIONES	150
CAPTULO IX: BIBLIOGRAFÍA	153
APÉNDICE	171

ÍNDICE DE TABLAS

Número	TÍTULO	Página
1	Tipos de reproducción y morfología de algunos géneros de levadura	31
2	Analitos utilizados como estándares en cromatografía de gas	98
3	Analitos utilizados como estándares en HPLC	104
4	Habilidad de levaduras <i>Saccharomyces</i> y no- <i>Saccharomyces</i> para fermentar diferentes fuentes de carbono	112
5	Etanol producido por levaduras <i>Saccharomyces</i> y no- <i>Saccharomyces</i> en medio sintético a 28 °C	114
6	Etanol producido por levaduras <i>Saccharomyces</i> y no- <i>Saccharomyces</i> sobre jugo de manzana a condiciones aeróbicas a 16 °C	115
7	Etanol producido por levaduras <i>Saccharomyces</i> y no- <i>Saccharomyces</i> sobre jugo de manzana a condiciones aeróbicas a 28 °C	115
8	Etanol producido por levaduras <i>Saccharomyces</i> y no- <i>Saccharomyces</i> sobre jugo de manzana a condiciones anaeróbicas a 16 °C	116
9	Etanol producido por levaduras <i>Saccharomyces</i> y no- <i>Saccharomyces</i> sobre jugo de manzana a condiciones anaeróbicas a 28 °C	116
10	Habilidad de levaduras para fermentar glucosa a 28 °C durante 72 horas en un medio conteniendo etanol a diferentes concentraciones	118
11	Fase lag en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIVE 15-1-416 y <i>Candida stellata</i> RIVE 3-16-1 cultivados en medio sintético conteniendo etanol a diferentes concentraciones	120
12	Fase lag en <i>Hansenula anomala</i> RIVE 7-1-5 y <i>Kloeckera apiculata</i> RIVE 9-2-1 cultivado en medio sintético a 28 °C, conteniendo etanol a diferentes concentraciones	121
13	Fase lag en <i>Bretanomyces intermedius</i> RIVE 2-2-2 y <i>Saccharomyces ludwigii</i> RIVE 16-1-5 cultivados en medio sintético a 28 °C conteniendo etanol a diferentes concentraciones	123
14	Habilidad de levaduras para fermentar a condiciones anaerobias un medio conteniendo diferentes concentraciones de metabisulfito	125
15	Fase lag en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIVE 15-1-416 y <i>Saccharomyces ludwigii</i> RIVE 16-1-5 cultivados en medio sintético conteniendo diferentes concentraciones de metabisulfito	127

16	Ecuaciones y correlación (r^2) de los analitos utilizados en cromatografía gaseosa	129
17	Sub-productos del metabolismo anaeróbico producido por levaduras <i>Saccharomyces</i> y no- <i>Saccharomyces</i> en cultivos puros, mixtos y secuenciales	131
18	Sub-productos del metabolismo aerobio producido por levaduras <i>Saccharomyces</i> y no- <i>Saccharomyces</i> en cultivos puros, mixtos y secuenciales	132
19	Compuestos volátiles mayoritarios en sidras de Asturias	141
20	Composición química de jugo de manzana comercial	172
21	Composición química de sidra comercial	173
22	Compuestos volátiles de jugo de manzana comercial	174

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	TÍTULO	Página
1	Metabolismo de diferentes azúcares en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
2	Inter-relación metabólica conduciendo a la formación de esteres en levaduras	49
3	Formación de alcoholes superiores a partir de aminoácidos	51
4	Metabolismo de aminoácidos unido a la síntesis de alcoholes superiores en levaduras	52
5	Reacciones de biotransformación de monoterpenos en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
6	Flujograma de elaboración de sidra	66
7	Flujograma del proceso de elaboración de sidra y de los ensayos de fermentación	93
8	Célula de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIVE 15-1-416 cultivado en medio sintético líquido Wickerham	107
9	Célula de levadura <i>Candida stellata</i> RIVE 3-16-1 cultivado en medio sintético líquido Wickerham	107
10	Célula de levadura <i>Brettanoyces intermedius</i> RIVE 2-2-2 cultivado en medio sintético líquido Wickerham	108
11	Célula de levadura <i>Kloeckera apiculata</i> RIVE 9-2-1 cultivado en medio sintético líquido Wickerham	109
12	Célula de levadura <i>Saccharomycodes ludwigii</i> RIVE 16-1-5 cultivado en medio sintético líquido Wickerham	109
13	Célula de levadura <i>Hansenula anomala</i> RIVE 7-1-5 cultivado en medio sintético líquido Wickerham	110
14	Tolerancia de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIVE 15-1-416 a diferentes concentraciones de etanol	119
15	Tolerancia de <i>Candida stellata</i> RIVE 3-16-1 a diferentes concentraciones de etanol	119
16	Tolerancia de <i>Hansenula anomala</i> RIVE 7-1-5 a diferentes concentraciones de etanol	120
17	Tolerancia de <i>Kloeckera apiculata</i> RIVE 9-2-1 a diferentes concentraciones de etanol	121

18	Tolerancia de <i>Brettanomyces intermedius</i> RIVE 2-2-2 a diferentes concentraciones de etanol	122
19	Tolerancia de <i>Saccharomyces ludwigii</i> RIVE 16-1-5 a diferentes concentraciones de etanol	122
20	Tolerancia de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIVE 15-1-416 a diferentes concentraciones de sulfito	126
21	Tolerancia de <i>Saccharomyces ludwigii</i> RIVE 16-1-5 a diferentes concentraciones de sulfito	127

LISTA DE ABREVIACIONES

ATP	Adenosina trifosfato	HPLC	Cromatografía de alta performancia
Ac-CoA	Acetil-coenzima A	NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotido
AAT _{asa}	Alcohol acetil transferasa	NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotido reducido
CoA-SH	Coenzima A reducido	NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
CoA	Coenzima A	PEP	Fosfoenol piruvato
C/N	Ratio carbono-nitrógeno	1,3diPG	1,3-difosfoglicerato
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato	3PG	3-fosfoglicerato
F1,6P ₂	Fructosa-1,6 difosfato	Pi	Fosforo inorgánico
F6P	Fructosa, 6-fosfato	RID	Detecor de índice de refracción
FADH	Flavin adenina dinucleotido reducido	TCA	Ciclo del ácido tricarboxílico
FAD	Favin adenina dinucleotido	UFA	Acidos grasos insaturados
G3P	Glucosa, 3-fosfato	GC	Cromatografía de gas
G6P	Glucosa, 6-fosfato	FID	Detector de ionización de flama
GA3P	Gliceraldehído, 3-fosfato	α KG	α -Cetoglutarato

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se estudió las características de fermentación de levaduras *Saccharomyces* y *no-Saccharomyces* y sus posibles usos en los procesos de elaboración de sidra. Entre las características estudiadas fueron: la producción de etanol, tolerancia al etanol y al sulfito, y síntesis de sub-productos, producidos durante la fermentación a condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Los análisis de los compuestos se realizaron por cromatografía de gas, donde se utilizó un método rápido de micro-extracción de compuestos volátiles con diclorometano; y por cromatografía líquida de alta performance, por inyección directa de la muestra filtrada y/o diluida al equipo. Se realizaron además fermentaciones bajo condiciones anaeróbicas y aeróbicas con culturas puras, mixtas y secuenciales utilizando como substrato jugo de manzana concentrado, ultrafiltrado y aroma removido durante el proceso de concentración para evaluar aisladamente los compuestos sensoriales producidos por las levaduras. La cepa de levadura *Candida stellata* RIVE 3-16-1 produjo concentraciones de etanol de hasta 51.2 g/L en anaerobiosis a 16 °C, también una alta concentración de glicerol sobre 3.8 g/L en anaerobiosis, lo cual es favorable en la producción de sidra. Por otra parte la cepa de *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1 fue una buena productora de etil acetato en anaerobiosis, sobre 196 mg/L en cultivos puros y secuenciales, y su síntesis puede ser monitoreado para producir la concentración requerida de este compuesto en procesos de elaboración de sidra. *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 también mostró tener buenas características de fermentación en cultivos puros, mixtos y secuenciales. La cepa de *Saccharomycodes ludwigii* RIVE 16-1-5, tuvo un comportamiento similar comparado

con las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 ya que produjo concentraciones de etanol del orden de 54,3 g/L en anaerobiosis a 28 °C, además presentó una alta tolerancia a diversas concentraciones de sulfito incluso mucho mayores que la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 cultivada en condiciones anaeróbicas y aeróbicas. Por otro lado, los resultados demostraron que las fermentaciones a temperatura de 16°C fueron más favorables para *Candida stellata* RIVE 3-16-1, en cuanto a la producción de etanol respecto a las fermentaciones trabajadas a 18°C. La cepa de *Bretanomyces intermedius* RIVE 2-2-2 produjo bajas concentraciones de etanol (26 g/L), pero considerables concentraciones de ácido acético (333 mg/L) en cultivo mixto con *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 en anaerobiosis, por tanto ésta cepa no sería de interés para los procesos de elaboración de sidra. Los resultados de este trabajo finalmente mostraron que las cepas de levadura con características más favorables para ser utilizadas en los procesos de elaboración de sidra fueron: *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416, *Candida stellata* RIVE 3-16-1 y finalmente *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1.

INTRODUCCIÓN

El significado del término sidra varía considerablemente en el mundo. En los Estados Unidos se refiere al jugo de manzana fresca recién exprimida. En Inglaterra y Australia ésta palabra se usa para denotar al jugo fermentado de manzana, lo que los americanos llaman “hard cider”. El jugo fermentado de manzana es conocido en varios países europeos con una variedad de nombres: cidre (Francia), sidre (Italia), sidra (España), y apfelwein (Alemania y Suiza).

La sidra es elaborada con variedades de manzana especialmente cultivadas para este propósito. La sidra es una bebida fresca de bajo contenido alcohólico, producto de la fermentación de mosto de manzanas, su acidez y dulzor varían según la variedad de manzana utilizada en su producción.

La sidra es elaborada a partir de manzanas y puede capturar los complejos aromas de la fruta, contiene cinco o siete por ciento de alcohol, es una bebida única y a causa de su bajo contenido de alcohol es mucho menos intensa que el vino. En España, Francia e Inglaterra el sabor de la sidra es diferente, la razón es que ellos tienen diferentes estilos y tradiciones de elaboración aunadas a tecnologías emergentes.

Importancia de levaduras *no-Saccharomyces*

Las levaduras *no-Saccharomyces* son conocidas como “levaduras salvajes” ya que no son comúnmente utilizados en la industria de las bebidas fermentadas y pueden ser encontrados en la naturaleza sobre las superficies de frutas, hojas, suelo, agua, etc.

Recientemente, estas levaduras están tomando importancia en la industria alimentaria y principalmente en la industria de bebidas alcohólicas. Particularmente, la industria de bebidas alcohólicas envuelve la cervecería, vinería, sidrería, etc., y hablar acerca de estas levaduras y su implicancia en el aroma y sabor de las bebidas fermentadas va más allá que hablar de cualquier grado de contaminación o habitual causa de enfermedad en la manufactura de cualquier bebida alcohólica así, ello depende del tipo de bebida que nosotros queramos elaborar; por ejemplo en la industria del vino es comúnmente usado la especie *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, etc., y esto debido a su simplicidad y bien conocida actividad metabólica. Las levaduras *no-Saccharomyces* presentan similar comportamiento metabólico en general, ellos son capaces de fermentar diferentes azúcares tales como glucosa, fructosa y sucrosa usando la vía glucolítica para producir durante su metabolismo casi el mismo perfil de productos secundarios pero en diferentes cantidades, algunos de ellos difieren también en la manera de utilizar la fuente de carbono, con la ayuda de otras vías.

El objetivo de mi tesis estuvo orientado a la investigación de la actividad metabólica de levaduras durante la elaboración de sidra. La investigación en este campo es escasa debido a que los grupos de investigación son relativamente pequeños y existe sólo en pocos países. El instituto de investigación Long Ashton de la Universidad de Bristol en Reino Unido fué recientemente cerrado lo que disminuyó el flujo de publicaciones en este campo.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

1.1. Formulación y Definición del Problema

En la industria de vinos y cerveza son comúnmente utilizados levaduras *Saccharomyces*, pero el uso de levaduras *no-Saccharomyces* es muy limitado. Cuando se habla acerca de fermentación alcohólica independientemente de la producción de alcohol combustible llevado a cabo por levaduras o bacterias, nuestro pensamiento rápidamente relaciona la industria de vinos y cerveza olvidando que ello envuelve mucho más que eso, desde este punto de vista nosotros caemos en un círculo limitado que envuelve una industria muy grande y de ésta manera no damos suficiente importancia a la elaboración de otras bebidas alcohólicas fermentadas y no tradicionales, como es por ejemplo la sidra.

En el Perú, los artesanos tradicionales de producción de bebidas alcohólicas utilizan la fermentación espontánea para elaborar sus bebidas fermentadas, corriendo el riesgo de que el producto que puedan obtener no sea de gran aceptación en el público consumidor, no hay un conocimiento técnico de los que significa un proceso de fermentación tecnificado, que involucre la selección de una cepa adecuada de levadura, el control de la microflora no deseable en el mosto de fruta a utilizar y el control de factores como la aereación, inoculación,

temperatura, etc., para obtener una fermentación exitosa y desde luego un producto final de calidad.

1.2. Justificación

La elaboración de bebidas alcohólicas en nuestro medio tiene mucha tradición, desde siempre se conocía de manera empírica los procesos de fermentación y en la actualidad continúa desarrollándose esta antigua práctica sin observar cambio sustancial y sin miras a mejorar estos procesos y prácticas de elaboración, es decir en otras palabras este campo se ha petrificado hasta llegar al extremo de no aportar nada al desarrollo tecnológico, y las prácticas comunes que hasta ahora subsisten son por sí mismas ya obsoletas.

Hasta ahora se sigue creyendo que el secreto de un producto exquisito y de calidad está en lo artesanal de su elaboración, pensamiento que ya no subsiste en un mundo moderno.

Más aún los artesanos de la producción de vinos y bebidas fermentadas en su mayoría no tienen la menor idea de lo que sucede durante el proceso de fermentación alcohólica, en vista de ello nos preguntamos: ¿Cómo podrían llegar a saber si el producto final tendrá las características deseadas?

Esta especie de “filosofía” con que se cree elaborar bebidas alcohólicas nos ha llevado al punto de creer que una bebida alcohólica como por ejemplo el vino consiste de alcohol, agua y azúcar (azúcar de fruta) y esto ha conseguido que nos

alejemos de un mercado competitivo y sin posibilidad de que nuestro producto tenga un reconocimiento.

En la actualidad, en países desarrollados como Francia e Italia el desarrollo de este campo ha alcanzado la cima, las “buenas prácticas de elaboración” de bebidas alcohólicas fermentadas como son: Selección de materia prima, métodos innovados de fermentación y una selección adecuada de cepas de levadura marcan la diferencia entre lo que se produce en casa y fuera de ella.

Por otro lado refiriéndonos a la elaboración de bebidas no tradicionales como son: la chicha de jora, etc., la falta de investigación en el campo de fermentaciones alcohólicas referidas a estas bebidas, específicamente en el estudio del comportamiento de la microflora de levaduras durante la fermentación no nos permite determinar las características organolépticas que deben tener tales bebidas, por el contrario si esto se realiza será posible estandarizar el proceso para producir un producto uniforme y que esté inserto dentro de normas técnicas específicas.

Con este trabajo de investigación quiero aportar en lo posible, al mejor entendimiento de la actividad metabólica de las levaduras, al desarrollo y control de métodos de fermentación y a las “buenas prácticas de elaboración” de bebidas alcohólicas fermentadas en donde el conocimiento de las cepas de levaduras a utilizar por parte del tecnólogo, juegan un papel primordial para la obtención de un producto con las características de aroma y sabor deseados.

Debido a esta problemática y a la carencia de información científica en este campo y por todo lo expuesto anteriormente se justifica ampliamente el desarrollo del presente proyecto de investigación.

1.3. Importancia

El aporte de este trabajo de investigación será muy importante porque ayudará a dilucidar muchas dudas, y responder a muchas preguntas respecto al proceso de fermentación alcohólica orientado a la elaboración de sidra y otras bebidas alcohólicas fermentadas no tradicionales. El conocimiento de lo que sucede durante la fermentación ayudará al productor artesano de bebidas alcohólicas a mejorar su producto y lo más importante a controlar su proceso hasta llegar a estandarizarlo y de ésta manera tendrá un producto uniforme de calidad estándar.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

- Contribuir a un mayor y mejor entendimiento de las levaduras como microorganismos de uso industrial y de su actividad metabólica relacionada a los procesos de fermentación alcohólica y buscar alternativas de uso de estas especies *Saccharomyces* y *no-Saccharomyces* en la elaboración de sidra.

2.2. Objetivos Específicos

- Entender mejor el comportamiento fisiológico de levaduras *Saccharomyces* y *no-Saccharomyces* relacionadas a procesos de fermentación alcohólica.
- Evaluar el impacto de la actividad metabólica de levaduras y de las condiciones de fermentación en el sabor final de bebidas alcohólicas.
- Determinar y cuantificar los metabolitos de importancia sensorial producidos durante la fermentación.

- Determinar las condiciones adecuadas para llevar a cabo un proceso de fermentación que encuentre utilidad en la elaboración de bebidas alcohólicas fermentadas.
- Utilizar los resultados que se obtengan de los experimentos como: Producción y resistencia al etanol, resistencia al sulfito y síntesis de metabolitos de importancia sensorial, para elegir las cepas de levadura más adecuadas e idóneas para su posible uso en la elaboración de sidra y otras bebidas fermentadas.
- Integrar los resultados obtenidos en una recomendación para mejorar algunas partes tecnológicas en la elaboración de sidra.

CAPITULO III

MARCO TEÓRICO

3.1. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

En el Perú, nunca se ha experimentado un avance tecnológico real en el campo de los procesos de elaboración de bebidas alcohólicas fermentadas, llámese vinos, sidras, bebidas no-tradicionales, etc. Se ha necesitado que Chile silenciosamente desarrolle una tecnología propia en este campo para que así nosotros los interesados en desarrollar este campo, tengamos el deseo y la intención de hacerlo. En los últimos años se ha venido dando un avance sustancial en los procesos de producción de vinos, bebidas destiladas y bebidas no-tradicionales. Sin embargo, no es suficiente producir a grandes escalas un producto que no pueda ser competitivo en el mercado nacional y más aún en el internacional por no ser de calidad aceptable.

El conocimiento de los procesos de fermentación es una necesidad por parte del productor de bebidas alcohólicas así mismo una tecnificación de su proceso y adquisición de nuevos equipos.

Los procesos de elaboración de bebidas alcohólicas fermentadas en el Perú se realizan habitualmente mediante fermentaciones espontáneas las cuales se producen de forma natural, es decir, las realizan las levaduras provenientes de la

fruta y del material de bodega, sin ningún tipo de inoculación externa. Esto hace que las fermentaciones espontáneas no sean producto de la acción de una única especie o cepa de levadura, sino una sucesión de especies y cepas diferentes a lo largo de la fermentación.¹

Se sabe que la calidad de una bebida alcohólica está claramente afectada por la variedad de levaduras, entre ellas *Saccharomyces cerevisiae* que llevan a cabo la fermentación.² De hecho las cualidades del vino dependen en gran parte de la naturaleza específica de las levaduras que se desarrollan durante la fermentación de los mostos. Así, si se sometiera un mismo mosto a la acción de levaduras distintas se lograrían vinos de distinta naturaleza.

La necesidad de asegurar la fermentación y la calidad del producto han hecho la utilización de cepas industriales. Pero se demostró que estas cepas no eran una solución universal para las fermentaciones de mostos y entonces apareció la necesidad de seleccionar cepas idóneas y estudiar sus actividades metabólicas y características de fermentación, para así encontrar su posible uso en la elaboración de una bebida alcohólica en particular.

3.2. MORFOLOGÍA, FISIOLÓGÍA Y METABOLISMO DE LEVADURAS

3.2.1. Levaduras en el Medioambiente Natural.

Las levaduras son microorganismos eucariotas los cuales pertenecen al reino fungí, ellos difieren de los mohos por que son unicelulares y su reproducción es mayormente por gemación, difieren de las algas por que no realizan fotosíntesis y finalmente difieren de las bacterias por que son más grandes en tamaño y son de diferente morfología.^{3,4} Cada especie tiene una apariencia específica e incluso crecidos sobre cultivo puro hay variaciones considerables en tamaño y formas de las células individuales, dependiendo de la edad y composición del medio. Las levaduras no tienen flagelos u otros organelos de locomoción y cuando crecen sobre medios de cultivo adecuados, las colonias varían en apariencia, textura y margen. Así, algunos de ellos pueden ser suaves o rugosos, voluminosos en forma o podrían tener filos definidos o ser irregulares.⁴

La reproducción de las levaduras puede ser asexual (vegetativa) y sexual, la reproducción vegetativa es por gemación y es la manera más común de reproducción donde una célula de levadura puede producir durante su vida un promedio de 24 células hijas, la célula de levadura sufre sólo mitosis y cada célula hija aparece en un lugar diferente sobre la superficie de la célula madre y como resultado de la división celular aparece cicatrices en el lugar donde apareció la yema, la reproducción por gemación toma lugar cuando las células de levadura son cultivadas en un medio de crecimiento adecuado.⁴ La fisión binaria es otro

tipo de reproducción asexual, es similar a la reproducción bacteriana, la célula de levadura se elonga, el núcleo se divide y finalmente resultan dos células nuevas, este es el caso de *Schizosaccharomyces sp.*, cuando se reproduce por fisión transversal. La reproducción sexual está representada por la habilidad de la levadura de conjugarse y esporular; comienza con la unión de dos células haploides de opuesto apareamiento para formar una célula diploide, las levaduras luego experimentan meiosis y así se nota la formación de ascus en donde usualmente habrá cuatro esporas haploides.⁵ La formación de esporas ocurre en respuesta a condiciones inadecuadas de crecimiento como deficiencia de nitrógeno ó temperaturas altas.⁴

3.2.2. Criterios Básicos para la Clasificación e Identificación de Levaduras.

Las levaduras se reproducen como células simples formando colonias viscosas de diferentes colores tales como: blanco, crema, anaranjado y otros, ésta es una característica usada para la identificación.⁶

Las características consideradas como indicadores básicos para la clasificación e identificación de levaduras son divididas en: crecimiento vegetativo incluyendo la morfología de la célula vegetativa, medio de cultivo, características de reproducción sexual, carácter fisiológico etc., cuando las condiciones del ensayo cambian los resultados también varían. Para llevar a cabo los tests es necesario utilizar un cultivo puro y considerar las siguientes condiciones; (1) las condiciones

de inoculación, la cantidad de inóculo; (2) la composición del medio de cultivo; (3) los instrumentos utilizados; (4) la temperatura y tiempo de intervalo del cultivo y (5) la evaluación de los resultados del test.⁷

3.2.3. Claves para la Identificación de Levaduras.

Debido al carácter morfológico simple que en general tienen las levaduras, para su identificación es necesario investigar su carácter fisiológico. El método de estudio para las levaduras en comparación con los mohos es más bien similar al utilizado en el estudio de bacterias, y las características descriptivas comunes usadas son:⁶

3.2.3.1. Características Morfológicas.

- a. Tipo de reproducción vegetativa
- b. Morfología de las células vegetativas
- c. Forma y morfología de las ascosporas
- d. Forma y morfología de las ballistosporas
- e. Aspecto externo de las colonias.

3.2.3.2. Características Fisiológicas.

- a. Formación de membrana en la superficie de un medio líquido
- b. Pruebas de fermentación y oxidación de compuestos carbonados
- c. Pruebas de utilización de fuentes de carbono y nitrógeno
- d. Crecimiento en un medio de cultivo sin vitaminas
- e. Pruebas de producción de sustancias similares al almidón
- f. Producción de pigmentos carotenoides
- g. Producción de ésteres
- h. Producción de ácidos orgánicos
- i. Temperatura de crecimiento, etc.

3.2.3.3. Biología Molecular.⁸

- a. Medición del alineamiento del ADN en pares de cepas
- b. Análisis de secuencia de ARN ribosomal (rARN) y ADN ribosomal (rADN)
- c. Análisis amplificado de ADN polimórfico (RAPD)

3.2.4. Reproducción de Levaduras y Características Morfológicas de Células Vegetativas.

En general, hay dos tipos de reproducción en levaduras:³

- Reproducción sexual, puede ser por formación de ascus con endosporas (ascosporas) o por formación de basidio con exosporas (basidiosporas); por ejemplo los Ascomicetos y Basidiomicetos.
- Reproducción vegetativa o asexual, este tipo de reproducción puede ser por gemación, segmentación (fisión) o por combinación de ambos.

Las formas de las levaduras están en relación con la manera de su reproducción vegetativa; gemación o segmentación.⁵ La **tabla No. 1** muestra las características morfológicas y tipos de reproducción de algunos géneros de levadura.⁷

TABLA No. 1
TIPOS DE REPRODUCCION Y MORFOLOGIA DE ALGUNOS GENEROS
DE LEVADURA

Tipo de reproducción	Morfología celular	Género
Segmentación	Elipsoidal	<i>Schizosaccharomyces</i>
Gemación multipolar	Toruliforme	<i>Saccharomyces, etc</i>
Gemación multipolar	Elipsoidal	<i>Saccharomyces, etc</i>
Gemación multipolar	Cilíndrico	<i>Saccharomyces, etc</i>
Gemación multipolar	Elipsoidal, ogival	<i>Dekkera, Brettanomyces</i>
Gemación multipolar	Triangular	<i>Trigonopsis</i>
Gemación multipolar	Toruliforme	<i>Criptococcus</i>
Gemación unipolar	Elipsoidal	<i>Pityrosporium</i>
Gemación polar	Forma de limón, apiculata	<i>Hanseniaspora, Kloeckera</i>
Formación de basidiospora	Elipsoidal	<i>Sporobolomyces</i>

Fuente: Kocková-Kratochvilová, A. 1982.

Generalmente, las levaduras presentan formas toruliformes, elipsoidales, ovoides y cilíndricos; sin embargo, en el momento de la identificación éstas características no son definitivas. Para la identificación en el laboratorio, los medios de cultivo comúnmente usados son: agar extracto de malta (MY), caldo extracto de malta, medio sintético de Wickerham (para observación morfológica).

Cuando las levaduras se desarrollan en un medio líquido como es en caldo extracto de malta, ellos producen precipitados, membranas, etc. Las características de las levaduras en el medio de cultivo tienen en algunos casos relación con la morfología y características fisiológicas.⁹ Las levaduras que forman membranas sobre las superficies del medio líquido parecen estar relacionados a la necesidad de oxígeno, por ejemplo algunas levaduras tales como *Pichia* y *Hansenula* cultivados bajo condiciones aeróbicas forman membranas, aunque ésta característica no es definitiva para la identificación, sin embargo es de importante ayuda.⁷

3.2.5. Características Fisiológicas.

La fermentación es el test usado como un indicador básico para identificar levaduras. Los otros tests comúnmente usados son: metabolismo de fuentes de carbono y nitrógeno, formación de pigmentos, producción de sustancias similares al almidón, etc.^{3,7}

Uno de los factores que afectan la fisiología de las levaduras es la temperatura, las levaduras de mayor interés son mesófilas como *Saccharomyces sp.*, el cual tiene un crecimiento ideal a temperaturas entre 20°C y 30°C. La temperatura juega un rol importante en la actividad enzimática y en el transporte de iones y solutos a través de la membrana celular. Otro factor fisiológico es el pH, cada especie puede crecer sólo en un medio con pH definido, las levaduras crecen en medio ácido, su pH ideal está entre 4.2 y 5.5, y en un medio con pH alcalino cerca de 7.5 se detiene su crecimiento. El pH del medio influencia como un proceso regulador, los iones H^+ y OH^- no pueden ser difundidos libremente a través de la membrana celular lo que implica utilizar un transporte activo.³

3.2.5.1. Fermentación

El metabolismo de fuentes de carbono es la más importante característica para la clasificación e identificación de levaduras así, 32 compuestos diferentes son principalmente usados en los tests, sin embargo los siguientes ocho compuestos son usados como indicadores básicos: D-glucosa, D-galactosa, sucrosa, maltosa, melobiosa, lactosa, rafinosa e inositol.^{7, 10} Después de los tests podemos utilizar las siguientes conclusiones:

- I. Levaduras que no fermentan glucosa no fermentan otros sacáridos
- II. Levaduras que fermentan glucosa, también fermentan fructosa y manitol

- III. La fermentación de sucrosa tiene relación con la invertasa o con la α -glucosidasa, y ello tiene correlación con la fermentación de rafinosa
- IV. La fermentación de la maltosa depende de α -glucosidasa, y ello está relacionado también con la fermentación de sucrosa, sin embargo la fermentación de maltosa no siempre coincide con la fermentación de otros compuestos carbonados que tienen un enlace α -glucósido tal como: trehalosa, melezitosa y α -metilglucósido
- V. Levaduras que fermentan lactosa no fermentan maltosa
- VI. Levaduras que fermentan lactosa, fermentan galactosa, pero no sucede lo inverso
- VII. Levaduras que fermentan melobiosa, fermentan galactosa y rafinosa.

3. 2.6. Clasificación de Levaduras.

Es posible considerar tres principales grupos de levaduras, los cuales son divididos en familias, subfamilias y géneros.⁴

I. Levaduras ascosporegenous

Dos familias:

1. Saccharomycetaceae; subfamilias:
Schizosaccharomycetoideae,
Saccharomycetoideae, Lipomycetoideae, Nadsonioideae.
2. Spermophthoraceae

II. Levaduras basidiosporogenous

Tres grupos:

1. Teliospora
2. Filobasidiaceae
3. Levaduras no clasificadas

III. Levaduras imperfectas

Dos familias:

1. Sporobolomycetaceae
2. Cryptococcaceae

3.2.7. Metabolismo de Azúcares por Levaduras.

Bajo condiciones de crecimiento estrictamente anaeróbicas, la fosforilación a nivel del sustrato en la glucólisis es la única fuente de ATP en *Saccharomyces cerevisiae* y posibilita un rendimiento neto de 2 ATP por cada molécula de glucosa convertida en dos moléculas de piruvato. La disimilación de glucosa a piruvato vía la glucólisis está unida a la reducción de NAD^+ en la reacción catalizada por la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa. Un balance redox cerrado en disimilación es logrado por descarboxilación de piruvato a acetaldehído, el cuál (NAD^+) subsecuentemente actúa como un aceptor de electrones para la reoxidación de NADH_2 .¹¹

El NADH_2 y el NADPH tienen diferentes funciones en la red metabólica de *Saccharomyces cerevisiae*. El NADPH es preferentemente usado en vías asimilatorias. La glucólisis juega un rol esencial en la disimilación de azúcar, pero también genera bloques constituyentes para la biosíntesis. Además, aunque muchas reacciones biosintéticas usan NADPH como un reductor, algunas reducciones unidas a NADH ocurren en la conversión de metabolitos centrales (piruvato, oxalacetato, acetil CoA) a monómeros celulares, por ejemplo en la biosíntesis de aminoácidos. Durante el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* sobre azúcar, la preferencia del NADH en reducciones disimilatorias (en la reducción de acetaldehído a etanol y la reducción del pool de quinona de la cadena respiratoria) es muy fuerte. En contraste a varias otras levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* no puede directamente conectar la oxidación de NADPH a la cadena respiratoria.¹¹ El metabolismo redox no puede ser visto como un proceso aislado, su regulación está cercanamente conectada con reacciones centrales y periféricas en el metabolismo de carbono y nitrógeno. Ello implica que el NADH_2 generado en estas reacciones es reoxidado y la ocurrencia de $\text{NADH}_2/\text{NAD}^+$ redox mitocondrial y citosólico no es solamente relevante durante el crecimiento en respiración aeróbica, sino también durante el crecimiento anaeróbico en fermentación.

En *Saccharomyces cerevisiae*, el mantenimiento de las condiciones de cultivo aeróbico no es suficiente para lograr metabolismo respiratorio de azúcar. Incluso cultivos totalmente aeróbicos exhiben un metabolismo mixto respiratorio-fermentativo, a menos que ellos sean desarrollados con un suplemento limitado de

azúcar a tasas bajas de crecimiento específico.^{12, 13} Este fenómeno de fermentación aeróbica (frecuentemente referido como efecto de la “glucosa” o “Crabtree”) es parcialmente debido a la represión de la síntesis de enzimas respiratorias por exceso de glucosa.^{14,15}

Durante el crecimiento respiratorio sobre azúcares, la reoxidación del NADH₂ formado en la glucólisis puede ocurrir vía respiración mitocondrial, de esta manera rinde ATP adicional vía fosforilación oxidativa. Además por otra parte, la reoxidación respiratoria de NADH₂ glucolítico implica que el piruvato no tiene que ser convertido en acetaldehído (aceptor de electrones), pero puede ser posteriormente oxidado. La oxidación de piruvato a acetyl coenzima-A, ocurre predominantemente vía el complejo mitocondrial piruvato-deshidrogenasa, y subsecuentemente el acetyl-CoA es oxidado a CO₂ y H₂O por las enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA).¹⁶ Los análisis cuantitativos de culturas respiratorias, han concluido que la eficiencia *in vivo* de este proceso en *Saccharomyces cerevisiae* es menor que en muchos otros microorganismos, esta baja estequiometría de fosforilación oxidativa está relacionado con la ausencia de un protón de translocación NADH deshidrogenasa en *Saccharomyces cerevisiae*, la disimilación respiratoria completa de glucosa rinde aproximadamente 16 ATP por molécula de glucosa (cuatro ATP desde la fosforilación a nivel del sustrato y cerca de 12 a partir de la fosforilación oxidativa). Esto es ocho veces mayor que el máximo de ATP rendido desde la disimilación de glucosa vía fermentación alcohólica. El rendimiento mayor en ATP en la disimilación respiratoria de azúcar es reflejado en el rendimiento de biomasa de cultivos con azúcar limitado, el

rendimiento típico de biomasa en cultivos respiratorios sobre glucosa es 0.5 g de biomasa por gramo de glucosa, mientras que el rendimiento de biomasa en cultivos anaeróbicos fermentativos es típicamente cinco veces menor.¹⁷ Bajo condiciones aeróbicas los azúcares como glucosa, fructosa, etc., son utilizados para producir etanol por la glucólisis. Las reacciones enzimáticas de esta vía formarán piruvato acoplado a la síntesis de ATP por fosforilación a nivel de sustrato. En la glucólisis ó vía de EMP, la glucosa es primero convertida mediante una serie de reacciones en fructosa 1,6-difosfato, el cual es utilizado para formar dos azúcares de tres carbonos. Luego estos azúcares entran a un set común de reacciones catabólicas para formar dos moléculas de piruvato. El rendimiento de un mol de glucosa en dos piruvatos libera suficiente energía libre para permitir la síntesis de cuatro ATP a partir de ADP y P_i . La conversión de glucosa está también acompañada por la formación de dos coenzimas reducidas ($NADH_2$). Finalmente la fuerza reductora de $NADH_2$, producido por la glucólisis debe ser transferido a un electrón aceptor para regenerar NAD^+ . En la fermentación alcohólica, no es el piruvato sino el acetaldehído su producto de descarboxilación que sirve como electrón aceptor terminal, así finalmente la reducción de acetaldehído genera etanol.¹⁸ La **figura No. 1** muestra el metabolismo de azúcar en *Saccharomyces cerevisiae*.

Gay-Lussac fué el primero en mostrar que la fermentación de la glucosa rinde aproximadamente pesos iguales de etanol y CO_2 (45 partes de glucosa rinden 23 partes de alcohol y 22 partes de CO_2). Pasteur encontró que 100 partes de sucrosa

rinden 105.4 partes de azúcar invertida, el cual fué fermentada a 51.1 partes de etanol, 49.4 partes de CO₂, 3.2 partes de glicerol y 1.7 partes de ácido succínico.

El rendimiento de etanol en fermentaciones de vinos no alcanza el valor teórico, el cual debe ser 51.1% por peso basado en glucosa fermentada. Este rendimiento se debe a la formación de sub-productos durante la fermentación alcohólica y a la asimilación de azúcar por la levadura, además de esto el rendimiento es afectado por diversas variables incluyendo la temperatura, pH, cantidad de inóculo y presencia ó ausencia de O₂, en la práctica 47.0 – 47.5 gramos de etanol son usualmente obtenidos por cada 100 gramos de azúcar fermentado.

3.2.8. Influencia de Etanol en el Metabolismo de Levaduras.

El etanol inhibe la viabilidad de las levaduras, la tasa específica de crecimiento y la tasa específica de fermentación; además de esto, la composición del medio, concentración de azúcar, pH y la temperatura afectan esta inhibición.²⁰ Hay algunas teorías acerca de la inhibición del crecimiento y fermentación relacionadas a la producción de etanol, se produce un decrecimiento del contenido de esteroides en la membrana celular y esto puede afectar el transporte de azúcares, las enzimas del metabolismo de azúcares son inhibidas por los productos que se sintetizan durante la fermentación, el etanol parece tener un efecto inhibitorio sobre la actividad de la hexoquinasa y consecuentemente sobre el funcionamiento de la glucólisis.^{21, 22, 23}

Hoy en día es asumido que la tolerancia al etanol depende de la habilidad de las células de levadura para exportar etanol al medio externo, un proceso que depende grandemente de la composición de la membrana celular y de la fluidez.²⁴ Además, la permeabilidad del etanol desde afuera hacia adentro de la célula es muy baja, lo cual explica el hecho de que el etanol adherido al medio es menos inhibitorio que el etanol producido por las células.²⁵

Los lípidos y esteroides de la membrana celular de levaduras son importantes por que ellos afectan el transporte de soluto y la tolerancia al etanol. Al preparar un inóculo bajo condiciones aeróbicas, incrementa el contenido de esteroides en la membrana celular y ayuda durante la fermentación anaeróbica reteniendo la

vitalidad celular, por esta razón ellos son conocidos como factores de sobrevivencia.²⁶

Muchos experimentos mostraron que la incorporación de ácido linoleíco, ergosterol u otro ácido graso insaturado y esterol en la membrana celular de la levadura, incrementa su permeabilidad al etanol, y permite una alta tasa de transporte de etanol hacia fuera de la célula. Cuando no se suplementa con ácidos grasos o esteroides al medio de cultivo, la célula podría sintetizarlos cuando hay disponible oxígeno en el medio, pero no en la total ausencia de él. Esta es la razón del mejoramiento a la tolerancia bajo condiciones micro-aeróbicas. En otro caso, cuando el etanol es adicionado en el medio se confirma que es menos inhibitorio que el etanol producido internamente por las mismas células.²⁷

Bajo condiciones anaeróbicas el contenido de esterol cae rápidamente y la actividad fermentativa se retrasa, por esta razón, en la elaboración de vinos es necesario una aereación intermitente de por lo menos de cinco minutos para inducir la síntesis de esteroides.

Ocasionalmente, durante la elaboración de sidra se puede también necesitar una aereación intermitente para animar el crecimiento de la levadura y así conducir sin duda a la formación de ergosterol.²⁸

El crecimiento en la presencia de etanol conlleva a la adaptación de la célula al etanol y a una elevada tolerancia al etanol, durante este proceso toma lugar cambios en la composición de ácidos grasos, fosfolípidos y esteroides de la membrana citoplasmática.

El etanol y el ácido acético son bien conocidos como inhibidores del crecimiento y son usados como agentes antimicrobianos. Por otro lado, estos compuestos son sub-productos o substratos de fermentación, así el ácido acético es un sub-producto de la producción de etanol e inhibe la fermentación a altas concentraciones, el mecanismo de su toxicidad envuelve la acidificación del citoplasma y modificación de ciertas enzimas de la glucólisis.²⁹

3.2.9. Influencia de Sulfito en el Metabolismo de Levaduras.

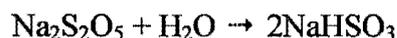
Biológicamente el SO_2 limita el desarrollo de bacterias acéticas y lácticas. También inhibe el crecimiento de algunas levaduras. Así, cuando el dióxido de azufre es adicionado al jugo de manzana hay un equilibrio entre tres formas del compuesto: SO_2 , HSO_3^- , y SO_3^{2-} , dependiente del pH del medio. El SO_2 molecular es responsable del efecto tóxico, el SO_2 ligado es la cantidad de éste unido a compuestos de la fermentación o del jugo de manzana. Las levaduras vineras también producen varios compuestos azufrados durante la fermentación, principalmente SO_2 y H_2S , el azufre puede ser derivado desde sulfato inorgánico del mosto, de aminoácidos conteniendo azufre o desde azufre elemental usado para polvorear el árbol de manzana durante la poda.

En el procesamiento de sidra la micro-flora natural puede ser controlada adicionando SO_2 en una concentración de 150 mg/L al jugo, se controla el valor de pH, se adiciona una adecuada cepa de levadura, se hace una exclusión de aire, y se cuida la completa fermentación de azúcares.^{30, 31} Los jugos no sulfitados

pueden causar fallas en la elaboración y no fermentar completamente a causa de la deficiencia en levaduras. Por otro lado, cuando los árboles de manzana no reciben tratamientos adecuados con fertilizantes, la fermentación podría cesar debido al bajo contenido de nutrientes en el jugo y eso no podría ayudar a una adecuada propagación de la población de levaduras.

La cantidad de SO₂ requerido para controlar la micro-flora indeseable depende del pH del jugo, así el SO₂ es adicionado en la forma de metabisulfito de sodio en las siguientes concentraciones: 75 mg/L a pH 3.0-3.3, 100 mg/L a pH 3.3-3.5, 150 mg/L a pH 3.5-3.8, 200 mg/L a pH >3.8.³²

Cuando el metabisulfito de sodio se disuelve en agua, se forma una solución de bisulfito de sodio según la siguiente ecuación:



El metabisulfito de sodio es un agente reductor moderadamente fuerte, cuando reacciona con un ácido libera SO₂ y al decrecer el pH, incrementa la liberación de éste. Además, otros compuestos son formados al unirse con óxidos, compuestos orgánicos insaturados, aldehídos y algunas cetonas.

Las levaduras difieren en su sensibilidad al tratamiento con SO₂ de jugos de fruta o de mostos de uva. Las levaduras *Brettanomyces sp.*, pueden resistir hasta 500 mg/L de SO₂ mientras que *Kloeckera apiculata* es menos resistente.³³ En general, muchas levaduras y bacterias son inhibidas por 100 mg/L ó inclusive menos cantidad de SO₂.^{32, 34}

3.3. SUB-PRODUCTOS PRODUCIDOS POR LEVADURAS DURANTE LA FERMENTACIÓN

3.3.1. Producción de Etanol por Levaduras.

Las fuentes preferidas de carbono de muchas especies de levaduras son las hexosas: glucosa, fructosa y manosa. Además, el azúcar como glucosa no es sólo usado como nutriente sino también es un factor principal para la regulación del crecimiento, metabolismo y desarrollo de la levadura. Es admitido que un mol de glucosa fermentada es convertida en dos moles de etanol y dos moles de CO₂, se puede decir que la producción de etanol es del orden del 51.1 % en peso del azúcar transformado, pero en la práctica bajo condiciones controladas, el mejor rendimiento no es mayor que 48.0 % y en procesos industriales el rendimiento es inclusive menor.^{35, 36} En Francia, para efectos de cálculo se admite que 17.0 g de azúcar fermentada por litro, produce 1% v/v de etanol.

La temperatura de fermentación juega un rol importante así, una temperatura baja permite obtener alto rendimiento de etanol, la fermentación es más completa y también minimiza la pérdida de etanol por evaporación, la temperatura también afecta la rapidez de la fermentación, la naturaleza y cantidad de compuestos secundarios formados.³⁷

La aereación es necesaria para la multiplicación de la levadura, ellas se multiplican hasta que el oxígeno disuelto en el medio sea consumido y después fermentan los azúcares presentes.³⁸ El mosto debe contener sustancias nutritivas

para las levaduras en suficiente cantidad, pero algunos mostos son pobres en estas substancias, en este caso es necesario suplementar con fosfato de amonio, el cual tiene que ser adicionado de preferencia antes del comienzo de la fermentación.³⁹

3.3.2. Rendimiento de la Fermentación Alcohólica.

Para calcular el rendimiento de producción de etanol es necesario conocer la cantidad de azúcares totales presentes en el mosto y el contenido de etanol producido por las levaduras durante la fermentación. La producción de etanol por levaduras es usualmente considerada ser 95% del rendimiento esperado de etanol, asumiendo que el 5% del azúcar restante es destinado al crecimiento celular y sub-productos. La acción de la levadura sobre el substrato está en proporción directa al contenido de nitrógeno presente en el mosto, en el mismo caso la acción de enzimas alcohólicas fermentativas (llamado zimasa) producido por levaduras es determinado al contenido de fosfato.⁴⁰

Las levaduras durante la fermentación segregan enzimas, entre ellas las más importantes son:

- La zimasa es un set de enzimas y coenzimas que transforman el azúcar del mosto en etanol y CO₂
- La sucrasa o invertasa hidroliza la sacarosa en glucosa y fructosa.

3.3.3. Síntesis de Ésteres por Levaduras.

La síntesis de ésteres volátiles alifáticos por levaduras es de gran interés industrial porque la presencia de éstos compuestos determina el aroma frutal de bebidas fermentadas. Los ésteres pertenecen a un grupo importante de compuestos de aroma y sabor en bebidas alcohólicas. La síntesis de ésteres requiere dos substratos; alcohol y ácido carboxílico.⁴¹ Los ésteres pueden ser formados por reacción química, pero la tasa de reacción es demasiado lenta. Por otro lado, los ésteres son formados vía un proceso intracelular catalizado por una aciltransferasa (EC 2.3.1). La reacción requiere energía proporcionada por el enlace tioéster del co-substrato de la acil-coenzima A (CoA). La más abundante acil-CoA es acetil-CoA, la cual puede ser formada por descarboxilación oxidativa de piruvato o por activación directa de acetato con ATP. La mayoría de acetil-CoA es formada por la descarboxilación oxidativa de piruvato, mientras que otra parte importante de acil-CoAs viene de la acilación de coenzima A libre (CoA-SH), catalizado por la acil-CoA sintasa (del metabolismo de ácidos grasos).⁴¹ Los diferentes mecanismos de la formación de ésteres en células de levaduras se muestran en la **figura No. 2**.

La represión de la síntesis de la enzima envuelta en la producción de ésteres, es una manera de regular la síntesis de ésteres y es llevado a cabo inhibiendo la actividad de la AATasa de levadura (alcohol acetiltransferasa) (EC 2.3.1.84) con trazas de oxígeno y/o ácidos grasos insaturados (UFAs).⁴² Esta enzima es una proteína unida a la membrana, es inestable a alta temperatura, y es fuertemente represada cuando la levadura es cultivada bajo condiciones aeróbicas ó por la

adición de ácidos grasos insaturados al medio de cultivo.^{43,44} Algunas especies de levaduras pueden sintetizar ésteres usando la reacción reversa de la esterasa en ausencia de acetil-CoA.⁴⁵ Las siguientes ecuaciones muestran las diferentes formas de síntesis de ésteres:

a) Síntesis química:

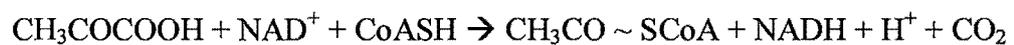


b) Síntesis bioquímica (reacción de la alcohol aciltransferasa)

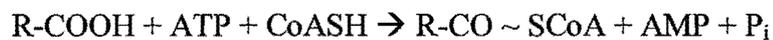


c) Activación del par acetil/acil:

- Reacción de la piruvato deshidrogenasa



- Reacción de las acil-CoA ligasas



- Reacción de la ácido graso sintasa

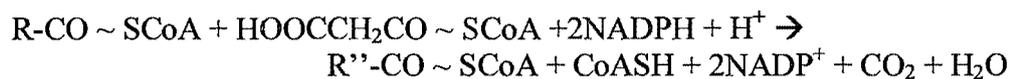
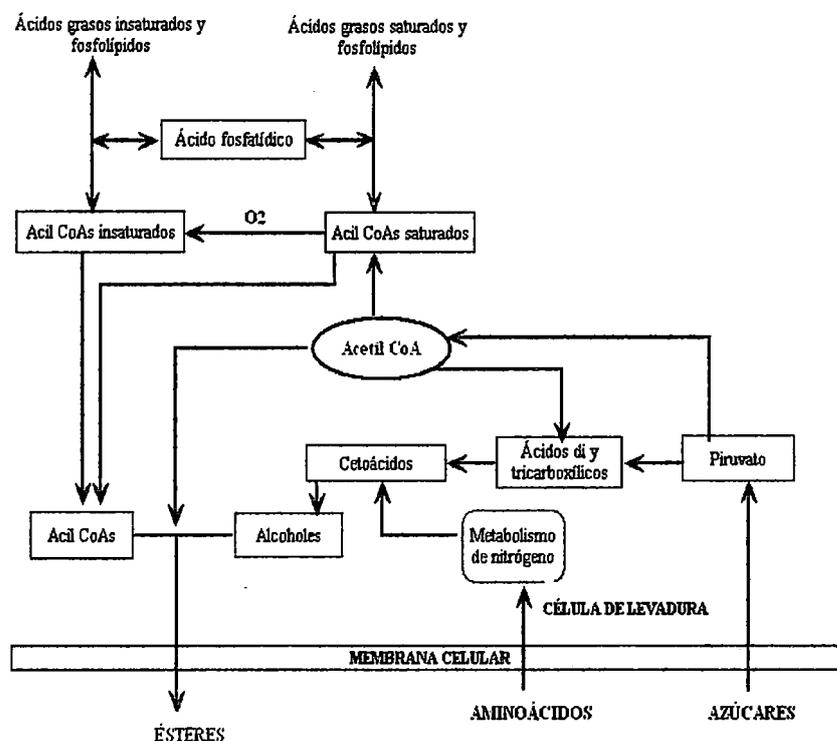


FIGURA No. 2
INTER-RELACION METABOLICA CONDUCIENDO A LA FORMACION
DE ESTERES EN LEVADURAS



Fuente: Malcorps, P. Y col. 1991; Yoshioka, H. y Hashimoto, N. 1981.

3.3.4. Síntesis de Alcoholes Superiores por Levaduras.

La producción de alcoholes superiores comienza cuando el nivel de azúcar sustancialmente disminuye y continúa por algunas horas hasta después del término de la fermentación alcohólica, esto sugiere un cambio del estatus

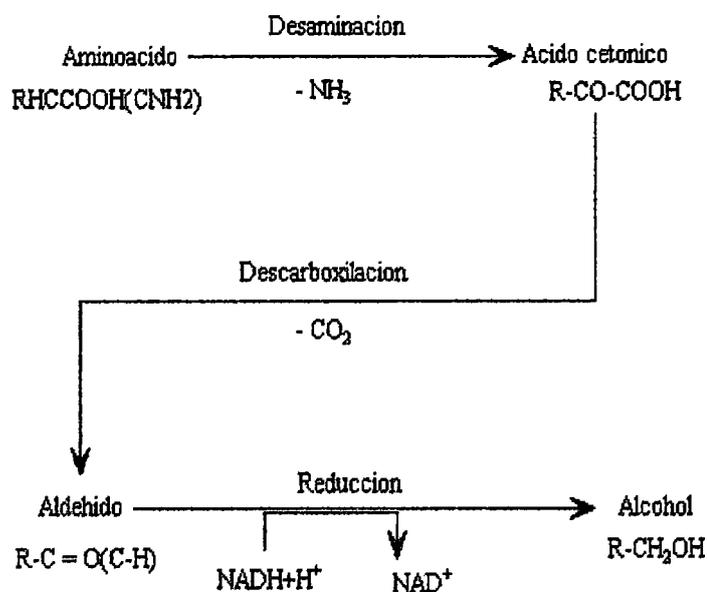
metabólico de la levadura, desde que la generación de estos productos es una consecuencia de la activación del metabolismo de los aminoácidos.^{46,47}

Entre los parámetros que influyen en la síntesis de alcoholes superiores están; la temperatura y el ratio C/N; un alto ratio C/N significa un bajo nivel de nitrógeno, lo cual podría provocar reacciones de desaminación de aminoácidos, conllevando a la síntesis de alcoholes superiores.⁴⁸ Durante la primera etapa de la fermentación el contenido de amonio y aminoácidos se reducen rápidamente, usualmente dentro de los primeros porcentajes de azúcares.

Los alcoholes superiores son formados durante la fermentación a partir de los correspondientes α -ceto ácidos, ellos pueden derivar catabólicamente del aminoácido correspondiente (valina, leucina, isoleucina, L-fenilalanina, etc) por desaminación a través de la vía de Ehrlich (**Figura No. 3**), o sintéticamente a partir de glucosa u otro precursor de carbohidratos como intermediario en la síntesis de aminoácidos. Una mayor conversión de azúcares durante la fermentación provee de una mayor concentración de alcoholes superiores en la sidra.⁴⁹

Ha sido demostrado que el 10% del total de alcoholes superiores es sintetizado a partir de los correspondientes aminoácidos, 65% a partir de otros aminoácidos y 25% a partir de azúcares.⁵⁰

FIGURA No. 3
FORMACION DE ALCOHOLES SUPERIORES A
PARTIR DE AMINOACIDOS (Reacción de Ehrlich)

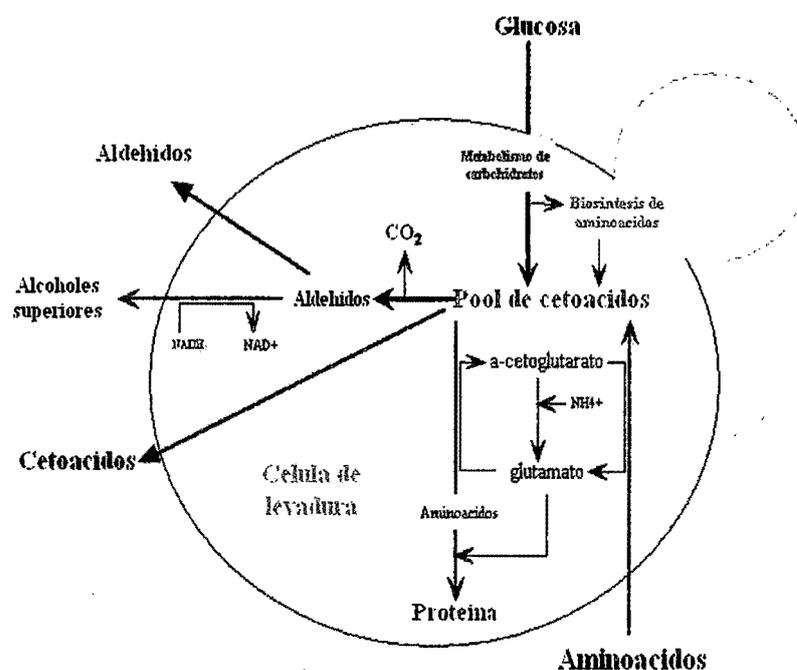


Fuente: Ouchi, K., y col. 1980; Leguerinel, I., y col. 1989.

El tratamiento tecnológico del mosto tiene una vital importancia en el contenido final de alcoholes superiores, por ejemplo la clarificación del mosto por medios de precipitación y remoción de sedimentos rinde vinos con menos contenido de alcoholes superiores que aquellos elaborados con mostos no-clarificados.⁵¹ La presencia de partículas insolubles en el jugo de manzana incrementa el contenido de alcoholes superiores y cualquier remoción de partículas insolubles reduce el contenido de alcoholes superiores en la sidra.⁵² Hay mucha referencia acerca de la importancia de las levaduras en la síntesis de alcoholes superiores, muchas de ellas están de acuerdo en que las cepas de levadura juegan un rol decisivo, y los

factores como la temperatura, contenido de fuente de nitrógeno y otros, influyen sobre las levaduras. Además, la aereación durante la fermentación incrementa el contenido de alcoholes superiores comparado con las condiciones anaeróbicas.⁵³ Finalmente, el sabor de la sidra depende principalmente de la variedad de manzana, mientras que el aroma de la sidra depende más de la tecnología de proceso y de la cepa de levadura utilizada.^{52, 54,55} La **figura No. 4** muestra el mecanismo del metabolismo de aminoácidos unido a la síntesis de alcoholes superiores.

FIGURA No. 4
METABOLISMO DE AMINOACIDOS UNIDO A LA SINTESIS DE
ALCOHOLES SUPERIORES EN LEVADURAS



Fuente: Ouchi, K., y col. 1980; Leguerinel, I., y col. 1989; Jiranek, V., y col. 1995.

3.3.5. Síntesis de Glicerol por Levaduras.

En *Saccharomyces cerevisiae*, el glicerol es un sub-producto de la fermentación de azúcar a etanol en un proceso redox neutral. El consumo de NADH_2 en la formación de glicerol es para mantener el balance redox citosólico, especialmente bajo condiciones anaeróbicas, compensando así las reacciones celulares que producen NADH_2 .⁵⁶ Además, glicerol-3-fosfato, el intermediario en la vía de formación de glicerol y es un metabolito clave para la síntesis de lípidos glicéricos.⁵⁷ En cultivo anaeróbico, el balance redox dicta que el incremento de la tasa específica de producción de glicerol sea balanceada con la conversión incrementada de glucosa en más metabolitos oxidados (piruvato, acetofina, 2,3-butanodiol, succinato, acetaldehído o acetato, los últimos dos metabolitos en combinación con CO_2).⁵⁸ En adición, el glicerol juega un rol esencial como un soluto compatible durante la osmoregulación en levaduras, así en respuesta a la disminución de actividad de agua extracelular, *Saccharomyces cerevisiae* incrementa grandemente su tasa de formación de glicerol.⁵⁹ Más aún, el glicerol puede ser utilizado como una sola fuente de carbono bajo condiciones aeróbicas.⁶⁰ En las vinerías, el sulfito es usualmente utilizado para controlar la microflora indeseada de levaduras y la adición de sulfito a cultivos de levaduras anaeróbicas de fermentación, conlleva a la formación extensiva de glicerol, el sulfito inmediatamente forma un aducto con acetaldehído, así de este modo previniéndolo de actuar como un aceptor de electrones para la reoxidación de

NADH₂ glucolítico; este fenómeno fuerza a la célula a formar glicerol como una alternativa de compensación redox.⁶¹

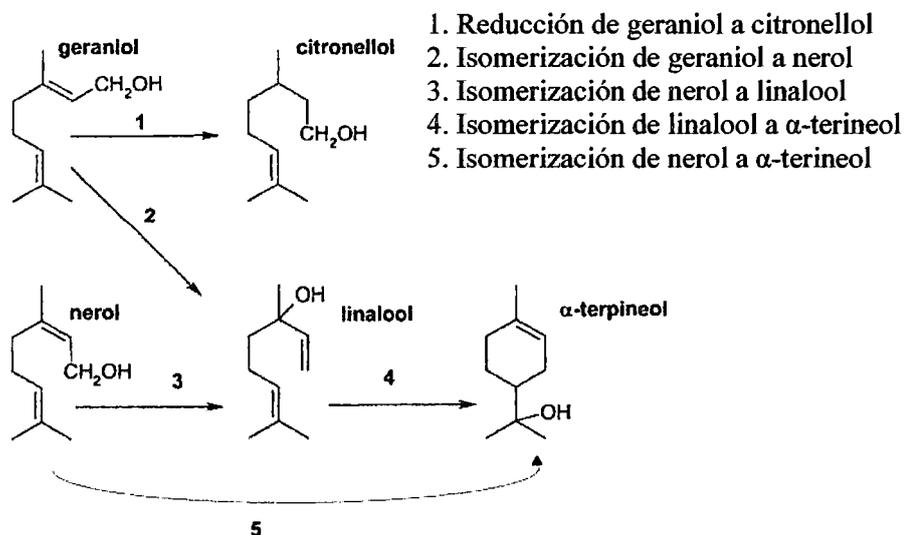
Bajo condiciones aeróbicas, la producción de glicerol no es necesaria, por que la reoxidación de NADH₂ citosólico puede ser acoplado a la cadena respiratoria mitocondrial. Bajo condiciones aeróbicas totales, un metabolismo mixto respiro-fermentativo se observa cuando la concentración de azúcar en el medio de crecimiento excede el valor umbral (típicamente cerca a 1mM).⁶² Esto atrae mucha atención porque el glicerol puede ser producido en altas cantidades por fermentación con levaduras osmóticas bajo condiciones aeróbicas.⁶³

3.3.6. Formación de Terpenoides por Levaduras.

Los terpenoides son producidos por plantas superiores, en uvas y otras frutas los terpenoides existen tanto en forma libre como la forma ligada glucosídicamente; los principales terpenoides presentes son: linalool, nerol, geraniol, α -terpineol y citronelol. Los terpenoides ligados pueden ser liberados por la actividad de la glucosidasa de levaduras durante el proceso de vinificación.⁶⁴ La **figura No. 5** muestra la secuencia de reacciones que suceden en la formación de terpenoides.

FIGURA No. 5

REACCIONES DE BIOTRANSFORMACION DE
MONOTERPENOS EN *Saccharomyces cerevisiae*



Fuente: King, A., y Dickinson, R. 2000.

3.4. ELABORACIÓN DE SIDRA

En la elaboración de sidra del mismo modo como en vinicultura, la selección de la variedad, administración de nutrientes y pesticidas a las plantas, suelo, ecología, clima y estación afectan el producto final. Los productores artesanales de sidra después de seleccionar las manzanas dulces, amargas, ácidas y aromáticas las mezclan para obtener la sidra.⁶⁶

La fermentación de sidra es esencialmente un caso especial de la elaboración de vino, así nos encontramos con un amplio campo de conocimiento y pocos datos

acerca de sus especificaciones. La fermentación de la sidra es muy baja en contenido de nitrógeno comparado a los vinos y cerveza. Por otra parte el contenido de calcio y la pectina juegan un rol importante posteriormente en la clarificación de la sidra. Las sidras son usualmente fermentadas a temperaturas bajas. Las levaduras salvajes son usadas en ciertas partes del mundo, pero son: 1) cepas no específicas que habitan el mosto de manzana y 2) no son reproducibles en otras regiones geográficas distintas. Todavía estas levaduras salvajes constituyen un campo activo de experimentación. Las cepas comerciales vineras pueden ser usadas, pero hay que tener especial consideración en sus requerimientos nutricionales.^{67,68}

Los más grandes objetivos y complicaciones de la fermentación de sidra tienen que ver con el azúcar residual, bajo contenido de alcohol, y la estabilidad durante el almacenamiento. Muchas técnicas se intentaron aplicar para conseguir esto, incluyendo el control de nutrientes, temperatura y una completa pasteurización de las botellas.⁶⁷

3.4.1. Manzanas para Elaboración de Sidra.

Las manzanas para la elaboración de sidra son distintas de las variedades de manzanas comunes. Las variedades de manzana para elaborar sidra tienen jugos con características especiales que desarrollan sólo con la fermentación. Las manzanas no maduras de un árbol son frecuentemente impalatables ó incluso no comestibles, a causa del contenido de tanino en el jugo, la acidez y su sabor

astringente; sin embargo el contenido adecuado de tanino es uno de los elementos clave que dan a la sidra su característica de sabor y olor.⁶⁹ La elaboración de sidra en algunos casos utiliza jugos obtenidos de una mezcla de variedades de manzana sidreras, combinando los niveles deseados de Brix, acidez, taninos y compuestos químicos del sabor y aroma único de cada variedad, para un producto de alta calidad. Algunas variedades pueden ser usadas para producir una variedad de sidra, si el jugo es tal que contiene un balance natural de los elementos necesarios para una exitosa fermentación y un buen sabor y aroma distintivo.^{69, 70}

El mayor ácido orgánico presente en manzanas es L(-)-ácido málico, aunque los ácidos shiquímico, quínico, clorogénico y *p*-coumarilquínico están también comúnmente presentes. El jugo también contiene pectina soluble (polímeros de ácido galaturónico esterificados con metanol).^{71, 72} Los taninos y ácidos fenólicos también están presentes en el jugo de manzana, estos compuestos fenólicos son la fracción que sufre oxidación en frutas dañadas.⁷³

El contenido promedio de azúcares en el jugo de manzana es: fructosa 74%, sucrosa 15%, y glucosa 11%. No hay casi otros azúcares presentes así que en sidras totalmente fermentadas hay muy poca gravedad residual.⁷⁴

3.4.2. Características de las Manzanas Sidreras.

Una distintiva característica de una manzana sidrera es el relativamente alto contenido de polifenoles, generalmente conocido como tanino. Los polifenoles

contribuyen mayormente al aroma, color y también tiene propiedades antimicrobiales débiles.^{75, 76}

La calidad de la cosecha de la fruta da generalmente sabores y aromas más complejos e interesantes a la sidra que las frutas a granel. Sin embargo, si se utiliza variedades de manzanas seleccionadas se obtienen generalmente más bajos rendimientos y por otra parte las plantas son más difíciles de crecer.^{70, 77, 78}

Las manzanas sidreras son seleccionadas únicamente para este propósito y tienen muchas ventajas para el sidrero, entre ellos están:⁷¹

- Potencialmente altos niveles de azúcar (sobre 15% w/w que no es común)
- Un rango de acidez de 0.1 - 1.0%
- Una estructura fibrosa que hace fácil el prensado y la obtención de un rendimiento de jugo más alto.
- La habilidad de madurar por varias semanas en almacenamiento sin pérdida de textura mientras el almidón se convierte en azúcar.

Es raro hacer sidra utilizando una sola variedad de manzana sidrera. Esto es en parte porque el balance de azúcar, ácido y tanino requerido para un exitoso producto es difícil de lograr utilizando cualquier variedad sola, y así una mezcla para lograr el balance apropiado es casi siempre necesario.⁷⁹ Una mezcla ideal de variedades para elaboración de sidra sería aquella cuyo jugo contiene aproximadamente de 0.5% a 0.7 %w/w de ácido málico, de 0.15 a 0.2 %w/w de tanino, un contenido de azúcar tan alto como sea posible, por ejemplo algunos jugos muestran arriba de 12% de azúcar. Los concentrados de jugo de manzana son ahora ampliamente usados en algunos países para elaborar sidra.⁸⁰

El estado óptimo de madurez afecta grandemente la calidad de la sidra e incluso simplifica el proceso de fermentación. Las manzanas verdes no maduras contienen una gran cantidad de almidón lo cual es perjudicial para una satisfactoria fermentación, también las manzanas negras son muy perjudiciales para la calidad de la sidra y aquellas muy negras dan jugos que luego de la molienda crean riesgos de acetificación.⁸¹ Es posible hacer sidra de manzanas sobre maduras o de manzanas parcialmente podridas, pero la cantidad y calidad del jugo es menor que el obtenido de manzanas en óptima condición, en segundo lugar la sidra es desabrida, fermenta rápidamente, es defectuosa de aroma, sabor, y cuerpo y también es difícil de mantener la calidad. Las manzanas están en buena condición para la molienda cuando están suficientemente maduras y cuando fácilmente se introduce el dedo en la fruta.^{70, 82}

3.4.3. Fermentación de Sidra.

La sidra elaborada por el método tradicional consta de las siguientes etapas: presión lenta, clarificación y fermentación espontánea. La manufactura de sidra requiere periodos de cinco semanas o más no sólo para la producción de etanol, sino también para la maduración de sabor y características de aroma, en parte debido a una fermentación secundaria por bacterias ácido-lácticas. Durante la fermentación prolongada la levadura está sujeta a anaerobiosis, incrementa la

concentración de etanol y demás productos inhibitorios del crecimiento (2-feniletanol, 1-propanol, 2-butanol).⁸³

El jugo de manzana no necesita ningún pre-tratamiento excepto la adición de dióxido de azufre en concentraciones de 100 mg/L, 150 mg/L y 200 mg/L según el pH del jugo de manzana para controlar la microflora indeseable.⁸⁴ El contenido de pectina varía ampliamente, su presencia en sidras está usualmente relacionada con el grado de madurez de la manzana, la tecnología pre-fermentativa y la acción de microorganismos durante la biotransformación de la fruta.⁸⁵

El etanol es el mayor componente volátil de las bebidas alcohólicas. En sidras, ello da cuerpo, reduce la acidez aparente, incrementa el dulzor y tiene un efecto de suavidad sobre otras características de aroma y sabor.⁸⁶ El glicerol es un producto secundario de la fermentación alcohólica y contribuye a la suavidad y redondez.

Los ácidos carboxílicos son constituyentes importantes del jugo de manzana (ácidos málico, quínico y shiquímico) y ácidos de la sidra (ácido láctico, acético y succínico) y dan la acidez total. La concentración de ácidos determina el pH y afecta el aroma y sabor de la sidra y su susceptibilidad a daños microbianos. El ácido málico es el principal ácido en las manzanas y es convertido en ácido láctico por fermentación maloláctica, es el mayor ácido en la sidra. Tradicionalmente, la fermentación de jugo de manzana se lleva a cabo por la flora indígena, y la formación de ácido acético por levaduras apiculatas durante el estado inicial de la fermentación es predominante.⁸⁷ Los componentes volátiles como alcoholes superiores están compuestos de alcoholes alifáticos y aromáticos (1-propanol, isobutanol, alcohol isoamílico y alcohol amílico activo, y 2-feniletanol). La

producción de alcoholes superiores esta influenciada por la composición del medio, la técnica pre-fermentativa de clarificación, y el proceso de fermentación (temperatura, aereación, cepa de levadura). 2-feniletanol está asociado con aroma floral y fragante, mientras que alcohol isoamílico y amílico activo contribuyen a definir el aroma complejo de bebidas fermentadas, si están presentes en cantidades moderadas.⁸⁸ Los altos niveles de 1-propanol son formados por cepas incapaces de producir H₂S y ello influencia positivamente en la evaluación sensorial y a las características de la espuma.^{89, 90} Por otro lado, la presencia de 1-butanol es una característica varietal, este alcohol es un compuesto primario del aroma de manzanas y su contenido decrece durante la fermentación del mosto, así su concentración no depende de la tecnología del proceso, más bien depende de la variedad y del grado de madurez.⁹¹ El metanol no es un producto de la fermentación de levaduras, sino es formado a partir de la pectina, aunque no es relevante en el sabor y aroma de la sidra, sin embargo tiene una influencia negativa sobre las características de la espuma.⁹⁰ En otro caso la concentración de etil acetato esta relacionado al proceso de elaboración de sidra, el uso ocasional de enzimas pectolíticas en la elaboración de sidra reduce la concentración de ésteres, especialmente de acetatos.⁹² Durante la primera etapa de la fermentación la concentración de ácido succínico incrementa rápidamente debido a que se metabolizan los azúcares, ácido málico y aminoácidos.

3.4.4. Azúcares y Tasa de Fermentación.

Los azúcares fermentables del jugo de manzana son la fructosa y glucosa. La relación de fructosa/glucosa varía grandemente dependiendo del grado de madurez. Casi todas las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* son glucolíticas, pudiendo fermentar la glucosa a una tasa ligeramente más rápida que la fructosa. Muchas de las especies osmotolerantes de levaduras son fructofilicas, la adición de sucrosa a un jugo de alta acidez y bajo contenido de azúcar simplemente incrementa la concentración de fructosa y glucosa a causa de la rápida conversión del disacárido por la invertasa de la levadura. La tasa de fermentación se incrementa con la temperatura de fermentación y afecta el rendimiento de etanol, sub-productos de la fermentación, y el aroma de la bebida fermentada.

La fermentación alcanza su máximo valor cuando el crecimiento de la levadura es máximo, la temperatura y la concentración inicial de nitrógeno disponible juega un importante rol así, la tasa de producción de etanol es la más alta. En este estado la acumulación de etanol inhibe la captación de aminoácidos y amonio, por tanto decrece la tasa de conversión de azúcar en etanol y CO₂.

Algunas frutas contienen bajas concentraciones de nitrógeno como nutriente y en consecuencia resulta en cantidades menores de biomasa durante la fermentación, menos azúcar es convertido en material celular y por tanto habrá más azúcar disponible para su conversión en etanol.

3.4.5. Levaduras en la Elaboración de Sidra.

Las levaduras para la elaboración de sidra deben tener las siguientes características: habilidad para fermentar completamente, una rápida tasa de fermentación, buena sedimentación al final de la fermentación, tolerancia al sulfito y al etanol, un modelo predecible de formación de alcoholes superiores, baja formación de H₂S, sulfuros orgánicos y diacetil, estabilidad contra la mutación, producción de ácidos orgánicos, un grado limitado de autólisis y un conocido efecto sobre bacterias malolácticas.^{85, 90}

Una flora variada de levaduras se encuentra en la superficie de manzanas y se vuelve más compleja cuando incrementa la maduración, la presencia de árboles alrededor, arbustos y vegetación, las especies comunes encontrados son *Saccharomyces sp.*, *Hanseniaspora sp.*, *Hansenula s.p.*, *Kloeckera sp.*, *Saccharomycodes sp.*, *Torulopsis sp.*, *Brettanomyces sp.*, etc.^{93, 94, 95}

La fermentación espontánea se realiza por una sucesión de diferentes poblaciones de levaduras, durante la primera etapa de la fermentación las levaduras apiculatas que son especies de baja producción de etanol (*Kloeckera sp.*, *Hanseniaspora sp.*) son predominantes, en el curso del proceso de fermentación, ellos son remplazados por especies tolerantes al etanol como *Saccharomyces cerevisiae*.⁹⁶

Ahora es sabido que especies como *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata*, *Saccharomycodes ludwigii* sobreviven durante la fermentación a niveles significantes por periodos largos y de esta forma las levaduras *non-Saccharomyces* contribuyen a la composición analítica del vino.⁹⁷

La persistencia de especies de levaduras *no-Saccharomyces* depende de diferentes factores (densidad inicial de células, temperatura, pH, SO₂ y concentración de etanol) y están comúnmente limitadas a la primera etapa del proceso, aunque ciertas especies pueden sobrevivir en un nivel significativo durante el proceso completo de fermentación de vino.^{98,99} Al contrario las especies *no-Saccharomyces* tales como *Saccharomyces ludwigii*, *Brettanomyces intermedius* son usualmente considerados responsables del daño de vinos. Así los roles de las levaduras *no-Saccharomyces* en determinar las propiedades organolépticas del producto final es estrictamente dependiente de la cepa y de la prolongación de su crecimiento.¹⁰⁰

3.4.6. Elaboración de Sidra.

La tradicional elaboración de sidra comienza con la selección, lavado y aplastado de las manzanas. En plantas modernas las manzanas se transforman en pulpa en un molino hecho de acero inoxidable, la pulpa de manzana obtenida es conocido como pomasa. Luego la pulpa es exprimida para extraer el jugo, esto se realiza en una prensa. La pomasa es presionada hasta que se extraiga la mayor cantidad de jugo. En plantas modernas se utilizan prensas de platos operados mecano-hidráulicamente.^{95,101}

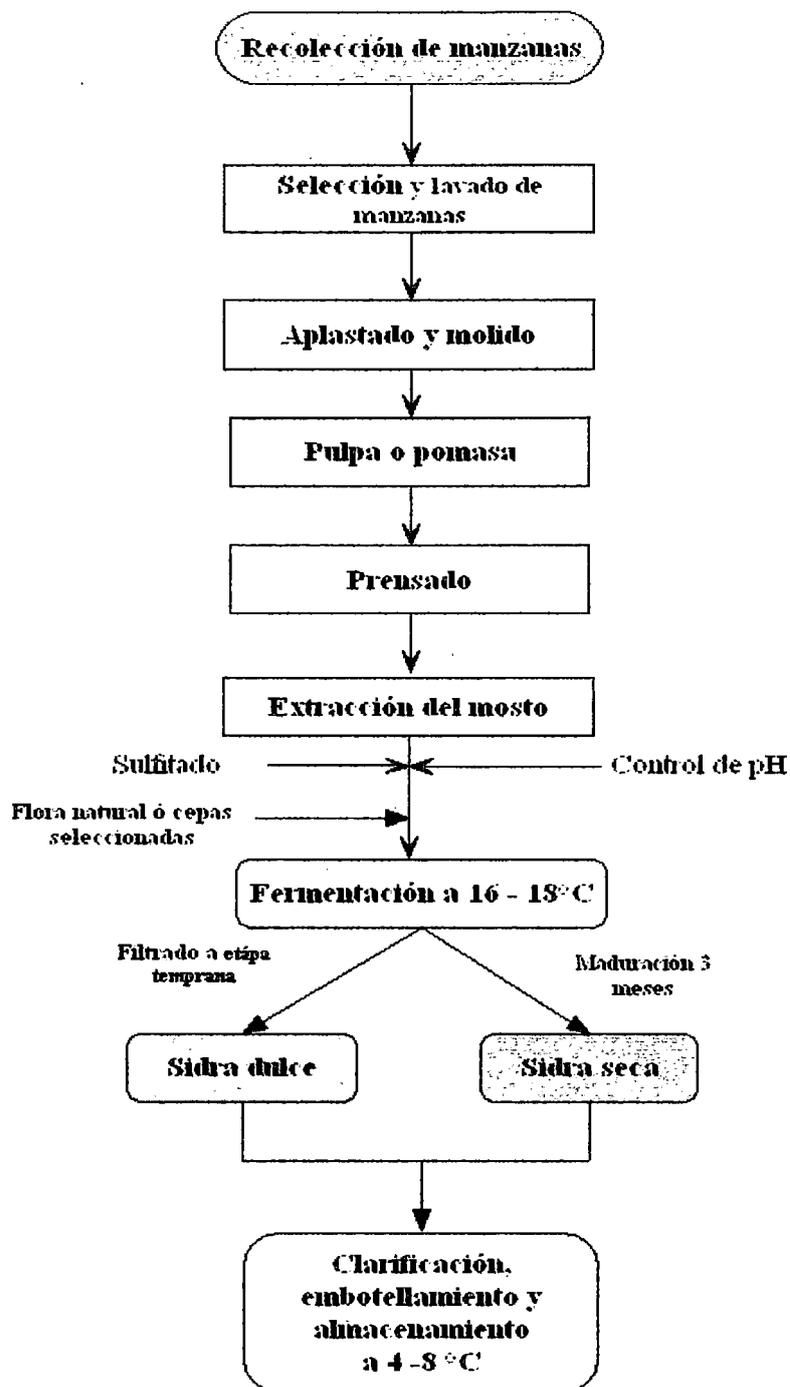
El jugo fresco prensado puede ser fermentado en seguida. En algunas sidrerías el jugo es concentrado y almacenado para una posterior elaboración de sidra, en tal caso se pasteuriza y se le da un tratamiento para remover la pectina. El jugo fresco

de manzana puede ser fermentado de dos maneras. Una manera tradicional, donde el jugo se coloca en una cuba de madera ó en barriles pequeños de madera, el tapón del barril es removido. No se adiciona levaduras así que el proceso de elaboración de sidra se realiza con levaduras salvajes. La fermentación comienza en uno ó dos días y continúa por algunas semanas, durante este tiempo el barril es rellenado con más sidra. Cuando termina la fermentación, el tapón es colocado y la sidra se deja madurar durante cinco ó seis meses.¹⁰¹

En el segundo método, el jugo se trata con dióxido de azufre para inhibir las levaduras salvajes naturales y después se pone a fermentar adicionando cultivos puros de levaduras, este método es usado en grandes sidrerías. Después que la fermentación inicial decrece, la sidra es dejada para que las levaduras poco a poco se precipiten, y posteriormente se centrifuga y se coloca en tanques de almacenamiento. El almacenamiento puede llevar de 12 – 18 meses, posteriormente la sidra puede mezclarse con otras sidras nuevas o maduras para moderar cualquier cambio excesivo, así de esta manera se mantiene un perfil de aroma y sabor consistente año tras año. El diagrama de flujo (**Figura No. 6**), explica en detalle el proceso común de elaboración de sidra.^{95, 101, 102}

FIGURA No. 6

FLUJOGRAMA DE ELABORACION DE SIDRA



Fuente: Correnty, P. 1999; Beech, F. W. 1972a; Vogel, W. 1998.

3.4.7. Prácticas Comunes en la Elaboración de Sidra.

3.4.7.1. Amelioración

La amelioración es la adición de agua ó azúcar ó una combinación de ambos al jugo de manzana antes, durante ó después de la fermentación. Estos insumos son adicionados para reducir la acidez del mosto de manzana, uva o de otra fruta. La captalización es la adición de azúcar o jugo con el propósito de desarrollar alcohol.¹⁰³ Sin embargo, cualquier azúcar usado en captalización es considerado amelioración. El uso de captalización y amelioración es más que todo en mostos de manzana ó uva cuyos árboles crecen en zonas de temperaturas frías y estaciones cortas de crecimiento, o en zonas donde la fruta tiene un alto contenido de acidez y bajo contenido de azúcar, los cuales son usados para producir sidra o vino.

Controlar el contenido de azúcar en jugo de manzana es necesario para mantener el contenido adecuado de etanol. El contenido de azúcar puede ser controlado adicionando agua, azúcar, jugo concentrado ó jugo de otra variedad que contenga menos o más azúcar. La acidez de los mostos con un pH mayor a 3.8 pueden ser incrementados combinándolos con mostos de alta acidez ó adicionando ácido DL-málico o ácido cítrico.⁹⁵

3.4.7.2. Deficiencia de nitrógeno

En algunos casos una fermentación truncada o perezosa puede ser causada por niveles insuficientes de nitrógeno asimilable en el medio de cultivo (Ver apéndice, **tabla No. 20**) para compuestos nitrogenados en el jugo de manzana).^{104,105} El contenido de nitrógeno en el jugo de manzana depende de la variedad, región de cultivo, maduración y del proceso de elaboración de sidra.¹⁰⁶ Está determinado que un mínimo de 120 – 140 mg N/L es necesario para producir una tasa de fermentación normal. Además, la utilización de nitrógeno es también influenciado por la presencia de aire y por la concentración inicial de glucosa.¹⁰⁶ Un bajo nivel inicial de nitrógeno actúa limitando la tasa de crecimiento y formación de biomasa de levaduras, resultando en una baja tasa de catabolismo de azúcar.^{105, 107, 108}

3.5. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POR CROMATOGRFÍA

La cromatografía es una técnica de separación donde las moléculas componentes (solutos) en una muestra son transportados en una fase móvil sobre una fase estacionaria. La fase móvil puede ser un gas o un líquido (sistema solvente) y la fase estacionaria puede ser una capa líquida sobre la superficie de un material inerte o una superficie sólida.¹⁰⁹ El soluto, la fase móvil y la fase estacionaria forman un sistema ternario. La interacción ocurre entre el soluto y la fase estacionaria de modo que el soluto es distribuido entre la fase estacionaria y la

fase móvil. La atracción del soluto por la fase estacionaria resulta en un retraso de este movimiento a través del sistema cromatográfico. Los diferentes componentes (solutos) se moverán a diferentes tasas desde que cada uno tendrá una diferente y leve afinidad para la fase estacionaria con respecto a la fase móvil.^{110, 111}

3.5.1. Análisis por Cromatografía de Gas.

Diversos métodos de extracción-concentración han sido usados para el análisis de compuestos volátiles de menor cantidad en vinos, tales como extracción líquido-líquido, extracción simultánea y destilación, micro-extracción en fase sólida (SPME), etc.^{112, 113, 114}

El análisis usando la extracción con un solvente adecuado y acoplado a una detección por ionización de flama (FID) es un método muy bueno para determinar los compuestos volátiles en pequeñas concentraciones en muestras.¹¹⁵

Durante el análisis, el equipo usado puede emitir diferentes respuestas que varían día a día. El mejor procedimiento es calibrar frecuentemente, examinar cada curva de calibración para cada componente cuidadosamente, y asegurar que las cantidades de analitos permanezcan dentro de los rangos calibrados más exactos. En ningún caso el analista debe intentar extrapolar los datos de calibración más allá de los niveles mínimos y máximos medidos, por que las calibraciones de multiniveles sólo trabajan dentro de sus respectivos límites.

3.5.2. Detector de Ionización de Flama (FID).

El detector de ionización de flama (FID) es uno de los detectores más ampliamente usados y generalmente aplicables a cromatografía de gas y además es usado para análisis de rutina y de propósitos generales, es fácil de usar y destructivo de la muestra. Los detectores FID son normalmente calentados independientemente del horno cromatográfico. El calentamiento es necesario para prevenir la condensación de agua generado por la flama y así prevenir cualquier demora de los solutos cuando ellos pasan de la columna a la flama.

Aunque la respuesta emitida por el detector de ionización de flama es generalmente proporcional a la masa de carbono presente en una muestra otros átomos diferentes y varios grupos funcionales afectan la respuesta del detector.

3.5.2.1. Linearidad del detector: curva de calibración

Para un análisis cromatográfico preciso, es mejor operar dentro del rango lineal del detector. Esto es donde el rango del área del pico es directamente proporcional a la cantidad de soluto (al duplicar la cantidad de soluto se duplica el área del pico). Esto nos permite usar una curva de calibración de multi-puntos para la cuantificación de muestras desconocidas. Los detectores son no-lineales sobre una cantidad específica de soluto, y algunos son también no-lineales debajo de una cantidad particular de soluto.

El rango lineal del detector tiene que ser determinado experimentalmente ya que es frecuentemente dependiente del soluto y de las condiciones de operación como la temperatura, flujo de gas.¹¹⁶ Un método es plotear la cantidad de soluto versus el área del pico del soluto/ área del pico del estándar interno, ambos a la misma concentración. Se obtiene una línea recta cuando la respuesta es lineal, y una desviación de más de 5% es considerado estar fuera del rango lineal del detector para dicho soluto.

3.5.2.2. Factores de respuesta del detector

El detector no es igualmente sensible a los diferentes compuestos, cada área de un pico tiene que ser multiplicado por un factor adecuado llamado factor de respuesta para corregir esta diferencia.

Los detectores producen una señal de salida en respuesta a la concentración de un analito pasando a través de él, sin embargo diferentes analitos pueden producir variación de señales para el mismo nivel de concentración. Así la señal observada se necesita corregir para determinar exactamente la cantidad de analitos en una mezcla. La cantidad total de un componente en una muestra esta dado por el área total integrada del pico, producida cuando la banda de analitos pasa a través del detector. Para obtener los ratios correctos para cada equipo de GC y detector, deben obtenerse las señales diferentes de respuestas para un detector dado respecto a cada uno de los compuestos siendo analizados.^{117, 118} El área de pico

corregido está dado por el ratio de área del cromatograma ajustado para la respuesta del detector.

$$A_{\text{CORR}} = A_{\text{CHROM}}/D_{\text{RF}} \quad (1)$$

Los factores de respuesta del detector (D_{RF}) necesitan ser determinados exactamente para un buen análisis cuantitativo reproducible. Ellos pueden ser convenientemente obtenidos por el método de volumen constante, esto es aproximadamente diez volúmenes repetidos de una muestra conteniendo una cantidad igual de los analitos que son inyectados y luego determinado el promedio.

Los valores D_{RF} son calculados normalizando cada área de pico (A_x) respecto a aquel pico que será usado como referencia (A_{REF}).

$$D_{\text{RFx}} = A_x/A_{\text{REF}} \quad (2)$$

3.5.3. Análisis Cuantitativo por Cromatografía de Gas.

El método más simple para identificar un pico cromatográfico en una muestra es comparar su tiempo de retención con aquél de una muestra auténtica del compuesto sospechado. Los detectores cromatográficos tienen diferentes respuestas para cada compuesto. Para determinar cantidades cuantitativas de varios compuestos en una mezcla de separación, la respuesta del detector tiene que ser calibrado usando estándares. Las soluciones estándares conteniendo los

analitos son inyectados al equipo de GC y las respuestas del detector son grabadas y guardadas. La comparación de las áreas de los picos de los estándares con aquellos de las muestras permiten la cuantificación de los analitos.^{111, 119}

3.5.3.1. Cuantificación de compuestos por GC usando estándares

Hay diversos métodos para la cuantificación de compuestos por GC, tales como el método del estándar externo, el método de adición de un estándar, el método de la normalización de las áreas de los picos, etc. El mejor método para el análisis cuantitativo cromatográfico envuelve la preparación de una serie de soluciones estándares que aproximan la composición de la muestra desconocida. Los cromatogramas de los estándares son obtenidos, y las áreas de picos son ploteados en función de la concentración. Un diagrama de los datos debe dar una línea recta que pasa a través del origen y los análisis de las muestras desconocidas son basados en este diagrama. Frecuentemente es necesario hacer una re-estandarización para una mayor exactitud.

La fuente más importante de error en el análisis por el método basado en la calibración de estándares es usualmente la incertidumbre en el volumen de la muestra que se inyecta en el equipo, ocasionalmente, la tasa de inyección es también un factor. Las muestras son ordinariamente pequeñas (= 1 μL), y las incertidumbres asociadas con la inyección de un volumen reproducible de este tamaño con una micro jeringa puede ascender a diversos porcentajes relativos.

3.5.3.2. Método del estándar interno

La mayor precisión para el análisis cuantitativo cromatográfico se obtiene usando estándares internos ya que las incertidumbres introducidas por la inyección de la muestra son evitados aquí. En este procedimiento, una cuidadosa cantidad medida del estándar interno (IS.) es introducido en cada estándar y muestra, y el ratio del área del pico de un analito al área del pico del estándar es el parámetro analítico.¹²⁰ Para que este método sea exitoso, es necesario que el pico del estándar interno esté bien separado de los picos de los otros componentes en la muestra.

Un estándar interno se selecciona teniendo en cuenta que su tiempo de retención sea eludido en un lugar adecuado en el cromatograma y no interfiera con otras sustancias. El procedimiento comprende el análisis de una muestra de ensayo conteniendo cantidades conocidas de cada componente más una cantidad predeterminada del estándar interno.^{111, 121} El área de un pico es proporcional a la cantidad de ese componente eludido, multiplicado por el factor de respuesta del detector (D_{RF}):

$$\text{Para un componente individual: } X: A_X = D_{RF_X} \cdot C_X \quad (3)$$

$$\text{Para el estándar interno: } IS: A_{IS} = D_{RF,IS} \cdot C_{IS} \quad (4)$$

Donde: C_X y C_{IS} son las cantidades del componente X y del estándar interno IS. El factor de respuesta relativa de un componente (D_{RF_X}) al estándar interno es como sigue:

$$D_{RF'x} = (D_{RFx} / D_{RF, IS}) = (A_x / C_x) / (A_{IS} / C_{IS}) \\ = (A_x / A_{IS}) \cdot (C_{IS} / C_x) \quad (5)$$

Los factores de respuesta para todos los componentes son calculados de la misma manera. El análisis de una mezcla desconocida se logra adicionando una cantidad exacta conocida de estándar interno para luego llevar a cabo el análisis. Ahora, la concentración de cada componente (C_x) es calculado usando la ecuación anterior pero re-arreglado de la siguiente manera:

$$C_x = (A_x / A_{IS}) \cdot (C_{IS} / D_{RF'x}) \quad (6)$$

Donde: A_{IS} y C_{IS} son el área y la concentración en mg/L del estándar interno adicionado a la muestra, A_x es el área del compuesto requerido y $D_{RF'x}$ es el factor de respuesta relativa para este compuesto.

3.5.4. Cromatografía Líquida.

La cromatografía líquida (CL) es una técnica cromatográfica analítica que es útil para separar iones o moléculas que están disueltos en un solvente. Si la solución de la muestra está en contacto con una segunda fase sólida o líquida, los solutos diferentes interactuarán con la otra fase para diferenciar grados debido a diferencias en adsorción, intercambio iónico, particionamiento o tamaño.¹⁰⁹ Estas diferencias permiten a la mezcla de componentes ser separados uno de cada otro

usando estas diferencias para determinar el tiempo de tránsito de los solutos a través de una columna.

3.5.4.1. Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

La cromatografía líquida de alta performance (HPLC) es una forma de cromatografía líquida que se usa para separar compuestos que están disueltos en una solución. Los instrumentos de HPLC consisten de un reservorio de la fase móvil, una bomba, un inyector, una columna de separación y un detector. Los compuestos son separados al inyectar la muestra en la columna. Los diferentes compuestos de la muestra pasan a través de la columna a diferentes tasas de velocidad debido a las diferencias en sus características de particionamiento entre la fase móvil líquida y la fase estacionaria.¹²²

3.5.4.2. Detector de índice de refracción (RID)

El detector de índice de refracción (RID) es un detector basado en el cambio de índice de refracción de la fase móvil debido a la presencia de una sustancia. El principio de detección envuelve la medición del cambio en índice refractivo del efluente en la columna pasando a través de la celda de flujo. Mientras mayor sea la diferencia de índice de refracción entre la muestra y la fase móvil, el imbalance

será más grande así, la sensibilidad será mayor para una mayor diferencia en índice refractivo entre la muestra y la fase móvil.

3.5.4.3. Análisis cuantitativo por HPLC

La cuantificación de compuestos por HPLC consiste en determinar la concentración desconocida de un compuesto en una solución conocida. Se inyecta una serie de concentraciones conocidas de la solución estándar en el equipo de HPLC para su detección. El cromatograma de estas concentraciones conocidas dará una serie de picos que correlacionarán con la concentración del compuesto inyectado.^{109, 122}

Las áreas obtenidas y las concentraciones conocidas de cada compuesto sirven para diagramar una curva de calibración. Esto se hace graficando el área del pico versus la concentración de la solución de muestra conocida. Las curvas de calibración pueden hacerse usando un software de computadora tal como Excell.

En este software puede escogerse la mejor línea para ser la curva de calibración, y la ecuación de esta línea puede ser determinada. La ecuación de la línea obtenida por los datos es la ecuación de la curva de calibración, la cual será usada para determinar la concentración de cualquier compuesto en la muestra.

3.5.4.4. Cuantificación de compuestos por HPLC usando estándares

El método más fácil para análisis cromatográfico cuantitativo envuelve la preparación de una serie de soluciones estándares que aproximan la composición de la muestra desconocida. Los cromatogramas de los estándares son obtenidos y las áreas son ploteadas en función de la concentración. El plotear los datos dará una línea recta que pasará por el origen, los análisis de cuantificación se basan en este diagrama.

a) Método del Estándar Externo

De igual modo como en cromatografía de gas hay métodos tales como el método del estándar externo usado en la cuantificación de compuestos por HPLC. El método del estándar externo es un procedimiento de calibración que no adiciona un estándar interno a las muestras, los sistemas de inyección automática de muestras en HPLC tienen buena reproducibilidad así que pueden realizarse una serie de inyecciones con una variación en volumen de muestra de $< 1\%$. Un set de una mezcla de estándares conteniendo concentraciones conocidas de los analitos se analiza y se obtienen sus áreas de los picos correspondientes. Una curva de calibración puede ser dibujada para cada analito a partir del área de los picos versus la concentración de cada sustancia inyectada, se puede confirmar la linealidad de las respuestas del detector y también se puede determinar la cantidad de analito en una mezcla.¹²¹

$$A_{\text{STANDARD}} = C_{\text{STANDARD}} (\text{mg/L}) \quad (7)$$

La muestra es analizada y la concentración de los componentes se calcula usando los datos de las áreas de los picos obtenidos y las concentraciones de cada sustancia en la mezcla estándar. El factor de respuesta (D_{RFx}); está definido para este método de estándar externo como el área del pico de X, dividido por la concentración de X. Si la curva de calibración pasa por el origen, el factor de respuesta es la pendiente de la curva de calibración. Las concentraciones de X en diferentes muestras se obtienen dividiendo el área del pico por el factor de respuesta.

$$D_{\text{RFx}} = A_{\text{ESTANDAR}} / C_{\text{ESTANDAR}} \quad (8)$$

$$\text{Cantidad}_x (\text{mg/L}) = A_{\text{MIX}} / D_{\text{RFx}} \quad (9)$$

Donde: $A_{\text{Estándar}}$ y $C_{\text{Estándar}}$ son el área y la concentración de los estándares cuya concentración es casi la esperada a esa en la muestra, A_{MIX} es el área del pico del compuesto obtenido en el análisis de la muestra.

La curva de calibración para el método del estándar externo se forma ploteando el área de los picos en el eje "Y" versus la concentración de la muestra en el eje "X", usando una serie de muestras estándares de conocida concentración (a volúmenes iguales de inyección). La curva de calibración es una representación gráfica de la relación entre el área de los picos y la cantidad de un analito inyectado.¹¹⁶ La ecuación lineal $Y = mX + b$, de estos puntos son usados para calcular la concentración de analitos requeridos en la muestra.

CAPITULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

A. Lugar de ejecución

Los ensayos y los análisis del presente trabajo de investigación se realizaron en los siguientes ambientes:

- Laboratorio de Microbiología de a Facultad de Ingeniería Pesquera y de Alimentos de la Universidad Nacional del Callao, ubicado en la Av. Gamarra N° 720, Chucuito – La Punta, Callao.

Ensayos realizados:

- ✧ Mantenimiento de cepas de levaduras
- ✧ Fermentaciones de diferentes fuentes de carbono
- ✧ Tolerancia al etanol por levaduras a condiciones anaerobias
- ✧ Tolerancia al sulfito por levaduras a condiciones anaerobias

- Laboratorio de Microbiología y Análisis químico del Centro de Experimentación Tecnológico CET de la Universidad Nacional del Callao, ubicado en la ciudad Universitaria.

Ensayos realizados:

- ✧ Fermentaciones de diferentes fuentes de carbono

- ✧ Tolerancia al etanol por levaduras a condiciones anaerobias
- ✧ Tolerancia al sulfito por levaduras a condiciones anaerobias

- Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Biología, ubicado en la ciudad Universitaria de la UNMSM, Av. Venezuela s/n.

Ensayos realizados:

- ✧ Características morfológicas de levaduras (siembra en placa)
- ✧ Producción de etanol por levaduras en medio sintético
- ✧ Tolerancia al etanol por levaduras a condiciones anaerobias
- ✧ Tolerancia al sulfito por levaduras a condiciones anaerobias

- Laboratorio de Biotecnología y Bioingeniería, Análisis Instrumental del Instituto de Fermentación Química y Bioingeniería – Facultad de Tecnología Alimentaria – Universidad de Tecnología Química en Praga.

Ensayos realizados:

- ✧ Características morfológicas de levaduras (microscopia)
- ✧ Producción aeróbica y anaeróbica de etanol por levaduras en jugo de manzana a 16°C y 28°C
- ✧ Tolerancia al etanol por levaduras a condiciones aerobias
- ✧ Tolerancia al sulfito por levaduras a condiciones aerobias
- ✧ Determinación de sub – productos del metabolismo de levaduras por HPLC y GC

B. Materia Prima e Insumos.

En los ensayos preliminares de fisiología y metabolismo se utilizaron medios de cultivo sintéticos preparados en cada laboratorio, luego se utilizó un concentrado de jugo de manzana comercial, exento de aromas varietales, el concentrado fué obtenido de una mezcla de variedades de manzanas, entre ellas: Selena, Topaz, Bohemia, Rubin, etc., para realizar los ensayos se tuvo que reconstituir el concentrado a los parámetros normales encontrados en el jugo de manzana natural. Se utilizaron para los ensayos de fermentación las siguientes cepas de levadura: *Saccharomyces cerevisiae*, var. *ellipsoideus* RIVE 15-1-416, *Candida stellata* RIVE 3-16-1, *Hansenula anomala* RIVE 7-1-5, *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1, *Saccharomyces ludwigii* RIVE 16-1-5 y *Brettanomyces intermedius* RIVE 2-2-2, adquiridos del Instituto de Investigación para Enología y Vinicultura de Bratislava- República Eslovaca.

C. Equipos y Materiales.

Los equipos y materiales utilizados están especificados en la descripción metodológica para cada ensayo realizado y se citan a continuación.

4.1. Estudio de la Morfología, Fisiología y Metabolismo de Levaduras

4.1.1. Cepas de Levadura Ensayadas.

Seis cepas de levadura pertenecientes a seis géneros se adquirieron de la colección de levaduras del Instituto de Investigación para Vinicultura y Enología de Bratislava – República Eslovaca, y fueron las siguientes:

1. *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* RIVE 15-1-416
2. *Brettanomyces intermedius* RIVE 2-2-2
3. *Candida stellata* RIVE 3-16-1
4. *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1
5. *Hansenula anomala* RIVE 7-1-5
6. *Saccharomyces ludwigii* RIVE 16-1-5

4.1.2. Mantenimiento de las Cepas de Levadura.

Las cepas de levadura se mantuvieron en tubos de ensayo conteniendo agar a una temperatura de 7 °C y con renovación periódica de seis meses usando como medio sólido agar extracto de malta.

4.1.2.1. Composición del medio sólido para el mantenimiento de cepas de levadura

- Extracto de malta 30.0 g/L
- Peptona bacteriológica (Oxoid LTD.) 3.0 g/L
- Agar-agar (Roht LTD.) 15.0 g/L

4.1.3. Ensayos para Determinar la Morfología de Levaduras.

Los ensayos se llevaron a cabo usando Placas Petri y como medio agar sintético de Wickerham para levaduras.¹²³ El pH del medio fué ajustado a 4.5, el tiempo de incubación fué de dos días a 28 °C para observar visualmente la apariencia de las colonias. El medio usado para la observación morfológica de las células individuales fué el medio líquido sintético de Wickerham.¹²³ El pH fué ajustado a 4.5, el cultivo fué anaeróbico por cuatro días a la temperatura de 28 °C., la observación de las células individuales fué realizado usando un microscopio OLYMPUS BX 51 equipado de una cámara OLYMPUS Z 300, ambos de fabricación Japonesa.

4.1.3.1. Composición del medio de cultivo

Medio sintético de Wickerham.¹²³ (todos los reactivos fueron para análisis químicos).

Minerales:	µg	Aminoácidos:	mg
H ₃ BO ₃	500	Histidina	10
CuSO ₄ . 5H ₂ O	40	Metionina	20
KI	100	Triptófano	20
FeCl ₃ . 6H ₂ O	200	Sales:	g
MnSO ₄ . H ₂ O	400	KH ₂ PO ₄	1
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	200	MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.5
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	400	NaCl	0.1
Vitaminas:	µg	CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.1
Biotina	2	Fuente de carbono:	g
Ca-pantotenato	400	Glucosa	10

Vitaminas:	µg	Fuente de nitrógeno:	g
Ácido fólico	2	(NH ₄) ₂ SO ₄	3.5
Inositol	2000	Asparagina	1.5
Niacína	400	Otros:	
<i>p</i> -ácido aminobenzoico	200	Agar	18 g
Piridoxina	400	Agua destilada	1000 ml
Riboflavina	200		
Tiamina	400		

4.1.4. Ensayos de Fisiología en Levaduras.

Los ensayos de fermentación de azúcar fueron llevados a cabo usando tubos de ensayo con tubos Durham, bajo condiciones anaeróbicas a 28 °C, durante cuatro días, el medio utilizado fué caldo Sabouraud, glucosa 2.0 % (fuente de carbono 2.0 %).¹²³ El pH fué ajustado a 4.5 y después de la fermentación fué verificada la presencia de azúcares reductores usando el reactivo de Benedict. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

4.1.4.1. Composición del medio de cultivo

Caldo Sabouraud, glucosa 2.0 %:

- Fuente de carbono 2.0 %
- Peptona (Oxoid LTD.) 1.0 %
- Extracto de levadura (Oxoid LTD.) 0.5 %.

4.2. Ensayos de Producción de Etanol por Levaduras

4.2.1. Medio de Cultivo y Fermentación.

Los ensayos de producción de etanol por levaduras fueron llevados a cabo bajo condiciones anaeróbicas usando frascos Erlenmeyer de 1 L conteniendo 0,5 L de medio sintético estéril, a 28 °C; las fermentaciones concluyeron cuando la producción de CO₂ cesó completamente (aproximadamente entre 15 – 19 días). El medio de cultivo propuesto fué preparado tomando como referencia la composición básica del jugo de manzana y un medio de cultivo adecuado para levaduras, el pH fué ajustado a 3.8.^{124, 125}

4.2.2. Preparación de Inóculo.

El inóculo fué cultivado aeróbicamente sobre el mismo medio estéril correspondiente, a la temperatura de 28 °C, durante 48 horas, los frascos fueron agitados a 200 min⁻¹. El volumen del inóculo utilizado fué de 14.0 % v/v del volumen total de caldo de fermentación y finalmente la determinación de etanol producido por cada cepa de levadura fué realizado por el método picnométrico después de la destilación.

4.2.3. Composición del Medio de Cultivo.

(Todos los reactivos fueron para análisis químico)

Sales:	g/l	Fuente de carbono:	g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	12.0	Glucosa	40.0
KH ₂ PO ₄	0.75	Fructosa	70.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.8	Sucrosa	40.0
CaCl ₂	0.09	Vitaminas:	mg/l
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.0 mg/l	Biotina	0.005
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.006	Ácido pantoténico	1.0
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.008	Ácido fólico	0.5
Fuente de nitrógeno:	g/l	Inositol	10.0
Extracto de levadura	1.0	Niacina	6.0
Ácido orgánico:	g/l	Tiamina	0.5
Ácido málico	2.0	Rivoflavina	1.0

4.3. Producción de Etanol por Levaduras en Jugo de Manzana

4.3.1. Medio de Cultivo.

Los ensayos de producción de etanol por levaduras fueron llevados a cabo usando jugo de manzana concentrado y aroma removido, el concentrado fué reconstituido con agua destilada hasta obtener una gravedad específica de 1.060 g/L, 12.8 %w/w de azúcares totales y el pH fué ajustado a 3.8.⁹⁵ El medio de cultivo fué esterilizado antes de los ensayos de fermentación.

4.3.2. Condiciones de Fermentación.

Las fermentaciones fueron llevadas a cabo en condiciones anaeróbicas y aeróbicas usando frascos Erlenmeyers de 1 L conteniendo 0.5 L de medio de cultivo estéril, los ensayos se realizaron a 16 °C y 28 °C; las fermentaciones anaeróbicas concluyeron cuando la producción de CO₂ cesó completamente, los tiempo de fermentación a condiciones anaeróbicas (aprox. de 15 – 19 días), sirvieron como referencia para considerar los tiempos de fermentación a condiciones aeróbicas.

4.3.3. Preparación de Inóculo.

El inóculo fué cultivado en el mismo medio de cultivo estéril a 28 °C, durante 48 horas, los frascos Erlenmeyer fueron agitados a 200 min⁻¹. El volumen de inóculo utilizado fué de 14.0 % v/v del volumen total de caldo de fermentación y finalmente la determinación de etanol producido por cada cepa de levadura fué realizado por el método picnométrico después de destilación.

4.4. Ensayos de la Influencia de Etanol en Levaduras

4.4.1. Tolerancia al Etanol por Levaduras a Condiciones Anaeróbicas.

Los ensayos de tolerancia al etanol por levaduras bajo condiciones anaeróbicas fueron llevados a cabo por triplicado usando tubos de ensayo y tubos Durham para observar la producción de CO₂ bajo diferentes concentraciones de etanol, las cepas de levadura fueron ensayadas sobre un medio sintético estéril, a 28 °C, durante 72 horas, el pH del medio fué ajustado a 4.5.¹²⁶ La cantidad de etanol adicionado a cada tubo de ensayo fué: 2.0 % v/v, 4.0 % v/v, 6.0 % v/v, 8.0 % v/v, 10.0 % v/v y 12.0 % v/v.

4.4.2. Tolerancia al Etanol por Levaduras a Condiciones Aeróbicas.

Los ensayos bajo condiciones aeróbicas se realizaron en frascos Erlenmeyers de 0.5 L conteniendo 2.0 L de medio sintético estéril, a 28 °C, el pH del medio fué ajustado a 4.5.¹²⁶ Los frascos Erlenmeyer fueron agitados a 200 min⁻¹ y el tiempo de crecimiento fué dejado hasta observar el desarrollo de la fase logarítmica. La cantidad de etanol adicionado fué: 2.0 % v/v, 4.0 % v/v, 6.0 % v/v, 8.0 % v/v y 10.0 % v/v, todos los ensayos se realizaron por triplicado, el crecimiento aeróbico

fué medido por densidad óptica a 620 nm, usando un espectrofotómetro SPEKOL 11, Carl Zeiss-Jena, de fabricación Alemana.

4.4.3. Composición del Medio de Cultivo.¹²⁶

- Glucosa 50.0 g/L
- KH_2PO_4 - puro 5.0 g/L
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - puro 0.4 g/L
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - puro 2.0 g/L
- Extracto de levadura (Oxoid LTD.) 1.0 g/L.

4.5. Ensayos de la Influencia de Sulfito en Levaduras

4.5.1. Tolerancia al Sulfito a Condiciones Anaeróbicas.

Los ensayos de tolerancia al sulfito por levaduras en condiciones anaeróbicas se realizó por triplicado usando tubos de ensayo y tubos Durham para observar la producción de CO_2 bajo diferentes concentraciones de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Las cepas de levadura se cultivaron sobre medio sintético estéril, a 28 °C, durante 72 horas, el pH del medio fué ajustado a 4,5.⁹⁹ Se adicionó $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ a los tubos según su pH: Al medio de cultivo con pH 3.3, le fué adicionado 100 mg/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, al medio con pH 3.65, le fué adicionado 150 mg/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, y al medio con pH 4.24, le fué adicionado 200 mg/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$.⁹⁵

4.5.2. Tolerancia al Sulfito a Condiciones Aeróbicas.

Los ensayos a condiciones aeróbicas se realizaron en frascos Erlenmeyer de 0,5 L conteniendo 0,2 L de medio sintético estéril, a 28 °C, el pH del medio fué ajustado a 4.5.¹²⁶ Los frascos Erlenmeyer fueron agitados a 200 min⁻¹. Se adicionó Na₂S₂O₅ a cada frasco Erlenmeyer según su pH: Al medio de cultivo con pH 3.3, le fué adicionado 100 mg/L Na₂S₂O₅, al medio con pH 3.65, le fué adicionado 150 mg/L Na₂S₂O₅, y al medio con pH 4.24, le fué adicionado 200 mg/L Na₂S₂O₅.⁹⁵ El tiempo de crecimiento concluyó cuando se observó el desarrollo de la fase logarítmica y finalmente el crecimiento fué medido por densidad óptica a 620 nm, usando un espectrofotómetro SPEKOL 11, Carl Zeiss-Jena, de fabricación Alemana.

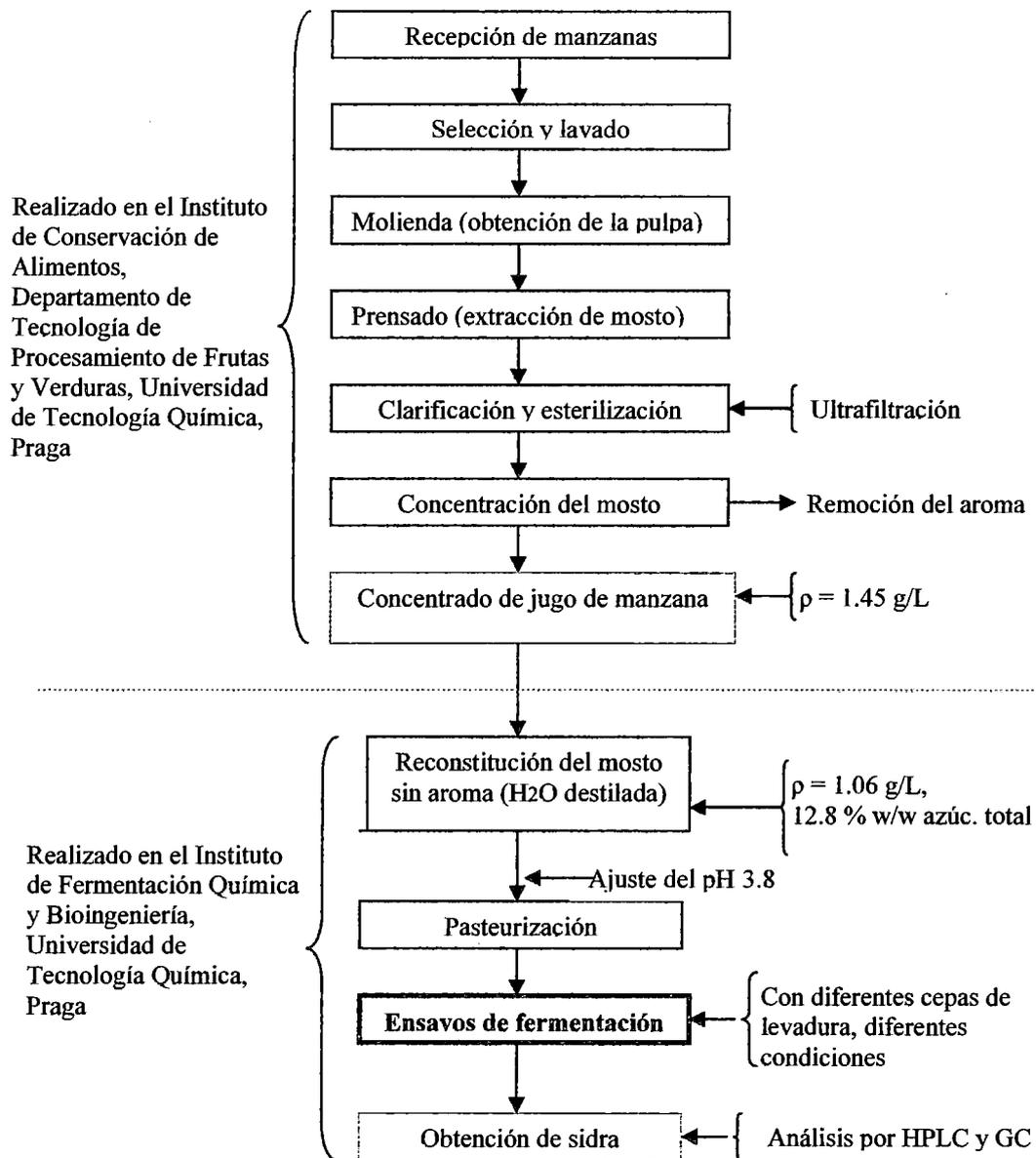
4.5.3. Composición del Medio de Cultivo.¹²⁶

- Glucosa 50.0 g/L
- MgSO₄.7H₂O – puro 0.4 g/L
- Extracto de levadura (Oxoid LTD.) 1.0 g/L
- KH₂PO₄ – puro 5.0 g/L
- (NH₄)₂SO₄ - puro 2.0 g/L.

4.6. Elaboración de Sidra y Determinación de Sub-productos Producidos por Levaduras Durante la Fermentación

Los ensayos de producción de sidra se realizó de acuerdo la figura No 7, se determinó la producción de metabolitos producidos por las cepas de levadura durante la etapa de fermentación, lo que significó la parte más importante de mi trabajo de investigación.

FIGURA No. 7
FLUJOGRAMA DEL PROCESO DE ELABORACION DE SIDRA Y DE LOS
ENSAYOS DE FERMENTACION



4.6.1. Cepas de Levadura Ensayadas.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i>	RIVE V 15-1-416	Sc 416*
<i>Brettanomyces intermedius</i>	RIVE 2-2-2	Bi 2-2-2*
<i>Candida stellata</i>	RIVE 3-16-1	Cs 3-16-1*
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	RIVE 16-1-5	Sl 16-1-5*
<i>Hansenula anomala</i>	RIVE 7-1-5	Ha 7-1-5*
<i>Kloeckera apiculata</i>	RIVE 9-2-1	Ka 9-2-1*

*Estas abreviaciones se usaron para identificar las cepas de levadura

4.6.2. Medio de Cultivo y Fermentación.

El jugo de manzana concentrado, clarificado y aroma removido fué reconstituido con agua destilada hasta obtener una gravedad específica de 1.060 g/L; 12.8 %w/w de azúcares totales y pH 3.8.⁹⁵ Las fermentaciones se realizaron a condiciones aeróbicas y anaeróbicas a 28 °C en frascos Erlenmeyer de 0.5 L conteniendo 250 ml de jugo de manzana estéril. Los frascos Erlenmeyer para los ensayos a condiciones aeróbicas se agitaron a 200 min⁻¹.

4.6.3. Preparación de Inóculo.

Las cepas de levadura fueron pre-cultivadas en frascos Erlenmeyer de 0.2 L conteniendo 100 ml de jugo de manzana estéril a condiciones aeróbicas durante 24 horas a 28 °C, los frascos fueron agitados a 200 min⁻¹, después el medio

crecido fué centrifugado durante 10 min a 4000 min^{-1} en una centrifuga SELECTA, Medifriger-BL, de fabricación Española. Seguidamente, el jugo de manzana para fermentación fué inoculado con aproximadamente 1.0 g de peso húmedo de levaduras alcanzado durante el pre-cultivo.

4.6.4. Condiciones de Fermentación.

1. Las fermentaciones con culturas puras (*Sc*, *Sl*, *Cs*, *Ha*, *Ka*) se realizaron a condiciones aeróbicas a $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$, Los frascos Erlenmeyer fueron agitados durante ocho días a 200 min^{-1} . Las fermentaciones anaeróbicas se realizaron sin agitación durante 15 días a $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
2. Las fermentaciones con culturas mixtas se realizaron de la siguiente manera: (*Sc/Cs*, *Sc/Ka*, *Sc/Bi*, *Sc/Cs/Ha/Sl/Ka/Bi*) a condiciones aeróbicas a $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$, los frascos Erlenmeyer fueron agitados durante ocho días a 200 min^{-1} . Las fermentaciones anaeróbicas se realizaron sin agitación durante 15 días a $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$, el ratio de inóculo para cada cepa fué de 1:1 de concentración celular inicial.
3. Las fermentaciones con culturas secuenciales se realizaron adicionando *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 al jugo de manzana previamente fermentado con cepas no-*Saccharomyces* (*Cs*, *Ka*), durante ocho días a $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (tanto para condiciones aeróbicas y anaeróbicas), el jugo fermentado

fué centrifugado para luego servir como medio para la segunda fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* que duró ocho días más a condiciones aeróbicas y siete días más a condiciones anaeróbicas, los frascos Erlenmeyer para los ensayos a condiciones aeróbicas fueron agitados a 200 min^{-1} .

4.7. Análisis de Compuestos por Cromatografía Líquida (HPLC) y Cromatografía de Gas (GC)

4.7.1. Cromatografía de Gas.

Para analizar y cuantificar compuestos por GC es necesario primeramente preparar series de compuestos estándares a diferentes diluciones, los cuales tienen que ser de concentraciones conocidas. Al inyectar cantidades muy pequeñas de estas mezclas de solución de estándares en el equipo, el analista obtendrá cromatogramas con áreas de picos para cada compuesto según la concentración de cada compuesto presente en cada mezcla de estándares. Estos datos servirán para obtener curvas de calibración específicas para cada sustancia, los cuales serán útiles para determinar la linealidad del detector del cromatógrafo de gas y para calcular la concentración de un compuesto desconocido en una muestra.

4.7.1.1. Preparación de curvas de calibración

Cantidades de aproximadamente 1.0 g de cada analito (**Tabla No. 2**) y del estándar interno (1-hexanol), se pesaron en una fiola de 50 ml y luego se le adicionó diclorometano hasta completar los 50 ml, así se preparó la solución madre de estándares. Seguidamente, de ésta solución madre se pipetearon volúmenes exactos de 0.5 ml, 1.0 ml, 2.0 ml, 4 ml, 8.0 ml y 16.0 ml para preparar diluciones sucesivas con diclorometano en fiolas de 25 ml. De éstas diluciones, se tomaron volúmenes exactos de 1 μ L con una jeringa para ser inyectadas directamente al cromatógrafo de gas (Hewlett-Packard 5890II), equipado con una columna HP5 (30 m x 0.32 mm) y un detector FID.

La programación de temperatura del equipo fué la siguiente: 2.5 min isotérmico a 40 °C, luego se incrementó linealmente la temperatura a razón de 8 °C/min hasta alcanzar 225 °C y la temperatura final (225 °C) fué mantenida durante 3 min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron 300 °C y 320 °C respectivamente, el gas de carrera fué nitrógeno, la presión de cabeza fué de 100 KPa y el flujo de desintegración o escisión fué de 50 ml/min.

Finalmente, las áreas correspondientes a cada dilución y concentración que contienen los analitos fueron obtenidas. Así de esta manera, las áreas con sus correspondientes concentraciones pertenecientes a cada analito y las áreas del estándar interno de cada dilución se usaron para construir las curvas de calibración.

Los valores de A_X representa el área de un analito de concentración y dilución conocida para cada $1\mu\text{L}$ inyectado en el GC, A_{ISTD} representa el área del estándar interno de concentración y dilución conocida para cada $1\mu\text{L}$ inyectado, C_X representa la concentración conocida del analito en la correspondiente dilución en $\text{mg}/1\mu\text{L}$ inyectado en el GC, m y b representan la pendiente y la intersección de la línea recta con el eje “Y”.

Finalmente, los valores de A_X/A_{ISTD} obtenidos de cada dilución y concentración fueron ploteados en el eje “Y” y los valores C_X correspondientes a las concentraciones y diluciones conocidas fueron ploteados sobre el eje “X” para formar la siguiente ecuación:

$$A_X/A_{\text{ISTD}} = mC_X \pm b \quad (10)$$

TABLA No. 2
ANALITOS UTILIZADOS COMO ESTANDARES EN
CROMATOGRAFIA DE GAS

Analito	Proveedor	Pureza (%)
Metanol	Penta	99.9
1-propanol	Aldrich	99.5
1-butanol	Fluka	99.5
1-hexanol	Fluka	99.5
2-metil-1-propanol	Fluka	99.5
3-metil-1-butanol	Fluka	98.5
2-metil-1-butanol	Fluka	98.0
2-feniletanol	Fluka	99.0
Linalool	Fluka	98.0
Etil acetato	Fluka	97.0
Butil acetato	Fluka	99.9

TABLA No. 2:
CONTINUACION

Analito	Proveedor	Pureza (%)
Propil acetato	Fluka	99.9
Isobutilacetato	Fluka	99.9
Isoamilacetato	Aldrich	99.0
η -amilacetato	Merck	98.0
2-feniletilacetato	Fluka	99.0
Etil hexanoato	Fluka	98.0

4.7.1.2. Análisis de compuestos volátiles

Los compuestos volátiles como alcoholes superiores, ésteres y acetatos fueron analizados por GC (Hewlett-Packard 5890II), equipado con una columna HP5 (30 m x 0,32 mm) y un detector FID. El programa de temperatura fué la siguiente: 2.5 min isotérmico a 40 °C, luego se incrementó linealmente la temperatura a razón de 8 °C/min hasta alcanzar 225 °C y la temperatura final (225 °C) fué mantenida durante 3 min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron 300 °C y 320 °C respectivamente, el gas de carrera fué nitrógeno, la presión de cabeza fué de 100 KPa y el flujo de desintegración o escisión fué de 50 ml/min.

Las muestras fermentadas fueron centrifugadas por 10 min a 10000 min⁻¹ en una centrifuga SELECTA, Medifriger-BL, de fabricación española y luego filtradas a través de micro-membranas de 0.45 μ m de diámetro. Los análisis de compuestos volátiles fueron realizados usando el método rápido de extracción con diclorometano propuesto, el estándar interno usado fué 1-hexanol. Finalmente 1 μ l

de cada una de estas extracciones se inyectó dentro de la columna cromatográfica y los correspondientes picos fueron obtenidos, la cuantificación se realizó en base a las áreas de los picos.

4.7.1.3. Método de extracción

En tubos de centrifuga de 20 ml con tapas herméticas se colocaron 4.5 gramos de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.0 ml de jugo de manzana fermentada, 7.0 ml de agua, 15 μL de solución de estándar interno (1-hexanol, 150 mg/L diluido en etanol) y 0.2 ml de diclorometano. Los tubos fueron agitados durante 2 horas y luego fueron centrifugados por 10 min a 3.000 min^{-1} . Una vez que las fases se separaron, la fase de diclorometano fué recuperada con una jeringa de 100 μL y transferido a un vial de 0.5-ml. El extracto fué inyectado en el equipo de GC bajo las condiciones de operación mencionadas anteriormente.¹²⁷

Reactivos utilizados

- Diclorometano (Fluka 99.9% de pureza de grado GC)
- Sulfato de amonio anhidro puro $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Etanol (96.4 %v/v de pureza)
- Agua desmineralizada

Otros equipos

- Agitador CH 4103; Messe Basel, Suiza
- Centrífuga; LAB system Praha s.r.o., República Checa
- Escala analítica; A&D Company, Japón

4.7.1.4. Ecuaciones para calcular la cantidad de analito en la muestra

La concentración de cada compuesto (C_x) fué calculado usando el método de análisis por GC usando un estándar interno, la ecuación usada es la siguiente:

$$C_x = (A_x / A_{IS}) \cdot (C_{IS} / D_{RF^x}) \quad (6)$$

Donde: A_{IS} y C_{IS} son el área y la concentración en mg/L del estándar interno (1-hexanol) adicionado a la muestra, A_x es el área del compuesto requerido y D_{RF^x} es el factor de respuesta relativa para este compuesto.

La concentración de un analito en la muestra, el cual fué extraído usando el método de micro-extracción con diclorometano se calcula usando la siguiente ecuación:

$$\text{Cantidad}_x \text{ (mg/L)} = C_x \cdot [V_{CH_2Cl_2} / (V_{INY} \cdot V_{MUESTRA})] \quad (12)$$

Donde: C_x es la concentración en mg obtenido en la ecuación 6; $V_{CH_2Cl_2}$ es el volumen de diclorometano usado en la extracción (ml); V_{INY} es el volumen de la

muestra inyectada ($1 \mu\text{L}=0,001 \text{ ml}$); V_{MUESTRA} es el volumen de la muestra usada en la extracción (L).

4.7.2. Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC).

Para analizar y cuantificar compuestos por HPLC es necesario en primer lugar preparar series de compuestos estándares a diferentes diluciones, pero de concentraciones conocidas. Al inyectar cantidades muy pequeñas de estas mezclas de soluciones estándares en el equipo, el analista obtendrá cromatogramas con áreas de picos para cada compuesto según la concentración de cada uno presente en cada mezcla de estándares. Estos datos servirán para obtener curvas de calibración específicas para cada compuesto, a fin de determinar la linealidad de la respuesta del detector del cromatógrafo líquido y para calcular la concentración de un compuesto desconocido en una muestra.

4.7.2.1. Preparación de curvas de calibración

Se pesaron en una fiola de 100 ml cantidades de aproximadamente 1.0 g de cada analito (**Tabla No. 3**), luego se le adicionó agua desmineralizada hasta completar los 100 ml, así de este modo se preparó la solución madre de estándares. Luego, de ésta solución madre se pipetearon volúmenes exactos de 1.0 ml, 2.0 ml, 4.0 ml, 6.0 ml y 12.0 ml para preparar diluciones sucesivas con agua desmineralizada en

fiolas de 25 ml. Estas diluciones se inyectaron directamente al cromatógrafo líquido. Los azúcares, ácidos orgánicos (ácido acético, succínico y málico), etanol y glicerol se analizaron usando un HPLC (provisto de una bomba LCP 4000) y un detector RID adquirido de Laboratorní přístroje, Praga – RCh., las columnas utilizadas fueron: para ácidos orgánicos, glicerol y etanol la columna de forma H^+ , modelo Ostion LGKS 0800, y para azúcares la columna de forma Ca^+ , modelo Ostion LG-KS 0800 - Tessek Ltd., Praga.

Las condiciones de análisis fueron: la columna se mantuvo a la temperatura de 80 °C, las fases móviles fueron: H_2SO_4 0.01 N para ácidos orgánicos, glicerol y etanol con una tasa de flujo de 0.5 ml/min., y agua desmineralizada para el análisis de azúcares con una tasa de flujo de 1.0 ml/min. Después, cada área obtenida y la concentración correspondiente a cada analito se usaron para construir las curvas de calibración.

El valor de A_X representa el área de un analito de concentración y dilución conocida, C_X representa la concentración conocida en mg/L del analito en la dilución correspondiente, m y b representan la pendiente y la intersección de la línea recta con el eje “Y”.

Finalmente, los valores de A_X obtenidos de cada dilución y concentración son ploteados sobre el eje “Y” y los valores de C_X correspondientes a las concentraciones y diluciones conocidas son ploteadas sobre el eje “X” para formar la siguiente ecuación:

$$A_X = m C_X +/- b \quad (11)$$

TABLA No. 3
ANALITOS UTILIZADOS COMO ESTANDARES EN HPLC

Analito	Proveedor	Pureza %
Glicerol	Penta	98.7
Ácido acético	Penta	99.7
Ácido succínico	SPCHHV*	99.9
Ácido tartárico	Lachema	99.8
Ácido málico	Lachema	99.0
Glucosa	Lachema	99.8
Fructosa	Lachema	99.8
Sucrosa	Lachema	99.8

* Spolek pro chemickou a hutní výrobu

4.7.2.2. Análisis de compuestos no volátiles

Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 10000 min^{-1} en una centrífuga SELECTA, Medifriger-BL, de fabricación Española, luego se inyectan directamente o diluido con agua desmineralizada al equipo de HPLC. Los azúcares, ácidos orgánicos (ácido acético, succínico y málico), etanol y glicerol son analizados usando un HPLC equipado con una bomba LCP 4000 adquirido de ECOM, Praga y un detector RID adquirido de Laboratorní přístroje, Praga. Las columnas utilizadas fueron: para ácidos orgánicos, glicerol y etanol la columnas Ostion LGKS 0800 H⁺, Watrex 250 x 8 mm ó en todo caso una columna de forma H⁺, polímero IEX- Watrex. Para el análisis de azúcares se usó la columna de forma Ca⁺, Ostión LG-KS 0800- Tessek Ltd. Las condiciones de análisis fueron: la columna fué mantenida a una temperatura de 80 °C; las fases móviles fueron:

H₂SO₄ 0.01 N para ácidos orgánicos, glicerol y etanol con una tasa de flujo de 0.5 ml/min., y agua desmineralizada para análisis de azúcares con una tasa de flujo de 1.0 ml/min. Finalmente se realizó la cuantificación basado en las áreas de los picos usando las correspondientes ecuaciones de las curvas de calibración. Todos los análisis fueron conducidos por triplicado, los reactivos utilizados fueron de grado GC y HPLC.

4.7.2.3. Ecuaciones para calcular la cantidad de analito en la muestra

Para calcular la cantidad de una sustancia en la muestra podemos usar la siguiente ecuación:

$$A_X = m C_X \pm b \quad (11)$$

Donde: A_X es el área del analito obtenido en el análisis, C_X es la concentración desconocida del analito en mg/L, m y b son la pendiente y la intersección de la línea recta con el eje "Y".

CAPITULO V

RESULTADOS

Las figuras y tablas que se presentan a continuación son los resultados obtenidos en los experimentos realizados por el autor.

5.1. Estudio de morfología, fisiología y metabolismo de levaduras

Seguidamente se describe de manera simple las características morfológicas y fisiológicas de levaduras tales como su habilidad de fermentación, tolerancia al etanol y sulfito.

5.1.1. Características morfológicas de levaduras

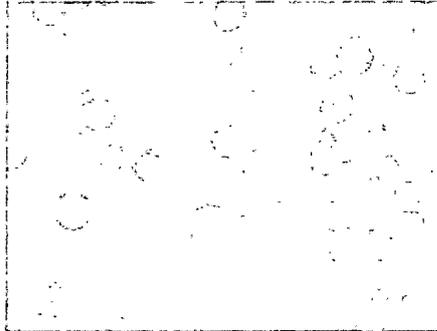
Todas las cepas fueron cultivadas en medio líquido sintético de Wickerham

Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus RIVE 15-1-416

- Difusión de pigmento rojizo: no formación de pigmentos
- Margen de la colonia: redondas y transparentes
- Color de la colonia: crema y blanca
- Apariencia de la colonia: redondas y suaves
- Textura de la colonia: suaves con brillo metálico
- Reproducción asexual: gemación multilateral
- Forma de la célula: redondas, ovaladas y cilíndricas.

FIGURA No. 8

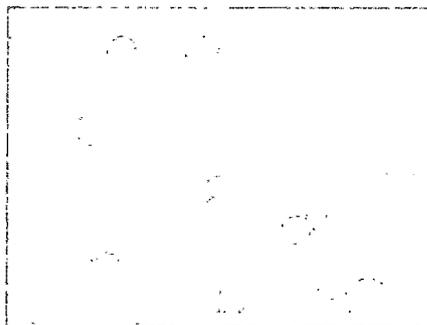
CELULAS DE LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*
RIVE 15-1-416 CULTIVADO EN MEDIO SINTETICO
LIQUIDO WICKERHAM

***Candida stellata RIVE 3-16-1***

- Difusión de pigmento rojizo: no formación de pigmentos
- Margen de la colonia: redonda y transparente
- Color de la colonia: crema y blanca
- Apariencia de la colonia: redondas pequeñas y suaves
- Textura de la colonia: suaves con brillo metálico
- Reproducción asexual: gemación multilateral
- Forma de la célula: redondas pequeñas, ovaladas.

FIGURA No. 9

CELULAS DE LEVADURA *Candida stellata RIVE*
3-16-1 CULTIVADO EN MEDIO SINTETICO DE
WICKERHAM



***Brettanomyces intermedius* RIVE 2-2-2**

- Difusión de pigmento rojizo: no formación de pigmentos
- Margen de la colonia: redondas y transparentes
- Color de la colonia: crema
- Apariencia de la colonia: redondas
- Textura de la colonia: suaves con brillo metálico
- Reproducción asexual: gemación multilateral
- Forma de la célula: ovaladas, cilíndricas.

FIGURA No. 10

CELULAS DE LEVADURA *Brettanomyces intermedius*
RIVE 2-2-2 CULTIVADO EN MEDIO SINTETICO
LIQUIDO WICKERHAM

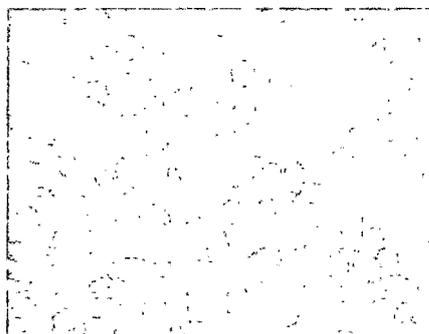


***Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1**

- Difusión de pigmento rojizo: no formación de pigmentos
- Margen de la colonia: redondas y transparentes
- Color de la colonia: crema y blanca
- Apariencia de la colonia: redondas, rugosas tipo coliflor
- Textura de la colonia: rugosas, mantecoso sin brillo metálico
- Reproducción asexual: gemación bipolar
- Forma de la célula: como de limón y ovaladas.

FIGURA No. 11

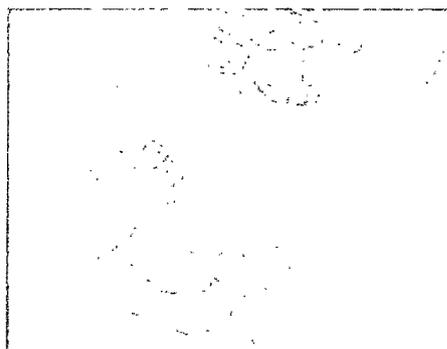
CELULAS DE LEVADURA *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1
CULTIVADO EN MEDIO SINTETICO WICKERHAM

***Saccharomyces ludwigii* RIVE 16-1-5**

- Difusión de pigmento rojizo: no formación de pigmentos
- Margen de la colonia: redondas y transparentes
- Color de la colonia: cremas y amarillentas
- Apariencia de la colonia: redondas y suaves
- Textura de la colonia: suaves con brillo metálico
- Reproducción asexual: gemación bipolar
- Forma de la célula: como de limón, ovaladas y cilíndricas.

FIGURA No. 12

CELULAS DE LEVADURA *Saccharomyces ludwigii* RIVE
16-1-5 CULTIVADO EN MEDIO SINTETICO LIQUIDO
WICKERHAM

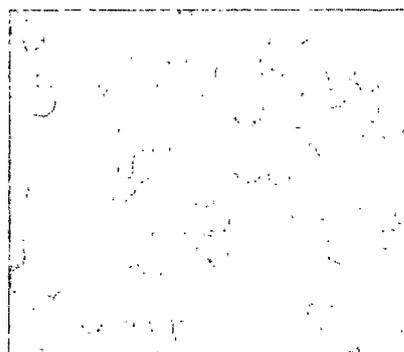


***Hansenula anomala* RIVE 7-1-5**

- Difusión de pigmento rojizo: no formación de pigmentos
- Margen de la colonia: redondas no transparentes
- Color de la colonia: crema y blanca
- Apariencia de la colonia: redondas, rugosas como coliflor
- Textura de la colonia: rugosas, mantecoso sin brillo metálico
- Reproducción asexual: gemación multilateral
- Forma de la célula: redondas, ovaladas.

FIGURA No. 13

CELULAS DE LEVADURA *Hansenula anomala* RIVE 7-1-5 CULTIVADO EN MEDIO SINTETICO LIQUIDO WICKERHAM

**5.2. Fermentaciones de Diferentes Fuentes de Carbono**

Como sacáridos fueron utilizados las siguientes sustancias: D-glucosa, D-galactosa, maltosa, sucrosa, lactosa, rafinosa, almidón, D-xilosa y D-manosa a 28 °C (Ver la metodología en la sección 4.1.5). Todas las levaduras fueron ensayadas

en medio Sabouraud conteniendo como fuente de carbono 2 % de azúcar. La actividad de fermentación fué medida subjetivamente usando tubos Durham por desprendimiento de CO₂.

TABLA No. 4

HABILIDAD DE LEVADURAS *Saccharomyces* Y *no-Saccharomyces* PARA FERMENTAR DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

Cepa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 15-1-416	<i>Candida stellata</i> 3-16-1	<i>Brettanomyces intermedius</i> 2-2-2	<i>Saccharomycodes ludwigii</i> 16-1-5	<i>Hansenula anomala</i> 7-1-5	<i>Kloeckera apiculata</i> 9-2-1
D-glucosa	+++*	+++	++	++	+++**	++*
D-galactosa	-	-	+	-	+*	-
Maltosa	+++*	-	++	++*	++*	-
Sucrosa	+++*	++	++	+++*	++*	++*
Lactosa	-	-	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-	-	-
Almidón	-	-	-	-	-	-
D-xilosa	-	-	-	-	-	-
D-manosa	+++	+++	++	+++	+++***	+++*

Producción de CO₂: Intensa: +++, moderada: ++, débil: +

Formación de film sobre la superficie del medio líquido: Intenso: ***, moderado: **, débil: *

5.3. Producción de Etanol por Levaduras

Como azúcares fermentables para el medio sintético fué escogida una mezcla de fructosa, glucosa y sucrosa en proporciones promedio presentes en el jugo de manzana natural. Otro medio de fermentación fué jugo de manzana concentrado que ha sido reconstituido con agua destilada. Los detalles de la composición del medio son citados en las secciones 4.2 y 4.3. En el caso del medio sintético el valor del pH fué ajustado a 3.8, valor promedio encontrado en el jugo de manzana natural.

A. Medio Sintético

Los experimentos se realizaron a condiciones anaeróbicas en frascos Erlenmeyer de 0.5 L en un medio sintético conteniendo 150 g/L de una mezcla de glucosa, fructosa y sucrosa. El tiempo de fermentación concluyó cuando la producción de CO₂ cesó completamente (entre 15 – 19 días). Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

TABLA No. 5
**ETANOL PRODUCIDO POR LEVADURAS *Saccharomyces* y no-
Saccharomyces EN MEDIO SINTETICO A 28 °C**

Cepas ensayadas	Etanol producido g/L	Etanol %(v/v)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 15-1-416	61.7	7.82%
<i>Candida stellata</i> 3-16-1	53.42	6.77%
<i>Kloeckera apiculata</i> 9-2-1	24.62	3.12%
<i>Saccharomycodes ludwigii</i> 16-1-5	54.28	6.88%
<i>Hansenula anomala</i> 7-1-5	50.02	6.34%
<i>Brettanomyces intermedius</i> 2-2-2	26.27	3.33%

B. Jugo de Manzana Reconstituido

El jugo de manzana concentrado fué reconstituido hasta obtener el contenido natural de azúcares del jugo (120 g/L), además durante el proceso de evaporación en la planta de concentrado fué removido el aroma natural. Este medio sirvió para los ensayos en aerobiosis y anaerobiosis usando temperaturas de 16 °C y 28 °C. La temperatura de 18 °C es preferido en la fermentación de sidra.⁹⁵

B. 1 Producción de Etanol a Condiciones Aeróbicas

Los experimentos se realizaron en agitación como se indicó anteriormente. El tiempo de cultivo fué aproximadamente de 15 – 19 días. Los resultados se muestran en las siguientes tablas.

TABLA No. 6

ETANOL PRODUCIDO AEROBICAMENTE POR LEVADURAS
Saccharomyces y *no-Saccharomyces* EN JUGO DE MANZANA
 RECONSTITUIDO A 16 °C

Cepas	Etanol producido g/L	Etanol %(v/v)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIVE 15-1-416	46.4	5.88
<i>Candida stellata</i> RIVE 3-16-1	41.1	5.21
<i>Kloeckera apiculata</i> RIVE 9-2-1	33.0	4.18
<i>Saccharomycodes ludwigii</i> RIVE 16-1-5	49.4	6.26
<i>Hansenula anomala</i> RIVE 7-1-5	37.0	4.69
<i>Brettanomyces intermedius</i> RIVE 2-2-2	24.5	3.1

TABLA No. 7

ETANOL PRODUCIDO AEROBICAMENTE POR LEVADURAS
Saccharomyces y *no-Saccharomyces* EN JUGO DE MANZANA
 RECONSTITUIDO A 28 °C

Cepas	Etanol producido g/L	Etanol %(v/v)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIVE 15-1-416	48.8	6.19
<i>Candida stellata</i> RIVE 3-16-1	33.9	4.30
<i>Kloeckera apiculata</i> RIVE 9-2-1	35.4	4.48
<i>Saccharomycodes ludwigii</i> RIVE 16-1-5	52.9	6.7
<i>Hansenula anomala</i> RIVE 7-1-5	18.5	2.35
<i>Brettanomyces intermedius</i> RIVE 2-2-2	21.2	2.69

B.2 Producción de Etanol a Condiciones Anaeróbicas

Los resultados del experimento se muestran en las siguientes tablas.

TABLA No. 8

ETANOL PRODUCIDO ANAEROBICAMENTE POR LEVADURAS
Saccharomyces y *no-Saccharomyces* EN JUGO DE MANZANA
RECONSTITUIDO A 16 °C

Cepas	Etanol producido g/L	Etanol %(v/v)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIVE 15-1-416	51.8	6.57
<i>Candida stellata</i> RIVE 3-16-1	51.2	6.49
<i>Kloeckera apiculata</i> RIVE 9-2-1	11.7	1.48
<i>Saccharomycodes ludwigii</i> RIVE 16-1-5	34.7	4.40
<i>Hansenula anomala</i> RIVE 7-1-5	24.1	3.05
<i>Brettanomyces intermedius</i> RIVE 2-2-2	20.3	2.57

TABLA No. 9

ETANOL PRODUCIDO ANAEROBICAMENTE POR LEVADURAS
Saccharomyces y *no-Saccharomyces* EN JUGO DE MANZANA
RECONSTITUIDO A 28 °C

Cepas	Etanol producido g/L	Etanol %(v/v)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIVE 15-1-416	54.9	6.96
<i>Candida stellata</i> RIVE 3-16-1	39.8	5.04
<i>Kloeckera apiculata</i> RIVE 9-2-1	31.2	3.95
<i>Saccharomycodes ludwigii</i> RIVE 16-1-5	54.3	6.88
<i>Hansenula anomala</i> RIVE 7-1-5	45.8	5.81
<i>Brettanomyces intermedius</i> RIVE 2-2-2	23.5	2.98

5.4. Tolerancia al Etanol a Condiciones Anaeróbicas y Aeróbicas

En esta parte de la investigación se estudió la sensibilidad de las cepas de levadura al etanol, el cual se adicionó como un factor externo. Los experimentos se realizaron de la manera descrita en la sección 4.4, en medio sintético utilizando un agitador (sistema aeróbico) y en tubos Durham (sistema anaeróbico). En aerobiosis se midió la duración de la fase de retraso del crecimiento y en anaerobiosis se determinó visualmente la producción de CO₂. Los resultados se muestran en las siguientes figuras y tablas.

Condiciones Anaeróbicas

TABLA No. 10

HABILIDAD DE LEVADURAS PARA FERMENTAR GLUCOSA A 28 °C DURANTE 72 HORAS, EN UN MEDIO CONTENIENDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL

Cepas % v/v etanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 15-1- 416	<i>Candida stellata</i> 3-16-1	<i>Saccharomyces ludwigii</i> 16-1-5	<i>Hansenula anomala</i> 7-1-5	<i>Brettanomyces intermedius</i> 2-2-2	<i>Kloeckera apiculata</i> 9-2-1
Sin etanol	+++*	+++*	+++	+++***	+++***	+++*
2.0 % etanol	+++*	++*	+++	+++**	+++*	++*
4.0 % etanol	+++*	++	+++	+++**	+	+
6.0 % etanol	+++*	+	+++	+++*	-	-
8.0 % etanol	+++*	-	+	+	-	-
10. % etanol	+*	-	-	-	-	-
12.0 % etanol	-	-	-	-	-	-

Producción de CO₂: Intensa: +++, moderada: ++, débil: +

Formación de film sobre la superficie del medio líquido: Intenso: ***, moderado: **, débil: *

Condiciones Aeróbicas

La temperatura se controló a 28 °C. El tiempo de fermentación concluyó cuando se observó el inicio de la fase logarítmica, sin embargo algunos experimentos se realizaron hasta la fase estacionaria de crecimiento.

FIGURA No. 14

TOLERANCIA DE *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416
A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL

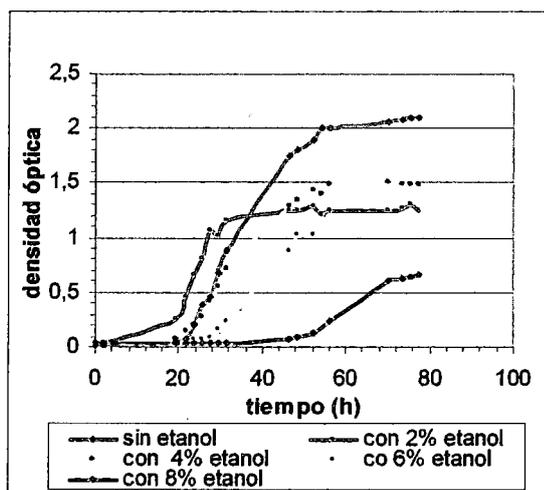


FIGURA No. 15

TOLERANCIA DE *Candida stellata* RIVE 3-16-1 A
DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL

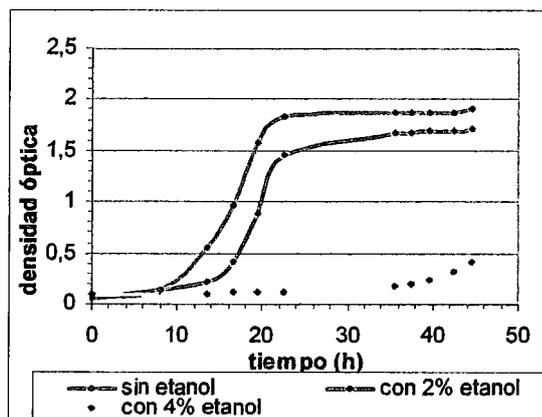


TABLA No. 11

FASE LAG EN *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 Y *Candida stellata* RIVE 3-16-1 CULTIVADOS EN MEDIO SINTETICO A 28 °C, CONTENIENDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL

%v/v etanol	0% etanol	2.0 % etanol	4.0 % etanol	6.0 % etanol	8.0 % etanol
Cepa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIVE 15-1-416				
Fase lag	19.5 h	19 h	19.5 h	27.5 h	46.5 h
Cepa	<i>Candida stellata</i> RIVE 3-16-1				
Fase lag	8 h	13.5 h	35.5 h	---	---

FIGURA No. 16

TOLERANCIA DE *Hansenula anomala* RIVE 7-1-5 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL

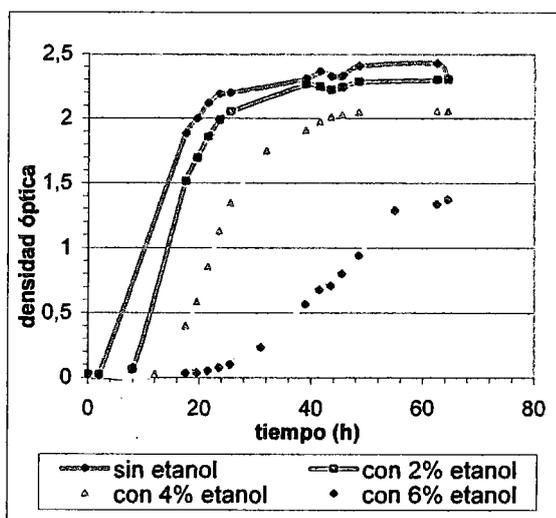
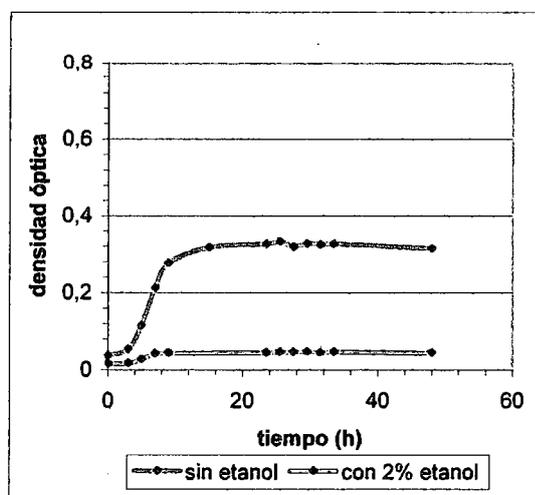


FIGURA No. 17

TOLERANCIA DE *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL

**TABLA No. 12**

FASE LAG EN *Hansenula anomala* RIVE 7-1-5 Y *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1 CULTIVADOS EN MEDIO SINTETICO A 28 °C, CONTENIENDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL

%v/v etanol	0% etanol	2.0 % etanol	4.0 % etanol	6.0 % etanol
Cepa	<i>Hansenula anomala</i> RIVE 7-1-5			
Fase lag	2 h	8 h	12 h	25 h
Cepa	<i>Kloeckera apiculata</i> RIVE 9-2-1			
Fase lag	3 h	5 h	---	---

FIGURA No. 18

TOLERANCIA DE *Brettanomyces intermedius* RIVE
2-2-2 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL

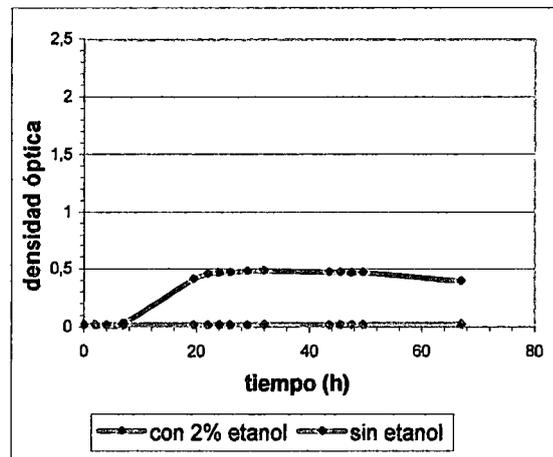


FIGURA No. 19

TOLERANCIA DE *Saccharomyces ludwigii*
RIVE 16-1-5 A DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE ETANOL

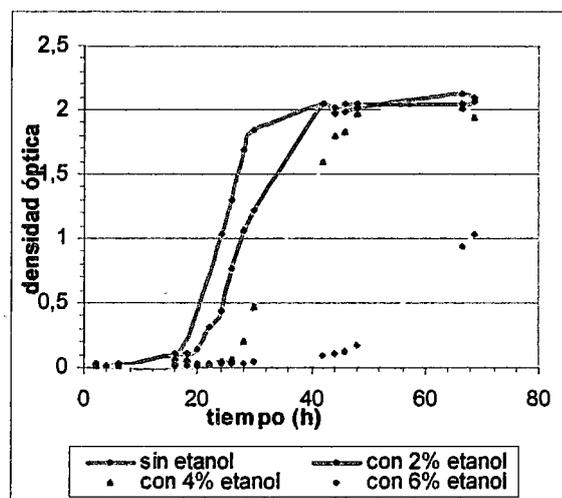


TABLA No. 13

FASE LAG EN *Brettanomyces intermedius* RIVE 2-2-2 Y *Saccharomyces ludwigii* RIVE 16-1-5 CULTIVADOS EN MEDIO SINTETICO A 28 °C, CONTENIENDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL

%v/v etanol	0% etanol	2.0 % etanol	4.0 % etanol	6.0 % etanol
Cepa	<i>Brettanomyces intermedius</i> RIVE 2-2-2			
Fase lag	7 h	50 h	--	--
Cepa	<i>Saccharomyces ludwigii</i> RIVE 16-1-5			
Fase lag	16 h	20 h	26 h	46 h

5.5. Tolerancia al Sulfito a Condiciones Anaeróbicas y Aeróbicas

La parte más efectiva del metabisulfito de sodio sobre la actividad de la célula es el SO₂ libre. Su concentración depende del valor de pH del medio. Cada concentración de metabisulfito debe actuar a un valor de pH correspondiente. Esto quiere decir que la concentración inicial de SO₂ es dependiente no solamente de la concentración de metabisulfito sino del valor de pH y posiblemente de la temperatura.

Condiciones Anaeróbicas

Los experimentos se realizaron en tubos Durham y el proceso fué evaluado similarmente como en el caso del estudio de tolerancia al etanol. En la **tabla No. 14** se muestra los resultados.

TABLA No. 14

HABILIDAD DE LEVADURAS PARA FERMENTAR EN CONDICIONES ANAEROBICAS UN MEDIO CONTENIENDO DIFERENES CONCENTRACIONES DE METABISULFITO Y A DIFERENTES VALORES DE pH

Cepas Na₂S₂O₅	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 15-1-416	<i>Kloeckera apiculata</i> 9-2-1	<i>Brettanomyces intermedius</i> 2-2-2	<i>Saccharomyces ludwigii</i> 16-1-5	<i>Hansenula anomala</i> 7-1-5	<i>Candida stellata</i> 3-16-1
sin Na ₂ S ₂ O ₅	+++*	+++*	+++***	+++	+++***	+++*
100 mg/L, pH 3.3	+++*	-	-	+++	-	-
150 mg/L, pH 3.65	+++*	-	-	+++*	-	-
200 mg/L, pH 4.24	+++*	-	-	+++*	-	-

Producción de CO₂: Intensa: +++, moderada: ++, débil: +

Formación de film sobre la superficie del medio líquido: Intenso: ***, moderado: **, débil: *

Condiciones Aeróbicas

Los valores de pH para cada concentración de metabisulfito fueron los mismos como en el caso anterior:

100 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ – pH 3.3

150 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ – pH 3.65

200 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ – pH 4.24

FIGURA No. 20

TOLERANCIA DE *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SULTIFO

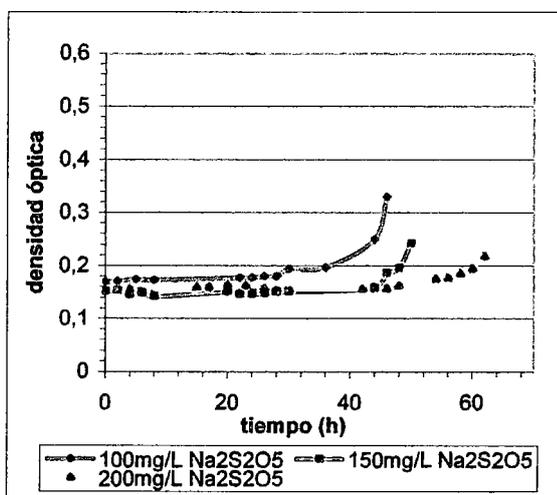


FIGURA No. 21

TOLERANCIA DE *Saccharomyces ludwigii*
RIVE 16-1-5 A DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE SULFITO

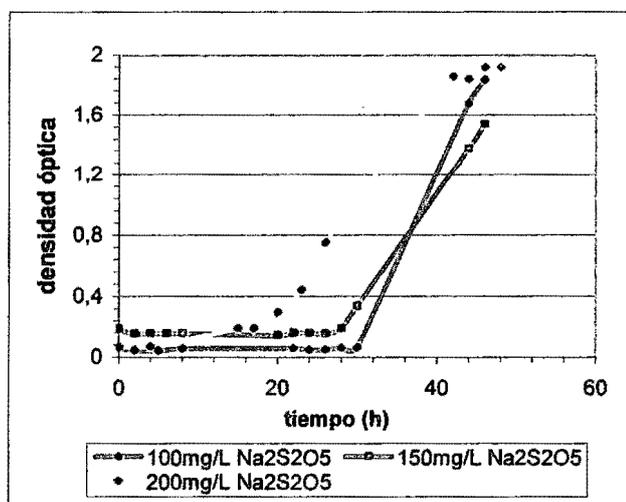


TABLA No. 15

FASE LAG EN *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416
Y *Saccharomyces ludwigii* RIVE 16-1-5, CULTIVADOS EN
MEDIO SINTETICO CONTENIENDO METABISULFITO A
DIFERENTES CONCENTRACIONES Y VALORES DE pH

Na ₂ S ₂ O ₅ mg/L	100 mg/L pH 3.3	150 mg/L pH 3.65	200 mg/L pH 4.24
Cepa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIVE 15-1-416		
Fase lag	36 h	44 h	56 h
Cepa	<i>Saccharomyces ludwigii</i> RIVE 16-1-5		
Fase lag	30 h	28 h	17 h

Las demás cepas de levadura: *Candida stellata* RIVE 3-16-1, *Kloeckera*
apiculata RIVE 9-2-1, *Brettanomyces intermedius* RIVE 2-2-2, *Hansenula*

anomala RIVE 7-1-5 no fueron capaces de crecer a concentraciones de metabisulfito de: 100 mg/L, 150 mg/L y 200 mg/L.

5.6. Determinación de Sub-productos del Metabolismo de Levaduras

En el jugo de manzana fermentado a condiciones aeróbicas y anaeróbicas, posteriormente separado de las levaduras se determinó los sacáridos, ácidos orgánicos, ésteres y alcoholes superiores, sustancias que afectan significativamente las características sensoriales de la sidra. Las condiciones de análisis y del equipo para los métodos cromatográficos de análisis son descritos en la sección 4.6.

5.6.1. Cromatografía de Gas y Líquida (CG y HPLC) de Soluciones estándares. Búsqueda de Condiciones Óptimas de Análisis.

Se determinó en primer lugar los tiempos de retención de los compuestos estándares en la columna del cromatógrafo, así mismo se determinó las curvas de calibración de cada uno de los analitos, los coeficientes de correlación indican la exactitud de los cálculos obtenidos para cada curva (ecuación) de calibración. En la **tabla No. 16** se muestra las curvas de calibración obtenidas para cada estándar y así mismo su correspondiente coeficiente de correlación:

TABLA No. 16
ECUACIONES Y CORRELACIONES (r^2) DE LOS ANALITOS
UTILIZADOS EN CROMATOGRAFIA GASEOSA

Analitos	Ecuación	r^2
Análisis por GC		
Metanol	$A_x/A_{ISTD} = 44.56mx + 0.4878$	0.9998
1-propanol	$A_x/A_{ISTD} = 80.81mx + 0.6719$	0.9974
1-butanol	$A_x/A_{ISTD} = 80.39mx + 0.8500$	0.9991
2-metil-1-propanol	$A_x/A_{ISTD} = 81.47mx + 0.9747$	0.9974
3-metil-1-butanol	$A_x/A_{ISTD} = 80.64mx + 0.8634$	0.9970
2-metil-1-butanol	$A_x/A_{ISTD} = 68.16mx + 1.0949$	0.9999
2-feniletanol	$A_x/A_{ISTD} = 21.54mx + 1.0298$	0.9999
Linalool	$A_x/A_{ISTD} = 25.30mx + 0.9729$	0.9953
Etil acetato	$A_x/A_{ISTD} = 37.87mx + 0.5688$	0.9997
Butil acetato	$A_x/A_{ISTD} = 144.38mx + 0.3195$	0.9968
Propil acetato	$A_x/A_{ISTD} = 42.02mx + 0.6011$	0.9999
Isobutilacetato	$A_x/A_{ISTD} = 47.66mx + 0.7121$	0.9999
Isoamilacetato	$A_x/A_{ISTD} = 30.03mx + 0.8919$	0.9999
η -amilacetato	$A_x/A_{ISTD} = 53.04mx + 0.7071$	0.9980
2-feniletacetato	$A_x/A_{ISTD} = 487.23mx + 0.5138$	0.9987
Etil hexanoato	$A_x/A_{ISTD} = 273.01mx + 0.5669$	0.9957
Etil octanoato	$A_x/A_{ISTD} = 19.27mx + 0.8418$	0.9988
Etil decanoato	$A_x/A_{ISTD} = 80.00mx + 0.5002$	0.9980
Análisis por HPLC		
Glicerol	$A_x = 0.5455mx - 56.7853$	0.9997
Ácido acético	$A_x = 0.2415mx - 22.4703$	0.9996
Ácido láctico	$A_x = 0.1874mx + 25.8465$	0.9999
Ácido succínico	$A_x = 0.3692mx - 1.3960$	0.9999
Ácido tartárico	$A_x = 0.5731mx - 46.9718$	0.9998
Ácido málico	$A_x = 0.4228mx - 13.3889$	0.9999
Glucosa	$A_x = 0.2380mx - 1.5740$	0.9999
Fructosa	$A_x = 0.2382mx - 11.6754$	0.9999
Sucrosa	$A_x = 0.2370mx - 2.7496$	0.9999

Fuente: Elaboración propia

5.7. Análisis de Compuestos Sensoriales Producidos en Condiciones Aeróbicas y Anaeróbicas

Las levaduras fueron ensayadas como culturas puras, mixtas y secuenciales. Las fermentaciones secuenciales se realizaron adicionando *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 al jugo de manzana fermentado previamente por levaduras no-*Saccharomyces* (*Cs 3-16-1*, *Ka 9-2-1*), durante ocho días a 28 °C (a condiciones aeróbicas y anaeróbicas). La segunda fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416, duró ocho días más a condiciones aeróbicas (los frascos Erlenmeyer fueron agitados a 200 min⁻¹) y por siete días más a condiciones anaeróbicas. Los resultados se muestran en los siguientes cuadros.

Los resultados obtenidos tanto a condiciones aerobias como anaerobias de los cultivos puros, mixtos y secuenciales se muestran en las **tablas No. 17 y 18**.

Condiciones Anaeróbicas

TABLA No. 17

**SUB-PRODUCTOS DEL METABOLISMO ANAEROIO PRODUCIDO POR LEVADURAS *Saccharomyces* Y no-
Saccharomyces EN CULTIVOS PUROS, IXTOS Y SECUENCIALES**

Compuestos(mg/L)	<i>Sc 416</i>	<i>Sl 16-1-5</i>	<i>Cs 3-16-1</i>	<i>Ha 7-1-5</i>	<i>Ka 9-2-1</i>	<i>Sc 416 / Cs 3-16-1</i>	<i>Sc 416 / Ka 9-2-1</i>	<i>Sc 416 / Bi 2-2-2</i>	<i>Cs 3-16-1 + Sc 416</i>	<i>Ka 9-2-1 + Sc 416</i>
Glicerol *	2.9	3.5	3.8	1.5	2.6	3.4	2.1	2.5	3.2	3.4
1-Propanol	27	21	11	41	14	30	28	43	37	18
1-Butanol	8.6	4.5	3.0	9.7	8.5	4.6	3.25	4.7	6.1	5.5
2-Butanol	1.5	tr.	2	1	0.5	1.3	1	2.5	1.3	-
2-Metil-propanol	70	105	154	83	60	167	118	149	93	31
3-Metil-butanol	268	303	137	54	83	296	153	182	198	31
2-Metil-butanol	159	102	154	28	15	185	92	107	172	24
2-feniletanol	22	33	25	31	9	64	58	28	52	13
Linalool	2.1	-	tr.	0.5	2	2.5	1.5	tr.	1.8	2
Etil acetato	51	24	17	102	196	39	89	102	35	114
Butil acetato	5	-	tr.	tr.	-	5	7	tr.	tr.	tr.
Isobutilacetato	1.8	-	1.7	6,7	-	-	-	-	1,9	-
Isoamilacetato	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-
Etil decanoato	5.3	14.1	-	4.55	8.5	2.8	11.2	6.7	3.9	4.3
Ácido acético	266	303	150	366	260	281	252	333	126	227
Ácido succínico *	0.77	0.8	1.2	0.7	1.0	1.1	1.15	0.9	1.13	1.05

*g/L., tr.: traza

Condiciones Aeróbicas

TABLA No. 18

SUB-PRODUCTOS DEL METABOLISMO AEROBIO PRODUCIDO POR LEVADURAS *Saccharomyces* Y no-*Saccharomyces*, EN CULTIVOS PUROS, MIXTOS Y SECUENCIALES

Compuestos (mg/L)	<i>Sc 416</i>	<i>Sl 16-1-5</i>	<i>Cs 3-16-1</i>	<i>Ha 7-1-5</i>	<i>Ka 9-2-1</i>	<i>Sc 416 / Cs 3-16-1</i>	<i>Sc 416 / Ka 9-2-1</i>	<i>Sc 416 / Bi 2-2-2</i>	<i>Cs 3-16-1 + Sc 416</i>	<i>Ka 9-2-1 + Sc 416</i>
Glicerol *	0.11	0.18	1.9	1.4	1.8	0.3	0.35	0.53	1.1	0.64
1-Propanol	6	17	58	19	30	20	17	50	38	53
1-Butanol	17.4	8.7	2.4	23.2	7.8	13.2	6.2	6.0	8.9	5.1
2-Butanol	2	26	1.5	3	1.2	2.5	1.7	2	1.8	1.6
2-Metil-propanol	47	240	113	218	158	259	86	274	206	126
3-Metil-butanol	123	278	162	228	110	290	56	273	245	202
2-Metil-butanol	93	152	130	162	168	206	117	215	278	181
2-feniletanol	27	122	154	26	116	161	42	189	247	230
Linalool	-	-	0.2	1	-	2	-	tr.	tr.	-
Etil acetato	75	130	176	206	96	64	89	122	243	117
Butil acetato	-	-	-	-	-	tr.	-	-	-	-
Isobutilacetato	-	0.95	-	-	-	-	-	-	-	-
Isoamilacetato	-	-	-	1.7	-	-	-	-	-	-
Etil decanoato	5.89	-	2.86	2.3	9.6	9.68	1.3	14.95	10.3	12.2
Ácido acético	51	56	90	196	222	116	89	94	360	126
Ácido succínico	1.32	0.99	1.7	0.74	0.85	1.89	1.49	1.61	1.81	1.33

*g/L., tr.: trazas.

CAPITULO VI

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El mayor enfoque de este trabajo de investigación esta en la determinación de compuestos de importancia sensorial producidos por cepas de levadura durante la etapa de fermentación de la sidra. Se ha puesto mayor énfasis en el estudio del comportamiento metabólico de las levaduras durante la fermentación bajo diferentes condiciones de cultivo antes que la parte tecnológica de elaboración de sidra propiamente dicha, desde este punto de vista se consigue entender mejor la producción cuantitativa y cualitativa de metabolitos durante la fermentación, el cual tiene directa correlación con el perfil sensorial de la sidra como producto final del proceso.

Uno de los objetivos del trabajo de investigación fué estudiar las propiedades generales de cepas de levadura los cuales podrían ser usadas como criterios para la selección de levaduras y posterior aplicación en la fermentación de jugo de manzana. La morfología fué tomada como una herramienta para describir la forma de las células creciendo en una fase sólida y líquida, similar al jugo de manzana. Las células muy pequeñas podrían causar dificultades en la operación de separación al final del proceso de elaboración de sidra.

Los puntos más importantes en la primera parte de la investigación están conectados con la producción de etanol a condiciones aeróbicas y anaeróbicas, tolerancia al etanol y tolerancia al metabisulfito. Esto nos puede ayudar para poder

decidir cuáles cepas podrían ser de aplicación en la elaboración de sidra. Desde que la norma técnica nacional ITINTEC no tiene documentada aspectos técnicos de elaboración de sidras y mucho menos que especies de levadura se deben de utilizar.

De la investigación realizada, las siguientes cepas son recomendadas para su aplicación posterior en la elaboración de sidra:

- *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416
- *Candida stellata* RIVE 3-16-1
- *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1

Biosíntesis de Etanol y Metabolitos

Uno de los más importantes factores a tomarse en cuenta es la temperatura. Las fermentaciones realizadas por levaduras en medio sintético en condiciones anaeróbicas a 28 °C mostraron que, *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 alcanzó la mayor producción de etanol entre 61.7 g/L, mientras que, *Candida stellata* RIVE 3-16-1 produjo 53.42 g/L, *Saccharomycodes ludwigii* RIVE 16-1-5 produjo 54.28 g/L, *Hansenula anomala* RIVE 7-1-5 produjo 50.02 g/L y la menor cantidad de etanol producido se observó en *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1 la cual produjo sólo 24.62 g/L.

Las fermentaciones a condiciones aeróbicas en jugo de manzana mostraron que a 16 °C *Candida stellata* RIVE 3-16-1 produjo mayor concentración de etanol

(41.1 g/L) que a 28 °C (33.9 g/L). Las temperaturas bajas son importantes en el proceso de producción sidra y deben ser tomadas en cuenta.

De los resultados obtenidos respecto a la producción anaeróbica de etanol se seleccionaron las mejores cepas de levadura, los cuales fueron:

- *Candida stellata* RIVE 3-16-1 (alta producción de etanol)
- *Saccharomycodes ludwigii* RIVE 16-1-5, (alta tolerancia al etanol y al sulfito)
- *Saccharomyces cerevisiae* 15-1-416, (alta producción de etanol y tolerancia al sulfito)

La cepa *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1 podría ser de interés para el proceso de elaboración de sidra, pero no produce mucho etanol (34 g/L), su importancia está en la producción de etil acetato que puede llegar a producir hasta 196 mg/L.

Las levaduras *Brettanomyces* son conocidos como productoras de ácidos orgánicos, mayormente ácido acético y tienen un especial rol en la elaboración de cervezas Belgas. En el caso de la fermentación de jugo de manzana ellos no tienen importancia, forman muy poco etanol (26.3 g/L) y son muy sensibles al etanol y al sulfito.

Los ensayos de fermentación anaeróbica mostraron que todas las cepas de levaduras ensayadas, fueron capaces de utilizar sacáridos tales como D-glucosa, D-manosa y sucrosa.

Los ensayos de tolerancia al etanol en condiciones anaeróbicas mostraron que la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 fué capaz de fermentar en medio conteniendo etanol en concentraciones de 2.0 % v/v – 10.0 % v/v. También

se observó que la cepa de *Hansenula anomala* RIVE 7-1-5 y *Saccharomyces ludwigii* RIVE 16-1-5 tienen un comportamiento similar ya que fermentaron los azúcares en el medio con 8.0 % v/v de concentración de etanol.

El crecimiento aeróbico de levaduras en medio conteniendo 2.0 % v/v, 4.0 % v/v de concentración de etanol, no afectaron la fase lag en *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416. La cepa de *Candida stellata* RIVE 3-16-1 creció muy bien a concentraciones de etanol de 2.0 % v/v y 4.0 % v/v.

Hansenula anomala RIVE 7-1-5 mostró buen crecimiento aeróbico a concentraciones de etanol de 2.0 % v/v, 4.0 % v/v, 6.0 % v/v; la corta fase lag sugiere una rápida adaptación a medioambientes con baja concentración de etanol. Sin embargo, *Saccharomyces ludwigii* RIVE 16-1-5 mostró un buen crecimiento a concentraciones de etanol de 2.0 % v/v, 4.0 % v/v y 6 % v/v, alcanzando en ambas concentraciones de etanol crecimientos máximos similares.

La tolerancia al metabisulfito es también un parámetro muy importante por que es comúnmente usado en la elaboración de sidra. La tolerancia en condiciones anaeróbicas se observó solamente en las cepa de *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 y *Saccharomyces ludwigii* RIVE 16-1-5, mientras que las demás cepas no fueron capaces de fermentar ó crecer incluso a bajas concentraciones de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Por el contrario, en condiciones aeróbicas, el sulfito afecta la extensión de la fase lag en *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 y *Saccharomyces ludwigii* RIVE 16-1-5. El impacto del sulfito depende de la concentración de SO_2 libre, el cual es afectado por el valor de pH del medio de fermentación.

Otro compuesto importante en sidra es **glicerol**. Desde este punto de vista en fermentaciones anaeróbicas con cultivos puros de *Saccharomyces ludwigii* RIVE 16-1-5 y *Candida stellata* RIVE 3-16-1 y cultivos secuenciales con *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1 y *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416, se observaron la mayor producción de glicerol (3.5 g/L, 3.8 g/L y 3.4 g/L), respectivamente. El contenido de glicerol en vinos, sidras y otras bebidas alcohólicas fermentadas es muy importante por su contribución a la suavidad del aroma y gusto. En general, la síntesis de glicerol a condiciones aeróbicas fué menor en todas las formas de cultivo y con todas las cepas comparado con los ensayos a condiciones anaeróbicas (Ver **tablas No. 17 y 18**).

La mayor producción de alcoholes superiores (**2-metil-propanol + 3-metil-butanol + 2-metil-butanol**) a condiciones anaeróbicas se manifestaron en cultivos puros y secuenciales de *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416, *Candida stellata* RIVE 3-16-1 + *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 (497mg/L y 463 mg/L), respectivamente. Según De Wet, P. 1978, estos valores de alcoholes superiores obtenidos están dentro de las concentraciones comunes encontradas en vinos y sidras, sin embargo la concentración de **2-metil-butanol** producido por *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 (159 mg/L) y *Candida stellata* RIVE 3-16-1 + *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 (172 mg/L), sobrepasan ampliamente su valor umbral sensorial que es 14.5 mg/L. Por lo tanto, 2-metil-butanol sería el compuesto responsable del acentuado aroma y sabor a disolvente y combustible en las sidras preparadas con estas cepas y bajo estas condiciones.

La producción de alcoholes superiores (**2-metil-propanol + 3-metil-butanol + 2-metil-butanol**) a condiciones aeróbicas fueron mayores que a condiciones anaeróbicas en cultivos puros de *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1, *Hansenula anomala* RIVE 7-1-5, *Saccharomyces ludwigii* RIVE 16-1-5 (436 mg/L, 608 mg/L, 670 mg/L), en cultivos mixtos de *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416/*Candida stellata* RIVE 3-16-1 (755 mg/L), y en cultivos secuenciales de *Candida stellata* RIVE 3-16-1 + *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416, *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1 + *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 (729 mg/L y 509 mg/L), respectivamente. La presencia de altas concentraciones de alcoholes superiores en vinos y sidras no es favorable desde el punto de vista sensorial ya que confieren un sabor y aroma a disolvente o a combustible.

Los cultivos mixtos de *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416/*Candida stellata* RIVE 3-16-1 y *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416/*Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1 en condiciones anaeróbicas manifestaron la mayor producción de **2-feniletanol** (64 mg/L y 58 mg/L). Estos valores obtenidos están dentro del rango umbral sensorial que es desde 25 mg/L a 105 mg/L tal como fué reportado por De Wet, P. 1978 y Simpsom, R. F. 1979; este compuesto (2-feniletanol) es el único alcohol superior deseado en vinos y sidras debido a que confiere un aroma floral.

La producción de **etil acetato** en condiciones anaeróbicas fué la mayor en cultivos puros con *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1 (196 mg/L), su concentración usualmente excede el nivel sensorial umbral de aroma (12,3 mg/L).¹³⁰ Etil acetato

es uno de las sustancias de mayor significancia sensorial, a altas concentraciones manifiesta un aroma y sabor astringente y penetrante, mientras que a bajas concentraciones confiere un aroma frutal y contribuye en la exquisitez de la bebida. Los datos de etil acetato producidos están dentro del rango de aceptación tal como fué manifestado por Maarse, H. y Visscher, C. 1991; quienes sostuvieron que concentraciones de etil acetato entre 75 mg/L y 200 mg/L tiene características sensoriales favorables.

La mayor producción de **etil acetato** a condiciones aeróbicas fué observado en cultivos puros de *Hansenula anomala* RIVE 7-1-5 (206 mg/L) y en cultivos secuenciales de *Candida stellata* RIVE 3-16-1 + *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 (243 mg/L) y la menor producción fué observado en cultivos puros de *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 (75 mg/L) y en cultivos mixtos de *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416/*Candida stellata* RIVE 3-16-1 (64 mg/L).

La menor producción de **ácido acético** en condiciones anaeróbicas fué observado en cultivos puros de *Candida stellata* RIVE 3-16-1 (150 mg/L) y en cultivos secuenciales de *Candida stellata* RIVE 3-16-1+ *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 (126 mg/L), mientras que los mayores valores fueron encontrados en cultivos puros de *Saccharomycodes ludwigii* RIVE 16-1-5 (303 mg/L), en cultivos mixtos de *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416/*Brettanomyces intermedius* RIVE 2-2-2 (333 mg/L). El ácido acético es una sustancia no deseada durante el proceso de fermentación debido a que incrementa la acidez volátil de las bebidas fermentadas.

La mayor producción de ácido acético a condiciones aeróbicas fué observado en cultivos puros de *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1 (222 mg/L); pero en general la producción fué menor en todos los cultivos a condiciones anaeróbicas.

Para efectos de comparación Picinelli, A. y col. 2000, analizaron las diferentes concentraciones de compuestos volátiles en sidras de Asturias; de estos resultados podemos resumir que las fermentaciones anaeróbicas con cepas de *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-16, *Candida stellata* RIVE 3-16-1 y *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1 podrían ser monitoreadas para obtener un perfil comparable a los de la **tabla No. 19**.

TABLA No. 19

**COMPUESTOS VOLATILES MAYORITARIOS EN SIDRA DE ASTURIAS
(mg/L)**

Estación de consumo		Etil acetato	1-propanol	1-butanol	Alcoholes amílicos	2-feniletanol
1995 (n=18)	Promedio	99.9	30.0	4.8	152.5	NA
	SD	40.8	19.0	0.8	33.2	NA
	Max	222.0	69.5	5.8	213.7	NA
	Min	53.2	9.2	3.2	98.5	NA
1996 (n=31)	Promedio	108.1	19.5	7.4	181.5	99.1
	SD	46.2	12.7	5.2	63.6	45.7
	Max	203.1	71.4	30.0	290.8	188.7
	Min	40.7	7.3	1.6	72.3	29.6
1997 (n=25)	Promedio	55.7	12.4	3.5	120.6	68.0
	SD	28.8	9.6	2.8	36.2	21.3
	Max	140.8	35.6	6.9	226.3	122.6
	Min	17.3	ND	ND	64.8	36.6
1998 (n=20)	Promedio	114.6	27.3	6.1	173.0	131.5
	SD	35.5	13.0	0.7	41.1	55.3
	Max	206.4	64.4	7.2	264.8	243.8
	Min	78.4	9.1	4.9	122.3	35.8

ND = no detectado, NA = no analizado

Fuente: Picinelli, A. y col. 2000.

Consideraciones Finales en la Elaboración de Sidra

Uno de los problemas que se debe afrontar son los cambios en el contenido de sustancias de importancia sensorial durante la fermentación. Sin duda, hay cambios que conllevan no solamente a un incremento de algunas sustancias sensoriales benéficas, sino también su reducción por transformación en sustancias sensoriales negativas ó sensorialmente neutrales.

Para la elaboración de sidra recomendaría usar la microflora natural de la manzana, pero sería más beneficioso el enriquecimiento con un cultivo mixto conocido. El jugo de manzana después del prensado podría fermentar a una tasa baja de aereación por un tiempo corto (1 – 2 días) con cultivos mixtos de cepas recomendadas como (*Candida stellata*) con la finalidad de incrementar la concentración de glicerol. Seguidamente, el proceso continuaría con una fermentación anaeróbica llevado a cabo por cepas de *Saccharomyces cerevisiae* como un cultivo preparado mixto ó secuencial. La protección de la fermentación con la adición de sulfito tiene un efecto antimicrobiano sobre la selección de levaduras.

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

- El etanol afecta el crecimiento celular prolongando la fase lag y en otros casos inhibiendo el crecimiento a concentraciones de etanol mayores que 4.0 % v/v presente en el medio de cultivo, como fué observado en cepas de *Brettanomyces intermedius* RIVE 2-2-2, *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1 y *Candida stellata* RIVE 3-16-1. Por el contrario, las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416, *Saccharomycodes ludwigii* RIVE 16-1-5 e incluso *Hansenula anomala* RIVE 7-1-5 mostraron buen crecimiento aeróbico a concentraciones de etanol de 2.0 % v/v, 4.0 % v/v, 6.0 % v/v en el medio de cultivo

- Desde el punto de vista de tolerancia al etanol en condiciones aeróbicas se encontró que las mejores cepas son las siguientes:
 - *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416
 - *Candida stellata* RIVE 3-16-1
 - *Saccharomycodes ludwigii* RIVE 16-1-5

- Desde el punto de vista de tolerancia al etanol a condiciones anaeróbicas se encontró que las mejores cepas son las siguientes:
 - *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416

- *Saccharomyces ludwigii* RIVE 16-1-5
 - *Candida stellata* RIVE 3-16-1
- Desde el punto de vista de tolerancia al SO₂ en condiciones anaeróbicas se encontró que las mejores cepas son las siguientes:
- *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416
 - *Saccharomyces ludwigii* RIVE 16-1-5
- Desde el punto de vista de tolerancia al SO₂ en condiciones aeróbicas se encontró que las mejores cepas son las siguientes:
- *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416
 - *Saccharomyces ludwigii* RIVE 16-1-5
- La alta producción de **glicerol** por *Candida stellata* RIVE 3-16-1 a condiciones anaeróbicas es una de las más importantes conclusiones de este estudio por que ésta cepa podría ser usada en la primera fase de la fermentación para incrementar el nivel de glicerol en sidras.
- La levaduras apiculatas tales como *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1 podrían ser usadas en la primera etapa de la fermentación para la elaboración de sidra ya que son altos productores de etil acetato y bajos productores de 1-propanol.

- En condiciones anaeróbicas *Saccharomyces ludwigii* RIVE 16-1-5 tiene un comportamiento similar a *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 pero, esta cepa sería de menos interés para aplicaciones prácticas a causa de la baja producción de etanol comparado con *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416.
- Las fermentaciones anaeróbicas realizados por cultivos secuenciales de *Candida stellata* RIVE 3-16-1, *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1 y *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416, mostraron características favorables ya que produjeron concentraciones de **alcoholes superiores y etil acetato** los cuales están dentro de los valores umbrales de los compuestos volátiles encontrados en vinos.
- Desde el punto de vista de baja producción de alcoholes superiores las siguientes cepas de levaduras y métodos de fermentación serían recomendados:
 - Fermentación anaeróbica con cultivos puros de *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1
 - Fermentación anaeróbica con cultivos mixtos de *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 y *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1
 - Fermentación anaeróbica con cultivos secuenciales de *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1 con *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416

- La aereación intensa incrementa la síntesis de alcoholes superiores, esto no sería favorable en elaboración de sidra. Las cepas y métodos recomendados serían: *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 en cultivo puro y *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 con *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1 en cultivo mixto
- Desde el punto de vista de producción de etil acetato, se recomienda las siguientes cepas de levadura y métodos de fermentación:
 - Fermentación anaeróbica con cultivos puros de *Hansenula anomala* RIVE 7-1-5 y *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1
 - Fermentación anaeróbica con cultivos mixtos de *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 y *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1
 - Fermentación anaeróbica con cultivos secuenciales de *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1 y *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416
 - La aereación intensa incrementa la síntesis de etil acetato, esto no sería favorable en la elaboración de sidra. Las cepas y métodos recomendados serían: cultivos puros de *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 y *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1, cultivo mixto de *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 con *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1
- Desde el punto de vista de producción de glicerol, el cual tiene un gusto dulce y a altas concentraciones confiere suavidad a las bebidas, las cepas y métodos recomendados serían:

- Fermentación anaeróbica con cultivos puros de *Candida stellata* RIVE 3-16-1
 - Fermentación anaeróbica con cultivos mixtos y secuenciales de *Candida stellata* RIVE 3-16-1 y *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416.
-
- En el proceso de elaboración de sidra se requieren temperaturas bajas de fermentación (16 – 18 °C) la mejor cepa encontrada para este proceso sería *Candida stellata* RIVE 3-16-1, ya que en cultivo puro produjo alta concentración de etanol y glicerol, además produjo bajas cantidades de ácido acético. Por otra parte en cultivos secuenciales con *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416 se incrementa la concentración de glicerol, lo que sería una característica favorable.
 - *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1 produjo bajas cantidades de etanol, considerables cantidades de glicerol y altas cantidades de etil acetato. Esta cepa podría ser usado para preparar sidras con sabor y aroma particulares, también podría usarse en cultivos secuenciales con *Saccharomyces cerevisiae* 15-1-416 para incrementar la concentración de etanol en bebidas alcohólicas.
 - *Brettanomyces intermedius* RIVE 2-2-2 no sería de mucho interés para nuestro propósito ya que produjo baja cantidad de etanol y cantidades considerables de ácido acético.

- Las concentraciones normales de etanol encontradas en sidras (Ver apéndice, **tabla No. 21**) son del orden de 5 % v/v, desde este punto de vista, tenemos que tomar en cuenta que ésta cantidad de etanol podría ser producido por levaduras *no-Saccharomyces* no deseadas, encontradas comúnmente en la microflora del jugo de manzana. Estos microorganismos podrían realizar una fermentación completa alcanzando niveles de etanol inclusive mayores a 5% v/v, tal es el caso de *Saccharomyces ludwigii* RIVE 16-1-5.

- Comparando la composición y concentración de compuestos aromáticos de jugo de manzana (Ver apéndice, **tabla No. 22**) con los datos obtenidos en cada fermentación, podemos decir que el mayor contenido de estos compuestos volátiles en sidras son producidos por levaduras durante la fermentación. La concentración de estos compuestos volátiles en el jugo de manzana depende del tipo de extracción usado, variedad de manzana y el grado de madurez.

- Etil acetato en bajas concentraciones (50 – 80 mg/L) contribuye positivamente al perfil sensorial y concentraciones sobre 200.0 mg/L, tiene una influencia negativa en la percepción sensorial.¹²⁹ En todos los resultados, la cepa de *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1 mostró ser un buen productor de etil acetato, y ésta característica afectaría negativamente el

aroma y sabor de la sidra si no se controla su producción durante la fermentación.

- Para aplicaciones prácticas de fermentaciones con cultivos mixtos y secuenciales en elaboración de sidra, es necesario optimizar la manera de aplicación integrada de *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416, *Candida stellata* RIVE 3-16-1 y *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1.

- Las conclusiones importantes para el proceso de elaboración de sidra son: Controlar la aereación del jugo de manzana y utilizar cepas de levaduras adecuadas de actividad metabólica conocida (cepas de *Saccharomyces cerevisiae* RIVE 15-1-416, *Candida stellata* RIVE 3-16-1, *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1), se puede controlar los ratios entre azúcares, alcoholes (etanol, glicerol y presumiblemente alcoholes superiores), ácidos orgánicos y ésteres de tal manera que se pueda obtener un adecuado carácter sensorial de la sidra. Es importante determinar cuanto tiempo se debería dejar fermentar aeróbicamente la sidra para conseguir una exitosa fermentación, así como un producto final de calidad sensorial.

CAPITULO VIII

RECOMENDACIONES

- Los procesos de elaboración de sidra no se diferencian en mucho de los procesos de elaboración de vinos, en todo caso se recomienda que al usar cepas de levadura *Saccharomyces* o no-*Saccharomyces* se elijan aquellas cepas que presenten una alta producción de etanol, un perfil definido de formación de ésteres y alcoholes superiores y baja producción de ácidos orgánicos.
- Antes de realizar el proceso de fermentación es necesario tener en cuenta el contenido de fuente de nitrógeno (amonio) del mosto ya que de ello depende una exitosa fermentación. La adición de peptona como fuente de nitrógeno no sería recomendable por que incrementaría la síntesis de alcoholes superiores.
- En las fermentaciones con cultivos puros inoculados se recomienda tratar anteriormente el mosto con sulfito para eliminar o disminuir la carga de microorganismos no deseables que puedan influenciar durante la fermentación. La cantidad de sulfito a añadirse esta en función del pH inicial de fermentación que en el caso de la sidra debería ser de 3.5 – 4.0.

- Durante la fermentación es recomendable airear intermitentemente el medio con la finalidad de incorporar oxígeno y revitalizar las células de levadura e inducir a la síntesis de esteroides y ácidos grasos insaturados de la membrana celular para favorecer la resistencia y tolerancia a los metabolitos inhibidores producidos durante la fermentación como el etanol y el ácido acético.
- Se debe tener en cuenta que una fermentación en completa aerobiosis conlleva a la formación excesiva de ésteres y alcoholes superiores. Del mismo modo las fermentaciones a temperaturas elevadas inducen a una producción incrementada de estos compuestos.
- Por otro lado una fermentación en completa anaerobiosis o con cultivos que no han sido precultivados pueden conllevar a una fermentación perezosa o incompleta y resultar en un producto de baja calidad y con aromas indeseables.
- Para la producción de sidra, se recomienda realizar la fermentación a temperaturas inferiores a 18 °C. La cepa *Candida stellata* RIVE 3-16-1 muestra buenas características fermentativas a temperaturas bajas y podría ser usada para los procesos de fermentación de bebidas con bajo contenido de alcohol.

- Para mejorar el perfil de aroma y sabor de bebidas alcohólicas se propone utilizar cultivos mixtos o secuenciales con cepas de *Kloeckera apiculata* RIVE 9-2-1 y *Candida stellata* RIVE 3-16-1 y *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* RIVE 15-1-416.

CAPITULO IX

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Lafon-Lafourcade, S. y Ribéreau-Gayon, P. Desarrollos en la microbiología de producción de vino., 1984. Revista: Prog. Indust. Microbiol. Vol. 19, p. 1-45.
- 2 Vezinhet, F. y Pineau, J. La levadura. 1990. Revista: Progrés Agricole et Viticole. Vol. 107, p. 219-221.
- 3 Kocková-Kratochvilová, A. Levaduras y microorganismos relacionados. Bratislava: Ed. Alfa, 1982.
- 4 Rose, A. H. y Harrison, J. S. Biología de la levadura. En: La levadura, 2da. ed. Vol. I., Londres: Ed. Academic Press, 1987.
- 5 Šilhanková, L. Microbiología de alimentos y biotecnología. Praga: Ed. Victoria publishing, 1995, p. 57- 83.
- 6 Barnett, J. A. La taxonomía del género *Saccharomyces* Meyen ex Reess: una breve revisión para no- taxonomistas., 1992. Revista: Levaduras Vol. 8, p. 1-23.
- 7 Agencia Japonesa Internacional de cooperación. Boletín de métodos y pruebas para clasificación e identificación de levaduras. Vol. I. Universidad del Callao, 1982.
- 8 Barnett, J. A., Payne, R. W. y Yarrow, D. Levaduras, Caracterización e identificación, 3ra. ed. Cambridge: Ed. Cambridge Press, 1990.
- 9 Barnett, J. A., Payne, R. W. y Yarrow, D. Levaduras: Caracterización e identificación, 2da. ed. Cambridge: Ed. Cambridge Press. 1990.

- 9 Barnett, J. A., Payne, R. W. y Yarrow, D. Levaduras: Caracterización e identificación, 2ª. ed. Cambridge: Ed. Cambridge Press. 1990.
- 10 Spencer, J. F. K. y Spencer, D. M. Las levaduras en habitats naturales y artificiales. Berlin: Ed. Springer.1997.
- 11 Kappeli, O. Regulación del metabolismo de carbono en *Saccharomyces cerevisiae* y levaduras relacionadas., 1986. Revista: Adv. Microbiol. Physiol. Vol. 28, p. 181-209.
- 12 Van Urk, H., Bruinenberg, P. M., Veenhuis, M., Scheffers, W. A. y Van Dijken, J. P. Capacidad respiratoria mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 y *Candida utilis* CBS 621 crecidos bajo limitación de glucosa., 1989. Revista: Antonie van Leeuwenhoek. Vol. 56, p. 211-220.
- 13 Petrik, M., Kappeli, O. y Fiechter, A. Un concepto amplio sobre el efecto de glucosa en levaduras *Saccharomyces uvarum*, relación de un termino amplio y simple de regulación., 1983. Revista: Gen. Microbiol. Vol. 129, p. 42-49.
- 14 De Deken, R. H. El efecto Crabtree: Un sistema regulatorio en levaduras., 1966. Revista: Gen. Microbiol. Vol. 44, p. 149-156.
- 15 Van Dijken, J. P. y Scheffers, W. A. Balance redox en el metabolismo de azúcares por levaduras., 1986. Revista: FEMS Microbiol. Rev. Vol. 32, p. 199-224.
- 16 Pronk, J. T., Wenzel, T. J., Luttk, M. A., Klaassen, C. M., Scheffers, W. A., Steensma, H. Y. y Van Dijken, J. P. Aspectos energéticos del metabolismo de glucosa en un mutante piruvato-dehidrogenasa negativo

- de *Saccharomyces cerevisiae*.; 1994. Revista: Microbiology Vol. 140, p. 601-610.
- 17 Verduyn, C. Fisiología de levaduras en relación al rendimiento del crecimiento., 1991. Revista: Antonie van Leeuwenhoek. Vol. 60, p. 325-353.
- 18 Bisson, L. F. Metabolismo de azúcares por levaduras, en la microbiología y biotecnología del vino. Chur, Suiza: Ed. Harwood Academic Publishers, 1993, p. 55-75.
- 19 Flores, C. L., Rodriguez, C., Petit, T. y Gancedo, C. Rendimiento de energía en el metabolismo de carbohidratos en levaduras no convencionales., 2000. Revista: FEMS Microbiol. Rev. Vol. 24, p. 507-529.
- 20 Sa-Correia, I., y Van Uden, N. Perfiles de temperaturas en la tolerancia al etanol: Efectos del etanol sobre la temperatura máxima y mínima de crecimiento en *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces fragilis*., 1983. Revista: Biotech. Bioeng. Vol. 25, p. 1665-1667.
- 21 La Rue, F., Lafon-Lafourcade, S. y Ribereau-Gayon P., 1980. Revista: Appl. Env. Microbiol. Vol. 39, p. 808-811.
- 22 Nagodawithana, T. W., Whitt, J. T. y Cutaia, A. J. Estudio del efecto de retroalimentación de etanol sobre enzimas seleccionadas de la vía glucólica., 1977. Revista Americana: Soc. Brew. Chem. Vol. 35, p. 179-193.
- 23 Navarro, J. M. y Finck, J. O., 1982. Revista: Cell. Molec. Biol. Vol. 28, p. 85-89.

- 24 Nagodawithana, T. W., y K. Steinkraus. Influencia de la tasa de producción y acumulación de etanol sobre la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* en fermentación rápida., 1976. Revista: Appl. Environ. Microbiol. Vol. 31, p. 158-162.
- 25 Novak, M., P. Strehaiano, M. Morena, y G. Goma. Fermentación alcohólica: Sobre el efecto inhibitorio del etanol., 1981. Revista: Biotech. Bioeng. Vol. 23, p. 201-211.
- 26 Prasad, R., y H. Rose. Relación de los lípidos en el transporte de solutos., 1986. Revista: Levaduras. Vol 2, p. 205-220.
- 27 Navarro, J. M. y Durand, G., 1978. Revista: Ann. Microbiol. (Instituto Pasteur, 1926), p. 215-224.
- 28 Beech, W. F. Levaduras en la elaboración de sidra. En: La levadura, 2ª. ed. Vol. V. Rose, A.H. y Harrison, J.S. Londres: Ed. Academic Press, 1987.
- 29 Pampulha, M. E. y Loureiro-Dias, M. C., 1990. Revista: Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol. 34, p. 375-380.
- 30 Beech, F. W. Reporte anual de la estación de investigación Long Ashton para 1952: 125. Londres, 1953.
- 31 Beech, F. W., 1972b. Revista del instituto de cervecería. Vol. 78, p. 477.
- 32 Beech, F.W., Burroughs, L.F., Timberlake, C.F. y Whiting, G.C. Progresos actuales en los aspectos químicos y efectos antimicrobiales de dióxido de azufre (SO₂). Boletín de la O.I.V., 1979. Vol. 52, p. 1001-1022.

- 33 Reed, G. y Peppler, H. J. Tecnología de levaduras; AVI Publishing Co.: Westport, Connecticut, 1973, p. 366.
- 34 Hammond, S. M. y Carr, J. G. Actividad antimicrobial de SO₂ con referencia particular a jugos de fruta fermentados y no fermentados. En: Inhibición e inactivación de microbios vegetativos, (editado por F. A. Skinner y W. B. Hugo). Londres: Ed. Academic Press, 1976, p. 89-110.
- 35 Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B. y Lonvaud, A. Bioquímica de la fermentación alcohólica y vías metabólicas de levaduras vineras: En: Manual de enología. Vol. I: "La microbiología del vino y vinificaciones". Paris, Dunod. Ed. John Wiley & Sons Ltd. Eds., 2000, p. 51-74.
- 36 Spencer, J. F. T. y Spencer, D. M. Tecnología de levaduras. 1ra. ed. Capítulo IV. Berlin: Ed. Springer-Verlag, 1990.
- 37 Gao, C. y Fleet, G. H. Efecto de la temperatura y el pH en la tolerancia al etanol en levaduras vineras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* y *Kloeckera apiculata*., 1988. Revista: Applied Bacteriology Vol. 65, p. 405-410.
- 38 Willetts, J. C., Seward, R., Dinsdale, M. G. y Lloyd, D. Vitalidad de levaduras sidreras crecidas micro-aeróbicamente con adición de etanol, 1-butanol o isobutanol., 1997. Revista: Inst. Brew. Vol. 103, p. 79-84.
- 39 Fleet, G. H. y Heard. G. M. Crecimiento de levaduras durante la fermentación. En: Microbiología y biotecnología del vino. G.H. Fleet, eds. Suiza: Ed. Harwood Academic Pub., 1990, p. 27-75

- 40 Kappeli, O. Regulación del metabolismo de carbono en *Saccharomyces cerevisiae* y otras levaduras relacionadas., 1986. Revista: Adv. Microb. Physiol. Vol. 28, p. 181-209.
- 41 Nordstrom, K. Formación de etil acetato en la fermentación con levaduras cerveceras III. Participación del coenzima A., 1962. Revista: Inst. Brew. Vol. 68, p. 398-407.
- 42 Malcorps, P., Cheval, J. M., Jamil. S. y Dufour, J. P. Un nuevo modelo para la regulación de la síntesis de éster por la alcohol acetiltransferasa en *Saccharomyces cerevisiae* durante fermentación, 1991. Revista Americana: Soc. Brewing Chem. Vol. 49, p. 47-53.
- 43 Minetoki, T. Alcohol acetiltransferasa en levaduras saké., 1992. Revista: Brew. Soc. Japan. Vol. 87, p. 334-340.
- 44 Yoshioka, H. y Hashimoto, N. Formación de éster por a alcohol acetil transferasa en levaduras cerveceras., 1981. Revista: Agric. Biol. Chem. Vol. 45, p. 2183-2190.
- 45 Suomalainen, H. Esterasas de levadura y ésteres de aroma en bebidas alcohólicas., 1981. Revista: Inst. Brew. Vol. 87, p. 296-300.
- 46 Berry, D. R. y Watson, D. C. Producción de compuestos organolépticos. En: Biotecnología de levaduras. Berry, D.R., Russell, I. y Stewart, G.G. eds. Londres: Ed. Allen y Unwin, 1991.
- 47 Paterson, A. y Piggott, J. R. La contribución del proceso de formación de aroma en Whisky Escocés. En: Aroma de bebidas destiladas. Piggot, J. R. y Paterson, A. eds. Chichester: Ed. Ellis Horwood Ltd., 1989.

- 48 Ouchi, K., Yamamoto, Y., Takagishi, M., y Akiyama, H. Regulación de la formación de isoamil alcohol a través de la vía Ehrlich en *Saccharomyces cerevisiae*., 1980. Revista: Ferment. Technol. Vol. 58, p. 301-309.
- 49 Mangas, J. J., Cabranes, C., Moreno, J. y Gomis, D.B. Influencia de la tecnología de elaboración de sidra sobre el sabor y aroma de la sidra., 1994. Revista: Lebensmittel und Wissenschaft Technology. Vol. 27, p. 583-586.
- 50 Ribereau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribereau-Gayon, J., y Sudraud, P. Tratado de enología: Sciences et techniques du vin. Paris: Dunod, 1975.
- 51 Ribereau-Gayon, P., y Sudraud, P. Tecnología enológica moderna. Brescia: Edizione AEB., 1991, p. 157.
- 52 Beech, F.W., y Carr, J.G. Cidra y vino de pera. En A. H. Rose, Bebidas alcohólicas. Londres: Ed. Academic press, 1977, p. 139-293.
- 53 Mauricio, J. C., Moreno, J., Zea, L., Ortega, J.M., y Medina, M. Efectos de las condiciones de fermentación de mosto de uva sobre los alcoholes volátiles y ésteres., 1997. Revista: Science of Food and Agriculture. Vol. 75, p. 155-160.
- 54 Gomis, D. B., Gutierrez, M. D. y Moran, M. J. Control analítico de la producción de sidra por dos métodos tecnológicos., 1991. Revista del Instituto de cervecaría. Vol. 97(6), p. 453-456.
- 55 Leguerinel, I., Mafart, P., Cleret, J. J. y Burgeois, C. Cepas de levadura y aspectos cinéticos de la formación de componentes de aroma en sidra., 1989. Revista del Instituto de cervecaría. Vol. 95(6), p. 405-409.

- 56 Van Dijken, J. P. y Scheffers, W. A. Balance redox en el metabolismo de azúcares de levaduras., 1986. Revista: FEMS Microbiol. Rev. Vol. 32, p: 199-224.
- 57 Paltauf, F., Kohlwein, S. D. y Henry, S. A. Regulación y compartimentalización de síntesis de lípidos en levaduras. En: Biología molecular y celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Eds: Jones, E.W., Pringle, J.R y Broach, J.R.). Cold spring Harbor: Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York. Vol. II, 1992. p. 415-500.
- 58 Michnick, S., Roustan, J.-L., Remize, F., Barre, P. y Dequin, S. Modulación de los rendimientos de glicerol y etanol durante la fermentación alcohólica en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* sobre-expresado o afectados por GPD1 codificando la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa., 1997. Revista: Levaduras Vol. 13, p. 783-793.
- 59 Blonberg, A. y Adler, L. Fisiología de hongos osmotolerantes., 1992. Revista: Adv. Microbiol. Physiol. Vol. 33, p. 145-212.
- 60 Barnett, J. A., Payne, R. W. y Yarrow, D.Y. Levaduras: Características e identificación. Cambridge: Ed. Universidad de Cambridge Press, 1983.
- 61 Rehm, H. J. Producción microbial de glicerol y otros polioles. En: Biotecnología, Vol. VIb (Eds. Rehm, H.J. y Reed, G.). Weinheim, Alemania, 1988, p. 52-69
- 62 Verduyn, C., Zomerdijk, P. L. L., van Dijken, J. P. y Scheffers, W. A. Medición continua con un electrodo de enzima de la producción de etanol

- por levaduras aeróbicas en suspensión., 1984. Revista: Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol. 19, p. 181-185.
- 63 Xie, D. M., Liu, D. H. y Liu, T. Z. Modelos de cinética macroscópica de fermentación batch de glicerol con levaduras osmotolerantes., 2000. Revista de: Chemical Industry and Engineering (China). Vol. 51, p. 2000.
- 64 Park, S. K. y Noble, A. C. Glucósidos de monoterpeno y monoterpenos en aromas de vino. En: Symposium ACS series sobre producción de cerveza y vino. Análisis, caracterización y avances tecnológicos. Eds. Gump BH, Pruett DJ. Sociedad Americana de Química. Washington DC., 1993, Vol. 536, p. 99-109.
- 65 King, A. y Dickinson, R. Biotransformación de monoterpenos por *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulospira delbrueckii* y *Kluyveromyces lactis*., 2000. Revista: Levaduras Vol. 16, p. 499-506.
- 66 Rowles, K. Análisis de mercado de productos de manzana: Sidra hard y vino de manzana, Staff Paper. Departamento de Agricultura, Fuentes y Directivas Económicas. Universidad Cornell, Ithaca. Nueva Cork. 2000.
- 67 Correnty, P. El arte de la elaboración de sidra. Publicaciones Brewers, Inglaterra, 1999.
- 68 Charles Mc, Gonegal. Sidra hard desde la perspectiva de un nuevo productor. En: Frutas de Gran Lago. Exposición de vegetales y productos agrícolas. Centro de convención "Grand Rapids". Miami, 2003.

- 69 Mohr, W. P. Variedades de manzana para jugo y producción de sidra. Boletín técnico de agricultura canadiense 1988-6E. Boletín técnico smithfield N°. 7. Trenton, Ontario, 1988.
- 70 Williams, R. R. Sidra y jugo de manzana – Cultivo y procesamiento. Estación de Investigación Long Ashton, Universidad de Bristol, 1988.
- 71 Beech, F. W. y Davenport, R. R. El rol de levaduras en la elaboración de sidra. En: “Levaduras” (1ra. ed.) Vol. III. Tecnología de Levaduras, ed. Rose A.H. y Harrison J.S. Londres: Ed. Academic Press, 1970, p. 73 - 146.
- 72 Chang, Y. Lee. y Mattick, L. R. Composición y valor nutritivo de productos de manzana. En: Productos de manzana procesados. Downing, D.L., ed. Donald, L.D. Nueva York: Ed. Van Nostrand Reinhold Pub., 1989.
- 73 Lea, A. G. H. y Arnold G. M. Compuestos fenólicos en sidras – acidez y astringencia., 1978. Revista. Sci. Food Agric. Vol. 29, p. 478 – 483.
- 74 Comité Consultivo de Sidra. Lista revisada de variedades recomendadas de manzanas sidreras., *Reporte del comité consultivo*. Instituto de investigación Long Ashton, Bristol, 1956, p. 45-47.
- 75 Lea, A. G. H. El Color y tanino de manzanas sidreras Inglesas., 1984. Revista: Flüssiges Obst. Vol. 51, p. 356 – 361.
- 76 Lea, A. G. H. y Arnold G. M. Compuestos fenólicos en sidras – acidez y astringencia., 1978. Revista. Sci. Food Agric. Vol. 29, p. 478 – 483.
- 77 Williams, R. R. y Child, R. D. Identificación de manzanas sidreras. En:

- Reporte anual de la estación de Investigación Long Ashton para 1965.
Bristol – Reino Unido, 1965, p. 71-89.
- 78 Williams, R. R. Cultivo de variedades sidreras. Londres: Ed. Bulmer's
Pomona. Fourth Estate Ltd., 1987.
- 79 Beech, F. W. Revisión de la elaboración de sidra e investigación en sidra.,
1972
b. Revista: Inst Brewing. Vol. 78, p. 477.
- 80 Beech, F. W. Tecnología de elaboración de sidra. Microbiología y
Bioquímica.
En: Progresos en microbiología industrial. Churchill Livingstone, Londres:
Ed. Hockenhull D. J. D, 1972a, p. 133 - 213.
- 81 Beech, F. W. y Carr, J. G. Sidra y vino de peras. En: Microbiología
económica, Vol. I. Bebidas alcohólicas., ed. Rose A. H. Londres: Ed.
Academic Press, 1977, p. 139-313.
- 82 Lea, A. G. H. Jugo de manzana. En: Producción y empaquetamiento de
jugos de fruta no-carbonadas y bebidas de Fruta (2ª ed.). Blackie,
Glasgow: Ed. Ashurst P.R., 1994.
- 83 Willetts, J. C., Seward, R., Dinsdale, M. G. y Lloyd, D. Vitalidad de
levaduras sidreras crecidas micro-aeróbicamente con adición de etanol, 1-
butanol o isobutanol., 1997. Revista: Inst. Brew. Vol. 103, p. 79-84.
- 84 Beech, F. W., Burroughs, L. F., Timberlake, C. F. y Whiting, G. C.
Progresos actuales en los aspectos bioquímicos y efectos antimicrobiales

- de dióxido de azufre (SO₂). Boletín de la O.I.V., 1979. Vol. 52, p. 1001-1022.
- 85 Mangas, J. J., Moreno, J., Picinelli, A. y Blanco, D. Caracterización de manzanas sidreras según su grado de madurez., 1998. Revista: Agric. Food Chem. Vol. 46, p. 4174-4178.
- 86 Williams, A. A. Efectos de aroma y sabor de etanol en bebidas alcohólicas., 1972. Revista: Industria de Aromas y sabores., p. 604-607.
- 87 Cabranes, C., Moreno, J. y Mangas, J. J. Aspectos microbiológicos y bioquímicos de elaboración de sidra en bodegas de Asturia., 1991. Revista: Alimentaria., p. 63-69.
- 88 Serie de Datos de ASTM: Atlas de perfiles de carácter de aroma y sabor. ASTM Data Series DS 61; Sociedad Americana para degustación de materiales: Filadelfia, U.S.A, 1985.
- 89 Giudici, P., Zambonelli, C. y Kunkee, R. E. Producción incrementada de n-propanol en vino por cepas de levadura que tienen habilidad impareada para formar sulfuro de hidrógeno., 1993. Revista Americana: Enol. Vític. Vol. 44, p. 17-21.
- 90 Mangas, J. J., Moreno, J., Rodriguez, R., Picinelli, A. y Suarez, B. Análisis de polisacáridos en sidras. Su efecto sobre las propiedades sensoriales de espuma., 1999. Revista: Agric. Food Chem. Vol. 1, p. 152-156.
- 91 Plestenjak, A., Hribar, J., Vidrih, R. y Simcic, M. Fecha óptima de cosecha y calidad de manzanas post-almacenadas., 1994. Revista: Acta Horticulturae. Vol. 368, p. 641-645.

- 92 Schreier, P., Drawert, F., Steiger, G. y Mick, W. Efecto del tratamiento con enzimas de la pulpa de manzana con una pectinasa comercial y celulasa sobre los volátiles del jugo., 1978. Revista: Food Sci. Vol. 43, p. 1797-1800.
- 93 Beech, F. W. Tesis Ph.D.: Universidad de Bristol, Bristol, 1957.
- 94 Beech, F. W. y Carr, J. G., 1960. Revista: Science of Food and Agriculture Vol. 11, p. 35.
- 95 Downing, D. L. Manzanas sidreras. En: Productos procesados de manzana., ed. Donald, L.D. Nueva York: Ed. Van Nostrand Reinhold Pub. U.S.A., 1988.
- 96 Fleet, G. H., Lafon-Lafourcade, S. y Ribereau-Gayon, P., 1984. Revista: Appl. Environ. Microb. Vol. 48, p. 1034-1038.
- 97 Fleet, G. H. y Heard, G. M. Crecimiento de levaduras durante la fermentación. En: Microbiología y biotecnología del vino., ed. G.H. Fleet. Suiza: Ed. Harwood Academic Publisher. 1990, p. 27-75.
- 98 Granchi, L., Ganucci, D., Messini, A., Rosellini, D. y Vincenzini, M. Dinámicas de la población de levaduras durante la etapa temprana de fermentación natural en la producción de vinos Brunello di Moltalcino., 1988. Revista: Food Technol. Biotechnol. Vol. 36, p. 313-318.
- 99 Heard, G. M. y Fleet, G. H. Crecimiento de la flora natural de levaduras durante la fermentación de vinos inoculados., 1985. Revista: Appl. Environ. Microbiol. Vol. 50, p. 727-728.

- 100 Romano, P., Marchese, R., Laurita, C., Salzano, G. y Turbanti, L. Disponibilidad biotecnológica de *Saccharomyces ludwigii* para bebidas fermentadas., 1999. Revista mundial: Microbiol. Biotechnol. Vol. 15, p. 451-545.
- 101 Como es elaborado la sidra. Hipervínculo: http://www.history-of-cider.com/html/how_cider_is_made.html.
- 102 Holz-Clause, M. Perfil de la industria de la sidra hard. Centro de recursos de mercado agrícola, Universidad Estatal de Iowa, U.S.A., Noviembre 2003.
- 103 Vogel, W. Producimos vinos de casa. Stuttgart: Ed. Eugen Ulmer GmbH&Co., Stuttgart, 1998.
- 104 Ingledew, W. M. y Kunkee, R. Factores que influncian en las fermentaciones perezosas de mosto de uva., 1985. Revista Americana: Enol Vitic. Vol. 36, p. 65-76.
- 105 Salmon, J. M. Efecto de la inactivación del transporte de azúcar en fermentaciones enológicas perezosas o truncadas., 1989. Revista: Appl. Environ. Microbiol. Vol. 55, p. 953-958.
- 106 Jiranek, V, Langridge, P. y Henschke, P. A. Utilización de aminoácidos y amonio por levaduras vineras de *Saccharomyces cerevisiae* en un medio químicamente definido., 1995. Revista Americana: Enol Vitic. Vol. 46, p. 75-83.
- 107 Bely, M., Sablayrolles, J. M. y Barre, P. Detección automática de la deficiencia de nitrógeno asimilable durante la fermentación alcohólica en

- condiciones enológicas., 1990. Revista: *Ferm. Bioeng.* Vol. 70, p. 246–252.
- 108 Monteiro, F. F. y Bisson, L. F. Ensayos biológicos del contenido de nitrógeno en mosto de uva y predicción de una fermentación perezosa., 1991. Revista Americana: *Enol Vitic.* Vol. 42, p. 47–57.
- 109 Scott, R. P. W. Principios y práctica de cromatografía., 1ª. Ed. Chrom-Ed Book Series, Hardcover: Ed. Marcel Dekker Inc. U.S.A., 1986.
- 110 Willard, H., Merritt, L., Dean, J.A. y Settle Jr., F.A. Métodos instrumentales de análisis , 7ma. ed., Londres: Ed. Wadsworth Publishing Co., 1988.
- 111 Robert, H., Louis, S. T. y Herbert, H., Hill, J. R. Métodos cuantitativos y cualitativos de análisis por cromatografía de gas. En: *Cromatografía de gas, aplicaciones bioquímicas, biomédicas, y clínicas.*, ed. Ray E. Clement. Ontario: Ed. John Wiley&sons, 1990.
- 112 Ferrerira, V., Rapp, A., Cacho, J. F., Hastrich, H. y Javas, I. Determinación rápida y cuantitativa de compuestos de aroma en vinos usando micro-extracción con Freon 113., 1993. Revista de *Agricultural Food Chemistry.* Vol. 41, p. 1413-1420.
- 113 Blanch, G. P., Reglero, G. y Herraiz, M. Extracción rápida de compuestos aromáticos en vino usando un aparato nuevo de extracción por destilación simultanea con solvente., 1996. Revista: *Food Chemistry.* Vol. 56 (4), p. 439-444.

- 114 Arthur, C. L. y Pawliszyn, J. Micro-extracción de fase sólida con desorción térmica usando fibras ópticas de silica., 1990. Revista: Anal. Chem. Vol. 62, p. 2145-2148.
- 115 Chatonet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J. N. y Pons, J. El origen de etilfenoles en vinos., 1992. Revista: Sci. Food Agric. Vol. 60, p. 165-178.
- 116 Almeida, A. M., Castel-Branco, M. M. y Falcao, A.C. Regresión lineal para calibración de líneas revisadas: Esquemas de ponderación para métodos bioanalíticos., 2002). Revista de cromatografía B. Vol. 774, p. 215-222.
- 117 Gonzales-Bravo, L., Marrero-Delange, D. y Gonzales-Guevara, J. L. Método de grupo para aproximarse a la estimación de factores de respuesta de sustancias en análisis cuantitativo por cromatografía de gas., 2000. Revista de cromatografía A. Vol. 888, p. 159-173.
- 118 Guichon, G. y Guillermin, C. L. En: Cromatografía de gas cuantitativo., 1988. Revista de: Chromatography Library. Vol. 42, p. 589.
- 119 Petterson, J. y Roerade, J. Precisión cuantitativa en el análisis de cromatografía de mezcla de solventes., 2003. Revista de cromatografía A. Vol. 985, p. 21-27.
- 120 Ma, T. S. y Ladas, Athanasios. S. Análisis de grupo orgánico funcional por cromatografía de gas. Londres: Ed. Academic Press Inc., 1976.
- 121 Novak, J. Análisis cuantitativo por cromatografía de gas, 2ª. Ed. Capitulo III. Series de ciencias cromatográficas. Nueva York: Ed. Marcel Dekker, 1989. Vol. 41, p. 15.

- 122 Knox, J. H. y Kauer, B. Cromatografía líquida de alta performance. Capítulo IV., ed. Brown. P.R. y Hartwick, R.A. Nueva York: Ed. Wiley Interscience, 1989.
- 123 Agencia Internacional de Cooperación. Boletín de métodos y pruebas para clasificación e identificación de levaduras. Vol.II. Universidad Nacional del Callao, 1982.
- 124 Souci, S.W., Fachmann, W. y Kraut, H. Jugos de frutas y bayas. Tablas de composición y nutrición de alimentos. 6ª. ed. Stuttgart: Ed. Scientific publishers, 2000.
- 125 Blazek, J. y colectivo. Las frutas. Mundo agrícola Checo, 1998, p. 4-6, 78-89.
- 126 Phowchinda, O., Delia-Dupuy, M. L. y Strehaiano, P. Efecto del ácido acético sobre el crecimiento y actividad fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae.*, 1995. Revista: Biotech. Letters. Vol. 17, p. 237-242.
- 127 Ortega, C., Lopez, R., Cacho, J. y Ferreira, V. Análisis rápido de los principales compuestos volátiles en vinos. Desarrollo y validación de un nuevo método basado en cromatografía de gas-análisis de detección por ionización de flama de micro-extractos de diclorometano., 2001. Revista de cromatografía A. Vol. 923, p. 205-214.
- 128 Maarse, H. y Visscher, C. A. Compuestos volátiles en bebidas alcohólicas. Instituto de análisis de alimentos TNO-CIVO, Zeist, Holanda, 1991.
- 129 Williams, A. A., Lewis, M. J. y Tucknott, O. G. Componentes neutrales volátiles del jugo de manzana., 1980. Revista: Food Chem. Vol. 6, p. 139.

- 130 De Wet, P. Umbrales de aroma y sabor y sus aplicaciones al estudio de aromas en vinos, 1978. Revista: Proc. S. Afr. Soc. Fenol. Vitic., p. 28 – 42.
- 131 Simpsons, R. F. Composición aromática de vinos blancos añejados en botella., 1979. Revista: Vitis, Vol. 18, p. 148 – 154.
- 132 Picinelli, A., Suarez, B., Moreno, J., Rodríguez, R., Caso-García, L. y Mangas, J. J. Caracterización química de sidras de asturia., 2000. Revista: J. Agric. Food Chem., Vol. 48, p. 3997 – 4002.

APÉNDICE

TABLA No. 20
COMPOSICION QUIMICA DE JUGO DE MANZANA COMERCIAL
 (g/100 gramos de producto)

Constituyentes	dim	promedio	variación
Agua	g	88.1	86.2 – 90.3
Nitrógeno total	g	0.01	--
Proteína (N _x 6.25)	g	0.07	0.06 – 0.08
Carboh. disponible	g	11.1	--
Ácido orga. disponible	g	0.77	--
Etanol	g	0.14	0.05 – 0.27
Minerales y elementos traza			
Minerales	g	0.27	0.22 – 0.33
Na	mg	2.2	0.6 -- 5.0
K	mg	116	90 -- 131
Mg	mg	4.2	3.0 -- 5.4
Ca	mg	6.9	4.0 -- 8.8
Mn	ug	120	50 -- 210
Fe	ug	260	100 -- 390
Co	ug	1.0	1.0 -- 2.0
Cu	ug	59	23 -- 105
Zn	ug	120	70 -- 190
Ni	ug	9.5	8.8 -- 55000
Cr	ug	3.0	0.0 -- 6.0
Mo	ug	--	0.0 -- 1.6
P	mg	7.0	5.2 -- 8.8
Cl	ug	300	300 -- 600
I	ug	1.0	--
Vitaminas			
β-caroteno	ug	45.0	30 -- 60
Vit K	ng	100	--
Vit B1	ug	20	6 -- 40
Vit B2	ug	25	10 -- 50
Nicotinamida	ug	300	100 -- 500

TABLA No. 20
CONTINUACION

Vit B6	ug	96	--
Biotina	ug	1.0	0.4 -- 2.0
Ácido fólico	ug	3.1	1.5 -- 4.0
Vit C	mg	1.4	0.7 -- 2.0
Aminoácidos			
Alanina	mg	3.0	--
Arginina	mg	2.0	--
Ácido aspártico	mg	22	--
Ácido glutámico	mg	7.0	--
Glicina	mg	2.0	--
Isoleucina	mg	2.0	--
Leucina	mg	4.0	--
Metionina	mg	1.0	--
Fenilalanina	mg	2.0	--
Prolina	mg	2.0	--
Serina	mg	3.0	--
Treonina	mg	2.0	--
Valina	mg	3.0	--
Ácidos orgánicos			
Acidez volátil	mg	15	4.0 -- 25
Ácido málico	mg	740	450 -- 970
Ácido cítrico	mg	9.0	5.0 -- 13
Ácido Láctico	mg	17	5 -- 28
Ácido fórmico	mg	2.3	--
Ácido isocítrico	ug	800	--
Azúcares			
Glucosa	mg	2400	1700 -- 3000
Fructosa	mg	6400	5100 -- 7700
Sucrosa	mg	1700	1200 -- 2300
Pectina	mg	32	2 -- 76
Sorbitol	mg	560	300 -- 900
Otros			
Metanol	mg	3.8	1.8 -- 5.3

Fuente: Souci, S.W., y col. 2000.

TABLA No. 21
COMPOSICION QUIMICA DE UNA SIDRA COMERCIAL
 (Las cantidades son expresadas en g/100 g de sidra)

Constituyentes	dim	Promedio	variación
Agua	g	92.1	--
Carbohidratos disponibles	g	2.63	--
Etanol	g	4.99	3.97 -- 5.27
Minerales	g	0.29	0.23 -- 0.33
Ácidos de fruta			
Ácido total	mg	530	380 -- 670
Ácido volátil	mg	65	18 -- 100
Carbohidratos			
Azúcar invertido	mg	150	60 -- 380
Otros			
Extracto	mg	2630	2300 -- 2900
Ácido tánico	mg	120	35 -- 540
glicerol	mg	410	330 -- 470

Fuente: Souci, S.W. y col. 2000.

TABLA No. 22
COMPUESTOS VOLATILES DE JUGO DE MANZANA COMERCIAL

Compuesto	µg/L
<i>n</i> -Butanol	40000
Hexanol	11000
2-metilbutanol	9000
3-metilbutanol	9000
<i>n</i> -Propanol	7000
Etanol	5000
<i>n</i> -Butil acetato	2200
Etil acetato	2000
<i>n</i> -Propil acetato	300
Etil butirato	300
2-Metilbutil acetato	200
3-Metilbutil acetato	200
Etil propionato	200
<i>cis</i> -Linalool óxido	50
<i>trans</i> -Linalool óxido	10
Etil hexanoato	3
Etil octanoato	3
Isobutil acetato	1
2-Feniletanol	1
Isobutil hexanoato	1
Etil decanoato	1
Butil decanoato	1
Propanol	1
Butanol	1

Fuente: Williams, A. A., y col. 1980.