

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**ESTUDIO DEL PROCESO
BIOTECNOLÓGICO
PARA LA ELABORACION DE
UNA BEBIDA ALCOHOLICA A PARTIR DE
JUGO DE NARANJAS**

Tesis Doctoral

Presentada por:

Ing. María Mercedes Ferreyra

Facultad de Ciencias de la Alimentación. UNER

Directores:

Dra. María José García Esparza

Departamento de Tecnología de Alimentos. UPV

Dr. Roque Alberto Hours

Centro de Investigación y Desarrollo en
Fermentaciones Industriales (CINDEFI). UNLP

Concordia/ Valencia, marzo de 2006



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ENTRE RÍOS

Dra. MARIA JOSÉ GARCÍA ESPARZA, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD POLITECNICA DE VALENCIA y Dr. ROQUE ALBERTO HOURS, PROFESOR TITULAR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ENTRE RÍOS

CONSIDERAN: que el trabajo de investigación titulado: "ESTUDIO DEL PROCESO BIOTECNOLÓGICO PARA LA ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA ALCOHÓLICA A PARTIR DE JUGO DE NARANJA", realizado bajo su dirección y que, para aspirar al grado de Doctor, presenta la Ingeniera de Alimentos Maria Mercedes Ferreyra, reúne las condiciones adecuadas para constituir su Tesis Doctoral, por lo que **AUTORIZAN** a la interesada para su presentación.

Marzo de 2006

Dra. María José García Esparza

Dr Roque Alberto Hours.

*A la memoria de mi madre
de quien he recibido un profundo amor y ejemplo.*

AGRADECIMIENTOS

Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa (Mahatma Gandhi)

-Quiero agradecer a mis colegas del Laboratorio de Investigación e integrantes de las Cátedras de Microbiología, Biotecnología y Aseguramiento y Control de Calidad de los Alimentos por brindarme el apoyo técnico necesario para el logro de mis objetivos.

-También agradezco a los Directores de Tesis, personas que gentilmente asumieron las responsabilidades de mi acción.

-Asimismo hago patente mi agradecimiento a las siguientes Instituciones que han hecho posible llegar a esta instancia:

Facultad de Ciencias de la Alimentación por permitirme el uso de sus instalaciones y personal para llevar a cabo las experiencias.

Universidad Nacional de Entre Ríos por el apoyo económico a través del otorgamiento de una beca de cuarto nivel para el cursado del postgrado y el financiamiento del proyecto de investigación, en cuyo marco se desarrollaron las experiencias

Universidad Politécnica de Valencia por implementar el Programa de Doctorado en la Facultad de Ciencias de la Alimentación.

-Agradezco también a los becarios de laboratorio, personal técnico de planta piloto, personal docente y no docente de la Facultad.

-También reconozco la ayuda de los evaluadores por el análisis crítico y oportunas sugerencias en la redacción y confección final de la tesis

-A mis amigos y compañeros y a todas aquellas personas que directa o indirectamente contribuyeron al logro de una de mis metas.

Tabla de Contenidos

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Historia de la fermentación alcohólica	1
I.2. Elaboración de bebidas alcohólicas: Vino.....	2
I.3. Antecedentes de elaboración de vinos de frutas.....	5
I.4. Justificación.....	7
II OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	8
Objetivos generales:	9

PRIMERA PARTE: ECOLOGÍA DE LEVADURAS VÍNICAS, SELECCIÓN Y ADAPTACION A MOSTOS DE JUGO DE NARANJA **11**

CAPÍTULO 1 AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN, SELECCIÓN DE LEVADURAS AUTÓCTONAS DEL JUGO DE NARANJA NATURAL Y FERMENTADO..... **12**

1.1.- INTRODUCCIÓN	13
1.2.- MATERIALES Y METODOS	19
1.2.1.- Muestreo de la fruta.....	19
1.2.2.- Preparación de las muestras.....	19
1.2.3.- Aislamiento de levaduras.....	20
1.2.4.- Caracterización e identificación de levaduras	23
1.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
1.3.1.-Aislamiento de levaduras a partir de jugo natural.	26
1.3.2.- Aislamiento de levaduras a partir de jugo fermentado.	28

CAPITULO 2. ADAPTACION DE *Saccharomyces spp* A MEDIOS DE CULTIVO FORMULADOS A PARTIR DE JUGO DE NARANJA ... **36**

2.1.- INTRODUCCION	37
2.2.- MATERIALES Y METODOS	38
2.2.1.- Formulación del medio de cultivo y crecimiento de ambas levaduras (<i>S. cerevisiae</i> y <i>S. bayanus</i>).....	38
2.2.2.- Esterilización de los medios, inoculación y crecimiento de las levaduras	41
2.3.- RESULTADOS Y DISCUSION.....	42
2.3.1.- Caracterización de jugos de naranja de diferentes orígenes:	42
2.3.1.1.- Jugos frescos de naranja.	42
2.3.1.2.- Jugos de naranja pasteurizado y concentrado reconstituido.....	46
2.3.2.- Cultivos de levaduras utilizando diferentes jugos de naranja:	49

SEGUNDA PARTE: CULTIVO DE *Saccharomyces cerevisiae* PARA SU UTILIZACIÓN EN VINIFICACIÓN 56

CAPITULO 1: DETERMINACIÓN DE REQUERIMIENTOS

NUTRICIONALES DE *S. cerevisiae* 57

1.1.- INTRODUCCION	58
1.2.- MATERIALES Y METODOS	59
1.2.1.- Formulación del medio de cultivo	59
1.2.2.- Esterilización de los componentes del medio.	59
1.2.3.- Inoculación y seguimiento del crecimiento de <i>S.cerevisiae</i> en los diferentes medios.	61
1.3.- RESULTADOS Y DISCUSION	63
1.3.1.- Crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en los medios de cultivo con diferentes disponibilidades de vitaminas.	63
1.3.1.1.- Evolución de la DO ₆₂₅	63
1.3.1.2.- Evolución del pH.	64
1.3.1.3.- Evolución de la masa seca.	64
1.3.1.4.- Recuento microscópico.	64

CAPITULO 2 OBTENCIÓN DE BIOMASA DE LA *Saccharomyces cerevisiae*. SELECCIONADA CARACTERISTICAS DE CALIDAD. 69

2.1.- INTRODUCCION	70
2.2.- MATERIALES Y METODOS	76
2.2.1.- Sistema discontinuo (Batch)	76
2.2.1.1.- Medios de cultivo	76
2.2.1.2.- Preparación del inóculo.	77
2.2.1.3.- Procedimiento del cultivo.	77
2.2.1.4.- Análisis de las muestras.	79
2.2.2.- Sistema fed-batch	80
2.2.3.- Evaluación de la biomasa.	82
2.2.3.1.- Características de calidad de la biomasa.	82
2.2.3.1.1.- Viabilidad. Prueba del azul de metileno.	82
2.2.3.1.2.- Recuento de levaduras en placa con Agar papa-dextrosa.	82
2.2.3.1.3.- Recuento de bacterias del ácido láctico. Método de recuento en placas en Agar de Man Rogosa Sharpe (MRS) (Figura 2.2.3).	83
2.2.3.1.4.- Recuento de coliformes totales y fecales. Método de placas Petrifilm.	83
2.2.3.1.5.- Presencia de Clostridios sulfitorreductores en caldo de hígado (AOAC, 1984). Según Figura 2.2.5	84
2.2.3.1.6.- Presencia de <i>Streptococos</i> fecales en agar con azida sódica.	84
2.2.3.2.- Características enológicas primarias de <i>S. cerevisiae</i>	85
2.2.3.2.1.- Poder alcoholígeno a dos temperaturas de fermentación.	85
2.2.3.2.2.- Rendimiento azúcar/alcohol.	85
2.2.3.2.3.- Alta pureza de fermentación (PF).	85
2.2.3.2.4.- Poder fermentativo a bajo pH.	85

2.2.3.2.5.- Producción de H ₂ S.....	86
2.2.3.2.6.- Resistencia al SO ₂	86
2.2.3.2.7.- Determinación del poder floculante.....	86
2.2.3.2.8.- Formación de espuma.....	86
2.3.- RESULTADOS Y DISCUSION.....	87
2.3.1.- Obtención de biomasa de la <i>S. cerevisiae</i> aislada.....	87
2.3.1.1.- Sistema Batch.....	87
2.3.1.2.- Sistema fed-batch.....	91
2.3.2.- Evaluación de la biomasa.....	94
2.3.2.1.- Viabilidad.....	94
2.3.2.2.- Recuento de levaduras en placa con Agar papas-dextrosa.....	94
2.3.2.3.- Recuento de bacterias lácticas.....	94
2.3.2.4.- Recuento de coliformes totales y fecales.....	94
2.3.2.5.- Presencia de Clostridios sulfitorreductores.....	94
2.3.2.6.- Presencia de Streptococos fecales.....	94
2.3.3.- Características enológicas primarias de la biomasa.....	94
2.3.3.1.- Poder alcoholígeno.....	95
2.3.3.2.- Rendimiento azúcar / alcohol.....	96
2.3.3.3.- Alta pureza de fermentación (PF).....	97
2.3.3.4.- Producción de SH ₂	97
2.3.3.5.- Resistencia al SO ₂	97
2.3.3.6.- Determinación del poder floculante.....	98
2.3.3.7.- Formación de espuma.....	98

TERCERA PARTE: PRODUCCION DE VINOS DE NARANJA... 100

CAPITULO 1: FERMENTACION DE LOS MOSTOS..... 101

1.1. INTRODUCCION.....	102
1.2. MATERIALES Y METODOS.....	121
1.2.1.- Microorganismos usados para la vinificación de mostos de naranja. .	121
1.2.2.- Obtención del mosto de jugo natural de naranja.....	122
1.2.3.- Obtención del mosto de jugo de naranja pasteurizado.....	124
1.2.4.- Obtención del mosto de jugo de naranja concentrado reconstituido. .	124
1.2.5.- Elaboración del vino de naranja.....	125
1.2.5.1.- Fermentación primaria de los mostos.....	128
1.2.5.2.- Primer Trasiego.....	129
1.2.5.3.- Segundo Trasiego y envasado.....	130
1.3.- RESULTADOS Y DISCUSION.....	132
1.3.1.- Caracterización de las levaduras usadas como inóculo.....	132
1.3.2.- Caracterización de los mostos de jugos de naranja.....	132
1.3.3.- Evolución de la Fermentación.....	136
1.3.4.- Cálculo de la cantidad de calor durante la fermentación tumultuosa..	137
1.3.5.- Evolución de algunos parámetros químicos y microbiológicos hasta la obtención del vino joven.....	139
1.3.5.1.- Sólidos solubles.....	140
1.3.5.2.- Perfil de azúcares reductores y totales.....	140
1.3.5.3.- Contenido de glucosa, sacarosa y fructosa en los vinos jóvenes..	144

1.3.5.4.- Graduación alcohólica	145
1.3.5.5.- Nitrógeno amínico	148
1.3.5.6.- Ácidos orgánicos	151
1.3.5.6.1.- Ácido cítrico.....	151
1.3.5.6.2.- Ácido málico	152
1.3.5.6.3.- Ácido quínico.....	154
1.3.5.7.- Acidez titulable.....	155
1.3.5.8.- Ácido ascórbico	157
1.3.5.9.- Carotenoides	158
1.3.5.10.- Aceites esenciales	160
1.3.5.11.- Flavonoides: Hesperidina	161
1.3.5.12.- Control microbiológico.....	163

CAPITULO 2: MADURACIÓN Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DEL PRODUCTO FINAL 166

2.1.- INTRODUCCION	167
2.2.- MATERIALES Y METODOS	168
2.2.1.- Parámetros fisicoquímicos.....	168
2.2.2.- Ensayos de estabilidad.....	169
2.2.2.1. Ensayo de comportamiento al aire	169
2.2.2.2. Ensayo de comportamiento en estufa.....	169
2.2.2.3. Índice de amarronado.....	170
2.3.- RESULTADOS Y DISCUSION.....	171
2.3.1.- Composición química de los vinos de naranja después de 120 días de almacenamiento a dos temperaturas	171
2.3.1.1.- Glúcidos.....	171
2.3.1.2.- Nitrógeno amínico	171
2.3.1.3.- Carotenoides	171
2.3.1.4.- Hesperidina	172
2.3.1.5.- Aceites esenciales	172
2.3.1.6.- Metales.....	173
2.3.1.7.- Ácidos orgánicos	174
2.3.1.7.1.- Ácido cítrico.....	174
2.3.1.7.2.- Ácido málico.....	174
2.3.1.7.3.- Ácido quínico.....	174
2.3.1.7.4.- Acidez titulable	174
2.3.1.7.5.- Ácido ascórbico	175
2.3.1.7.6.- Etanol	176
2.3.1.7.7.- Metanol	177
2.3.1.8.- Productos secundarios de la fermentación alcohólica.....	178
2.3.1.8.1.- Glicerol	178
2.3.1.8.2.- Sustancias acetónicas	180
2.3.1.8.3.- Acetaldehído	181
2.3.1.8.4.- Ácido succínico.....	182
2.3.1.8.5.- Ácido acético	182
2.3.1.8.6.- Acetato de etilo	183

2.3.1.8.7.- Alcoholes superiores	184
2.3.1.8.8.- SO ₂ libre y combinado	185
2.3.2.- Estabilidad de los vinos de naranja.....	187
2.3.2.1.- Ensayo de comportamiento al aire.....	188
CAPITULO 3: DISEÑO EXPERIMENTAL DE LAS	
COMBINACIONES DE VARIABLES	194
3.1.- INTRODUCCION	195
3.2.- MATERIALES Y METODOS	196
3.3.- RESULTADOS Y DISCUSION.....	197
IV CONCLUSIONES	219
V BIBLIOGRAFIA.....	225

Índice de Tablas

<i>Tabla 1.2.1. Calendario de muestreo de las 4 variedades de naranjas estudiadas</i>	<i>19</i>
<i>Tabla 1.3.1. Identificación de levaduras según sistema ID 32 C.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabla 1.3.2.- Caracterización microbiológica de las de levaduras aisladas.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 1.3.4.- Características tecnológicas de levaduras fermentativas.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabla 2.3.1: Contenido medio y desviación estándar de principales componente de jugo de naranja de cuatro variedades.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 2.3.2: Composición de jugo natural (W. Navel), pasteurizado y concentrado. ...</i>	<i>47</i>
<i>Tabla 2.3.3: Contenido en vitaminas y factores de crecimiento en jugo de naranja*... </i>	<i>49</i>
<i>Tabla 2.3.4.-: Composición del medio de cultivo base:.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabla 1.2.1 a): Composición del medio base.....</i>	<i>59</i>
<i>Tabla 1.2.1 b): Composición de la solución stock 1.....</i>	<i>60</i>
<i>Tabla 1.2.1. c) Composición de la solución stock 2.....</i>	<i>60</i>
<i>Tabla 1.2.2: Combinaciones de vitaminas.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabla 1.3.2 Parámetros de crecimiento de S. cerevisiae en medios con distinta composición vitamínica.....</i>	<i>65</i>
<i>Tabla. 1.3.1: Contenido en ácidos de los distintos mostos.....</i>	<i>132</i>
<i>Tabla 1.3.2: Parámetros fisicoquímicos del producto obtenido luego de la fermentación primaria medidos después del primer trasiego.....</i>	<i>141</i>
<i>Tabla 1.3.3. a) Evolución de Azúcares Totales para la fermentación usando S. cerevisiae.....</i>	<i>142</i>
<i>Tabla 1.3.3. b) Evolución de Azúcares Totales para la fermentación usando S. bayanus</i>	<i>142</i>
<i>Tabla 1.3.4.- Características diferenciales de subespecies de L. mesenteroides.....</i>	<i>165</i>
<i>Tabla 2.2.1.- Planilla registro de ensayos de comportamiento al aire y a 30 °C.</i>	<i>169</i>
<i>Tabla 2.3.1.- Características fisicoquímicas de los vinos madurados elaborados con S. bayanus.....</i>	<i>172</i>
<i>Tabla 2.3.2.- Características fisicoquímicas de los vinos madurados elaborados con S. cerevisiae.....</i>	<i>173</i>

<i>Tabla 2.3.3.- Acidez titulable, pH y ácidos orgánicos de vinos madurados. S. bayanus.</i>	175
<i>Tabla 2.3.4.- Acidez titulable, pH y ácidos orgánicos de vinos madurados. S. cerevisiae.</i>	176
<i>Tabla 2.3.5.- Alcoholes y componentes volátiles de los vinos madurados. S. bayanus.</i>	178
<i>Tabla 2.3.6.- Alcoholes y componentes volátiles de los vinos madurados. S. cerevisiae.</i>	179
<i>Tabla 3.3.1: Matriz de diseño para vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	198
<i>Tabla 3.3.2.: Matriz de diseño para vinos elaborados con S. bayanus.</i>	198

Índice de Figuras

<i>Figura 1.2.1. Aislamiento de la microflora del jugo de naranja natural.</i>	22
<i>Figura 1.2.2. Aislamiento de la microflora del jugo de naranja fermentado.</i>	23
<i>Figura 2.3.1: Curva de crecimiento en jugo natural de naranja</i>	53
<i>Figura 2.3.2: Curva de crecimiento en jugo pasteurizado de naranja.</i>	54
<i>Figura 2.3.3: Curva de crecimiento en jugo concentrado reconstituido (11°Brix) de naranja.</i>	54
<i>Figura 1.3.1: Evolución de los parámetros de crecimiento de S. cerevisiae en medios con diferentes disponibilidades de vitaminas. a) Medio completo, b) medio libre de vitaminas, c) medio carente de niacina, tiamina y ácido fólico y d) medio carente de niacina, tiamina, ácido fólico e inositol.</i>	63
<i>Tabla 1.3.1: Resultados finales obtenidos en los cultivos de S. cerevisiae en los medios 1, 2, 3 y 4 luego de 2 pasajes en cada uno de ellos.</i>	65
<i>Figura 1.3.2 a), b), c) y d): Evolución de los parámetros de crecimiento en distintos medios de cultivo.</i>	66
<i>Figura 1.3.3: Relación entre DO₆₂₅ y masa seca.</i>	68
<i>Figura 2.2.1-Esquema del biorreactor utilizado en los ensayos.</i>	79
<i>Figura 2.2.2- Esquema del equipamiento usado en el cultivo fed batch.</i>	81
<i>Figura 2.2.3- Esquema del método de siembra para el recuento de bacterias del ácido láctico.</i>	83
<i>Figura 2.2.4-Método Petrifilm para el recuento de bacterias coliformes.</i>	84
<i>Figura 2.2.5-: Esquema del método de siembra para la detección de Clostridios sulfitorreductores.</i>	84
<i>Figura 2.2.6-: Colonias típicas de Streptococos fecales en agar con azida sódica.</i>	84
<i>Figura 2.3.1: Evolución del cultivo batch de S. cerevisiae.</i>	87
<i>Figura 2.3.2: Evolución de los gases de salida y del cociente respiratorio (CR) en cultivo batch de S. cerevisiae.</i>	88
<i>Figura 2.3.3: Evolución del pH en cultivo batch de S. cerevisiae.</i>	89

<i>Figura 1.2.1.- Diagrama de flujo: Obtención de "Vino de naranja" a partir de jugo de naranja natural y pasteurizado.</i>	126
<i>Figura 1.2.2.- Diagrama de flujo: Obtención de "Vino de naranja" a partir de jugo de naranja concentrado reconstituido.</i>	127
<i>Figura 1.3.1 -Evolución del volumen de CO₂ desprendido durante el primer estadio.</i>	136
<i>Figura 1.3.2.- Variación de los azúcares reductores en los vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	143
<i>Figura 1.3.3.- Variación de los azúcares reductores en los vinos elaborados con S. bayanus.</i>	143
<i>Figura 1.3.4. Porcentaje de glucosa, fructosa y sacarosa de vino joven elaborado con S. cerevisiae.</i>	144
<i>Figura 1.3.5. Porcentaje de glucosa, fructosa y sacarosa de vino joven elaborado con S. bayanus.</i>	144
<i>Figura 1.3.6.- Etanol teórico y experimental en vinos jóvenes elaborados con S. cerevisiae.</i>	146
<i>Figura 1.3.7.- Etanol teórico y experimental en vinos jóvenes elaborados con S. bayanus.</i>	147
<i>Figura 1.3.8.: Evolución de nitrógeno amínico en vinos elaborado con S. bayanus...</i>	149
<i>Figura 1.3.9.- Evolución de nitrógeno amínico en vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	150
<i>Figura 1.3.11.- Evolución del ácido cítrico (mg/L) en vinos elaborados con S. bayanus.</i>	152
<i>Figura 1.3.12.: Evolución del ácido málico (mg/L) en vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	153
<i>Figura 1.3.13.- Evolución del ácido málico (mg/L) en vinos elaborados con S. bayanus.</i>	154
<i>Figura 1.3.14.- Evolución del ácido quínico (mg/L) en vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	155
<i>Figura 1.3.15.- Evolución del ácido quínico (mg/L) en vinos elaborados con S. bayanus.</i>	155
<i>Figura 1.3.16.- Evolución de la acidez titulable (% de ácido cítrico) en vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	156
<i>Figura 1.3.17.- Evolución de la acidez titulable (% de ac. cítrico) en vinos elaborados con S. bayanus.</i>	156
<i>Figura 1.3.18.- Evolución del ácido ascórbico (mg/100 mL) en vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	158
<i>Figura 1.3.19.- Evolución del ácido ascórbico (mg/100 mL) en vinos elaborados con S. bayanus.</i>	158
<i>Figura 1.3.20.- Evolución de β-caroteno (mg/100 mL) en vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	159
<i>Figura 1.3.21.- Evolución de β caroteno (mg/100 mL) en vinos elaborados con S. bayanus.</i>	159
<i>Figura 1.3.22.- Evolución de los aceites esenciales (μL/100mL) en vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	161
<i>Figura 1.3.23.- Evolución de los aceites esenciales (μL/100mL) en vinos elaborados con S. bayanus.</i>	161

<i>Figura 1.3.24.- Evolución de Hesperidina (mg/100 mL) en vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	162
<i>Figura 1.3.25.- Evolución de hesperidina (mg/100 mL) en vinos elaborados con S. bayanus.</i>	162
<i>Figura 2.3.1.- SO₂ Total (mg/L) en vinos de naranja almacenados durante 120 días.</i>	186
<i>Figura 2.3.2.- SO₂ Libre (mg/L) en vinos de naranja almacenados durante 120 días.</i>	186
<i>Figura 2.3.3.- Microfotografía de sedimento del vino de naranja Sb-3.5-10-10.</i>	188
<i>Figura 2.3.4.- Microfotografía S. bayanus, proveniente de vinos elaborados con mostos de jugo de naranja pasteurizado (1000×)</i>	189
<i>Figura 2.3.5.- Microfotografía de células de levaduras observadas en sedimentos de vinos de naranja (1000×).</i>	190
<i>Figura 2.3.6.- Microfotografía de vinos de naranja a partir de mostos de pH: 4,0.</i>	191
<i>Figura 2.3.7.- Diferencias en el color de los vinos de naranja según la temperatura de ensayo de estabilidad. 1) 30 °C PSc 3,5-20, 2) Temp. amb. PSc 3,5-20, 3) Temp. amb. Sc 3,5-20 4) 30 °C Sc3,5-20.</i>	193
<i>Figura 3.3.1.: Diagrama de Pareto de la respuesta azúcares totales para vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	199
<i>Figura 3.3.2. Interacción Temperatura de fermentación /pH para vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	200
<i>Figura 3.3.3.- Interacción Temperatura de fermentación/Mosto para vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	200
<i>Figura 3.3.4.- Diagrama de Pareto de la respuesta azúcares totales para vinos elaborados con S. bayanus.</i>	201
<i>Figura 3.3.5.- Interacción Temperatura de fermentación/pH para vinos elaborados con S. bayanus.</i>	202
<i>Figura 3.3.6.: Diagrama de Pareto de la respuesta etanol para vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	202
<i>Figura 3.3.7.- Interacción Temperatura de fermentación/pH para vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	203
<i>Figura 3.3.8.- Interacción Temperatura de fermentación/Mosto para vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	203
<i>Figura 3.3.9.- Diagrama de Pareto de la respuesta etanol para vinos elaborados con S. bayanus.</i>	204
<i>Figura 3.3.10. Interacción Temperatura de fermentación/pH para vinos elaborados con S. bayanus.</i>	205
<i>Figura 3.3.11.- Diagrama de Pareto de la respuesta glicerol para vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	206
<i>Figura 3.3.12.- Interacción Temperatura de fermentación/pH para vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	206
<i>Figura 3.3.13. Interacción Temperatura de maduración/pH para vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	207
<i>Figura 3.3.14.: Diagrama de Pareto de la respuesta Glicerol para vinos elaborados con S. bayanus.</i>	207
<i>Figura 3.3.15. Interacción pH/Mosto para vinos elaborados con S. bayanus.</i>	208
<i>Figura 3.3.16. Interacción Temperatura de fermentación/Temperatura de maduración para vinos elaborados con S. bayanus.</i>	208

<i>Figura 3.3.17.: Diagrama de Pareto de la respuesta Acetaldehído para vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	209
<i>Figura 3.3.18. Interacción Temperatura de fermentación/pH para vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	210
<i>Figura 3.3.20. Interacción Temperatura de fermentación/Temperatura de maduración para vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	211
<i>Figura 3.3.21.: Diagrama de Pareto de la respuesta Acetaldehído para vinos elaborados con S. bayanus.</i>	211
<i>Figura 3.3.22. Interacción pH/Mosto para vinos elaborados con S. bayanus.</i>	212
<i>Figura 3.3.23. Interacción Temperatura de fermentación/Mosto para vinos elaborados con S. bayanus.</i>	213
<i>Figura 3.3.24. Interacción Temperatura de fermentación/Temperatura de maduración para vinos elaborados con S. bayanus.</i>	213
<i>Figura 3.3.25.: Diagrama de Pareto de la respuesta Acetato de Etilo para vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	214
<i>Figura 3.3.26. Interacción Temperatura de fermentación/pH para vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	215
<i>Figura 3.3.27. Interacción Temperatura de maduración/Mosto para vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	215
<i>Figura 3.3.28. Interacción pH/Temperatura de maduración para vinos elaborados con S. cerevisiae.</i>	216
<i>Figura 3.3.29: Diagrama de Pareto de la respuesta Acetato de Etilo para vinos elaborados con S. bayanus.</i>	217
<i>Figura 3.3.30. Interacción Temperatura de fermentación/Mosto para vinos elaborados con S. bayanus.</i>	217
<i>Figura 3.3.31. Interacción pH/Temperatura de maduración para vinos elaborados con S. bayanus.</i>	218

RESUMEN

RESUMEN

El vino es el producto que resulta de la fermentación alcohólica del jugo de uva. Si se usa otra fruta se debe denominar "vino de..." acompañado del nombre de la fruta. La manufactura de vinos de otras frutas distintas de la uva es muy popular en muchos países del norte europeo, donde las condiciones climáticas impiden el desarrollo de la vitivinicultura. La CEE define los vinos de frutas como la bebida alcohólica obtenida por la fermentación parcial o completa de jugos de frutas frescos, jugo concentrado o reconstituido; o macerado de pulpa con la adición de agua, azúcar o miel. Finalizada la fermentación se puede adicionar jugo fresco, concentrado o reconstituido. Los vinos de fruta tendrán una concentración alcohólica comprendida entre 8 y 14 % (gramos / 100 mL).

La elaboración de vinos de frutas cítricas es popular en Turquía y los países asiáticos (China, Japón, Corea). En Argentina, una de las zonas cítricas más importantes se encuentra localizada en la Mesopotamia Argentina, específicamente en la franja de suelos arenosos existentes sobre la margen del río Uruguay, en la provincia de Entre Ríos. Dentro de esta zona, en el Departamento Concordia, reviste gran importancia la producción de mandarinas y naranjas. Particularmente, de las diferentes variedades cultivadas de naranjas merecen destacarse la Newhall y Washington Navel (omblijo), Salustiana (común) y Valencia.

A los efectos de utilizar algunas de estas variedades típicas de la zona para obtener una bebida alcohólica, en el presente estudio se adaptaron tecnologías usadas en Enología para elaborar "vino de naranja". Todo proceso biotecnológico con microorganismos comienza con la elección de los mismos, por lo tanto este trabajo se inició con un estudio ecológico de la flora epifítica de las 4 variedades de naranja antes mencionadas, a los efectos de seleccionar especies aptas para la elaboración de vino de naranja, encontrándose entre otras, una *Saccharomyces cerevisiae* con buenas propiedades enológicas. Como el objetivo era preparar mostos con jugo de naranja recién exprimido, jugo pasteurizado y jugo concentrado reconstituido se procedió a la adaptación de esta levadura a cada uno de los mostos, en paralelo con una cepa comercial de *S. bayanus* mediante la determinación de las respectivas curvas de crecimiento, encontrándose que ambas levaduras tuvieron un crecimiento aceptable en todos los mostos; luego podrían ser usadas

indistintamente para la elaboración de vinos de naranjas. Como fue preciso obtener la levadura autóctona en cantidades suficientes para la vinificación, se hizo necesario reproducir las mismas en condiciones aerobias para lo cual se ensayaron los sistemas batch y fed batch, lográndose mayores rendimientos con este último por lo cual se lo usó como método de producción de *S. cerevisiae*. La biomasa obtenida fue analizada, comprobándose que la misma poseía excelentes características tecnológicas e higiénicas.

Para establecer las condiciones del proceso de fermentación se procedió a trabajar con mostos preparados con jugo de naranja natural, jugo de naranja pasteurizado y jugo de naranja concentrado reconstituido, con las dos levaduras (*S. cerevisiae* y *S. bayanus*), fermentando a dos temperaturas (10 y 20°C), a dos pHs (el propio de los jugos y ajustado a 4,0), siguiendo la evolución de algunos parámetros químicos y microbiológicos desde la inoculación de las levaduras hasta la obtención de los vinos jóvenes, lo cual permitió observar tanto las transformaciones de los componentes de los mostos, como la producción de distintas sustancias durante la fermentación alcohólica, y verificar posibles alteraciones microbianas. En este sentido se destaca que todos los vinos de naranja elaborados a partir de mosto preparado con jugo de naranja concentrado reconstituido experimentaron alteración microbiana debidas principalmente a la especie *Leuconostoc mesenteroides* y *Acetobacter sp.*, por lo cual fueron desechados antes de ser envasados. Los vinos elaborados con mosto de jugo natural y pasteurizado fueron envasados y sometidos a un proceso de maduración durante 120 días a dos temperaturas (10 y 20°C). Al término de este período se analizaron nuevamente los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos y se realizaron pruebas de estabilidad.

Para seleccionar las condiciones de elaboración más favorables para la obtención de un vino de naranja aceptable, se aplicó un diseño experimental estadístico del tipo factorial equilibrado 2^k , resultando 16 ensayos para cada cepa. Esto permitió concluir que con un inóculo de *S. cerevisiae*, los mejores resultados analíticos se obtuvieron con mosto de jugo de naranja pasteurizado, pH 4,0, fermentación a 10 °C y maduración a 20 °C. En cambio con *S. bayanus*, se preferiría la fermentación de mosto de jugo de naranja pasteurizado a pH: 4,0, 20 °C y madurados a 20 °C.

SUMMARY

Wine is the resulting product of grape juice alcoholic fermentation. If a different fruit is used, it should be referred to as "... wine", using the name of the fruit as a modifier. Wine-making from fruits other than grapes is very popular in many northern European countries where climatic conditions hinder the development of viticulture. The European Economic Community defines fruit wines as the alcoholic beverage obtained by the complete or partial fermentation of fresh, concentrated or reconstituted juices; or pulp maceration with the addition of water, sugar or honey. Once the fermentation process is finished, fresh, concentrated or reconstituted juice can be added. Fruit wines usually have an alcoholic fermentation between 8 and 14 % (gram / 100 mL).

Wine made from citrus fruit is very popular in Turkey and some Asian countries (China, Japan and Korea). In Argentina, one of the most important citrus-growing areas is located in the area known as the Mesopotamia, specifically on the sandy strip of the Uruguay River bank, in the province of Entre Ríos. The Concordia department in this region is well known for its orange and tangerine production. Newhall, Washington Navel, Salustiana and Valencia are some of the most important varieties.

In this work some technologies used in oenology were adapted in order to produce orange wine. Every biotechnological process starts with the selection of microorganisms; consequently an ecological study of the native / indigenous flora was undertaken in the aforementioned varieties in order to choose the more adequate species. A strain of *S. cerevisiae* with good oenological properties was found. As the objective was to prepare musts with fresh juice, pasteurised juice and reconstituted concentrate, this yeast was adapted to each must by determining the respective growth curves. A parallel study was carried out using a commercial strain of *S. bayanus*. It was found that both yeasts had an acceptable growth in all musts, hence, it was concluded that they could be used indistinctly in orange wine-making.

Since it was necessary to obtain the native flora in the amounts required for fermentation, they were reproduced in aerobic conditions using batch and fed-batch systems. The highest yields were obtained with the second procedure; as a result this was used to produce *S. cerevisiae*.

The resultant biomass was analysed and it was found that it had excellent technological and hygienic characteristics.

In order to set up conditions for the fermentation process, work with musts prepared with fresh orange juice, pasteurised juice and reconstituted concentrate, with both yeasts (*S. cerevisiae* y *S. bayanus*), at two fermentation temperatures (10 and 20 °C), two pHs (their own and another adjusted at 4.0) was carried out following the evolution of some chemical and microbiological parameters from yeast inoculation to the production of young wines. Thus, must component transformation as well as the production of different substances could be observed during alcoholic fermentation. It was also possible to verify microbial spoilage. It should be noted that all orange juice wines made from reconstituted orange juice showed microbial contamination due to the presence of *Leuconostoc mesenteroides* and *Acetobacter sp.*, therefore they were discarded before being bottled.

Wines produced with natural and pasteurised juice were bottled and subjected to a maturation process during 120 days at two temperatures (10 y 20 °C). At the end of this period, physico-chemical and microbiological parameters were further analysed and stability tests were conducted.

In order to select the most convenient manufacturing conditions for the production of an acceptable orange juice, a full factorial design of 2^k type was applied, resulting 16 tests for each strain. It was concluded that with a *S. cerevisiae* inoculum, the best analytical results were obtained with pasteurised orange juice musts, pH: 4.0, fermentation at 10 °C and maturation at 20 °C whereas with *S. bayanus*, fermentation of pasteurised orange juice must at pH: 4.0, 20 °C and maturation at 20 °C should be preferred.

RESUM

El vi és el producte que resulta de la fermentació alcohòlica del suc de raïm. Si s'usa una altra fruita s'ha de denominar "vi de..." acompanyat del nom de la fruita.. La manufactura de vins d'altres fruites diferents del raïm és molt popular en molts països del nord europeu on les condicions climàtiques impedeixen el desenvolupament de la vitivinicultura. La UE defineix els vins de fruites com la beguda alcohòlica obtinguda per la fermentació parcial o completa de suc de fruites frescos, suc concentrat o reconstituït; o maceració de polpa amb l'addició d'aigua, sucre o mel. Finalitzada la fermentació es pot addicionar suc fresc, concentrat o reconstituït. Els vins de fruita tindran una concentració alcohòlica compresa entre 8 i 14 % (grams / 100 mL).

L'elaboració de vins de fruites cítriques és popular a Turquia i els països asiàtics (Xina, Japó, Corea). A l'Argentina, una de les zones cítriques més importants, es troba localitzada a la Mesopotàmia argentina, específicament a la franja de sòls arenosos existents sobre la marge del riu Uruguai, a la província d'Entre Ríos. Dins d'aquesta zona al departament Concordia revesteix gran importància la producció de mandarines i taronges. Particularment, de les diferents varietats cultivades de taronges mereixen destacar-se la Newhall i Washington Nàvel (melic), Salustiana (comuna) i València.

A l'efecte d'utilitzar algunes d'aquestes varietats típiques de la zona per a obtenir una beguda alcohòlica, en el present estudi es van adaptar tecnologies usades en enologia per a elaborar "vi de taronja". Tot procés biotecnològic amb microorganismes comença amb l'elecció d'aquests, per tant aquest treball es va iniciar amb un estudi ecològic de la flora epifítica de les 4 varietats de taronja abans esmentades a l'efecte de seleccionar espècies aptes per a l'elaboració de vi de taronja, trobant-se entre altres, una *S. cerevisiae* amb bones propietats enològiques. Com l'objectiu era preparar mostos amb suc de taronja acabat d'esprèmer, suc pasteuritzat i suc concentrat reconstituït, es va procedir a l'adaptació d'aquest llevat a cadascun dels mostos, en paral·lel amb una soca comercial de *S. bayanus* mitjançant la determinació de les respectives corbes de creixement, on es va trobar que ambdós llevats van tenir un creixement acceptable en tots els mostos; després podrien ser usats indistintament per a l'elaboració de vins de taronges. Com va ser necessari obtenir el llevat autòcton en quantitats suficients per a la

vinificació, es va fer necessari reproduir aquests en condicions aeròbies, per a la qual cosa es van assajar els sistemes *batch* i *fed batch*, i es van aconseguir majors rendiments amb aquest últim, per la qual cosa se'l va usar com a mètode de producció de *S. cerevisiae*. La biomassa obtinguda va ser analitzada, i es va comprovar que posseïa excel·lents característiques tecnològiques i higièniques.

Per a establir les condicions del procés de fermentació, es va procedir a treballar amb mostos preparats amb suc de taronja natural, suc de taronja pasteuritzat i suc de taronja concentrat reconstituït, amb els dos llevats (*S. cerevisiae* i *S. bayanus*), que van fermentar a dues temperatures (10 i 20°C), a dos pH (el propi dels suc i ajustat a 4,0), seguint l'evolució d'alguns paràmetres químics i microbiològics des de la inoculació dels llevats fins a l'obtenció dels vins joves, la qual cosa va permetre observar tant les transformacions dels components dels mostos, com la producció de distintes substàncies durant la fermentació alcohòlica, i verificar possibles alteracions microbianes. En aquest sentit es destaca que tots els vins de taronja elaborats a partir de most preparat amb suc de taronja concentrat reconstituït van experimentar alteració microbiana degudes principalment a l'espècie *Leuconostoc mesenteroides* i *Acetobacter sp.*, per la qual cosa van ser rebutjats abans de ser envasats. Els vins elaborats amb most de suc natural i pasteuritzat van ser envasats i sotmesos a un procés de maduració durant 120 dies a dues temperatures (10 i 20°C). A l'acabament d'aquest període es van analitzar novament els paràmetres fisicoquímics i microbiològics i es van realitzar proves d'estabilitat.

Per a seleccionar les condicions d'elaboració més favorables per a l'obtenció d'un vi de taronja acceptable es va aplicar un disseny experimental estadístic del tipus factorial equilibrat 2^k , i van resultar 16 assajos per a cada soca. Això va permetre concloure que amb un inòcul de *S. cerevisiae*, els millors resultats analítics es van obtenir amb most de suc de taronja pasteuritzat, pH 4,0, fermentació a 10 °C i maduració a 20°C. En canvi, amb *S. bayanus* es preferiria la fermentació de most de suc de taronja pasteuritzat a pH 4,0, 20 °C i madurats a 20 °C.

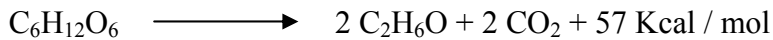
I. INTRODUCCIÓN

I.1. Historia de la fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica fue determinada cuantitativamente por Lavoisier (1743 – 1794) quien, estudiando esta fermentación, enuncia el principio de conservación de la materia y expresa una “ecuación algebraica” para este fenómeno:

Mosto de uva = Ácido carbónico + Alcohol

Posteriormente Gay-Lussac (1778 – 1850) expresa lo mismo con la ecuación que lleva su nombre:



Berzelius describe la fermentación como un fenómeno catalítico, similar a la descomposición del agua oxigenada por una esponja de platino y expresa la idea de fermentos orgánicos.

Posteriormente Cagniard de la Tour y Schwan observan en el microscopio que existía una estrecha dependencia entre la multiplicación de pequeños microorganismos y la intensidad de la fermentación de mostos de vinos o de cervezas donde se desarrollaban.

Sin embargo el mundo científico no aceptaba esta opinión hasta que Pasteur (1822 – 1895) demostró en 1872 que aquellos microorganismos vivían y se desarrollaban a expensas de las materias primas azucaradas, descomponiéndolas en alcohol y CO_2 , y que tales organismos vivientes constituían los “fermentos organizados”.

Liebig (1803 – 1873) se declaró contrario a dicha hipótesis considerando que los fermentos orgánicos eran sustancias de naturaleza proteica que producían un desdoblamiento natural de las moléculas de azúcar. Estas opiniones de Liebig, verdaderamente eran precursoras del concepto de enzimas, pero no fueron aceptadas en su época.

En 1896, Buchner (1860 – 1917) efectuó un descubrimiento importante que compatibilizaba la idea de “microorganismos fermentativos” de Pasteur y de “enzimas” de Liebig, demostrando que la acción fermentativa estaba en las células vivas de levaduras, pero que

podía ser extraída de ellas destruyendo las células con acetona o triturando con arena, obteniendo un jugo que a pesar de hallarse libre de células era capaz de reproducir todas las fases de la fermentación alcohólica de la glucosa (Brock and Madigan, 1991).

I.2. Elaboración de bebidas alcohólicas: Vino

En esencia, las bebidas alcohólicas son soluciones aromatizadas de etanol, derivadas de numerosos sustratos, que pueden ser cereales, uvas u otras frutas, o carbohidratos en general (Lee, 1996).

La fermentación alcohólica es el proceso biotecnológico más antiguo realizado por el hombre. Primero se utilizó como método de conservación de frutas, pero después se adoptó para elaborar bebidas alcohólicas, tal como los vinos.

Los mayores países productores de vino en orden de volumen decreciente son Italia, Francia, España, Argelia, Argentina, Portugal y Estados Unidos.

La elaboración de vino se originó en Egipto y Mesopotamia mucho antes del año 2000 aC, y se extendió a toda la región del Mediterráneo, la cual continúa siendo la mayor área de producción vinícola en el mundo. Otras regiones en las que se produce extensamente suelen tener un clima similar al de la zona mediterránea, por ejemplo, California, Argentina, Chile, Sudáfrica y Australia.

El mosto de uva debido a su alto contenido de azúcares (aproximadamente 200 g/L) y su natural acidez (pH 3,5) es un medio selectivo para las levaduras vínicas y puede considerarse que, en general, contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de estos microorganismos. Adicionalmente contiene otros constituyentes que aportan al aroma y sabor del vino.

Hay una gran variedad de vinos y su calidad y carácter varían considerablemente. Los vinos secos son aquellos en que los azúcares del jugo fermentan en su totalidad en tanto que en los vinos dulces, parte del azúcar se deja o adiciona después de la fermentación.

Todo lo desarrollado sobre vinificación se refiere a "vinos de uva" de los cuales existen principalmente dos tipos: vinos blancos y vinos

tintos. La producción de ambos difiere en algunas etapas, por lo cual se puede hablar de vinificación en blanco y vinificación en tinto (Aleixandre, 1999).

Los vinos blancos sólo emplean el zumo de uva tras el prensado y además este mosto se clarifica para eliminar los sólidos en suspensión. Para conseguir vino tinto, se deja el hollejo en el líquido con el fin de transmitirle su color o bien para aumentar el sabor del producto.

La fermentación del mosto es un proceso bioquímico muy complejo, en el que intervienen e interaccionan levaduras, mohos y bacterias, siendo las primeras los microorganismos clave en la vinificación, ya que son los responsables de la fermentación alcohólica, la principal reacción en la conversión del mosto en vino. Estos microorganismos pueden ser endógenos (provenientes de la piel de las uvas y de las superficies de las bodegas) o exógenos (cultivos estériles seleccionados) (Torija *et al.*, 2003).

Tanto las levaduras como las bacterias pueden ejercer una acción beneficiosa o ir en detrimento de la calidad de los vinos.

En una uva sana y madura prensada asépticamente la población microbiana total en el mosto puede variar entre 10^3 y 10^5 UFC/ mL (Walker, 1999).

Las levaduras que participan en la fermentación del vino son de dos tipos: 1) las llamadas levaduras silvestres que se encuentran en las uvas cosechadas y que se transfieren al jugo y 2) las levaduras de vino cultivadas, las cuales se adicionan al jugo para iniciar la fermentación.

Una diferencia importante entre las levaduras silvestres y las levaduras de vino cultivadas es su tolerancia al etanol. La mayor parte de las levaduras silvestres pueden tolerar solamente alrededor de un 4 % v/v de etanol; cuando la concentración de alcohol llega a este punto, la fermentación se detiene.

Sin embargo hay estudios que demuestran que especies de *non Saccharomyces*, en particular *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata*, *Torulaspota delbrueckii* y *Saccharomycoides ludwigii*, sobreviven largos períodos durante la fermentación, es así que la inoculación con levaduras selectas de *Saccharomyces cerevisiae* no garantiza que las mismas sean las dominantes durante todo el proceso (Ciani y Picciotti, 1995).

La levadura de vino puede tolerar hasta un 12 % a 14 % de etanol antes de detener su desarrollo. En los vinos no fortificados, el contenido alcanzado de este alcohol está determinado parcialmente por la tolerancia de la levadura al mismo y en parte por la cantidad de azúcar contenida en el jugo. El contenido de alcohol etílico de la mayor parte de los vinos no fortificados varía de 8 a 14 %.(p/v) Los vinos fortificados, por ejemplo el jerez, tienen un alto contenido de alcohol, aproximadamente del 20 %, el cual se logra por adición de destilados como el brandy.

Además de producir menor contenido alcohólico, ciertas especies de levaduras silvestres pueden producir metabolitos que afectan negativamente las características organolépticas del producto final, motivo por el cual históricamente se ha evitado su presencia en el proceso de vinificación. Actualmente este concepto está siendo revisado.

En muchas bodegas aún se conserva la práctica de sulfitar el mosto para inhibir las levaduras silvestres. La levadura cultivada es resistente al sulfitado y se adiciona como cultivo de iniciación a partir de un cultivo puro desarrollado en jugo de uva esterilizado o pasteurizado. Durante las etapas iniciales hay aire en el líquido y se efectúa un crecimiento aeróbico de la levadura, después a medida que se acaba el aire y se desarrollan condiciones anaeróbicas se inicia la producción de alcohol.

Luego se realiza el trasiego. El vino se separa del sedimento, que contiene la levadura y el precipitado orgánico y se almacena a menor temperatura para el añejamiento, desarrollo del aroma y clarificación posterior.

La clarificación final se puede acelerar por adición de sustancias denominadas agentes refinantes, o bien se filtra a través de tierras de diatomeas, asbestos o filtros de membrana.

Entonces el vino se embotella y se guarda para ser envejecido o comercializado. Por lo común el vino tinto se añeja durante varios años después de embotellado, pero el vino blanco se comercializa sin añejarlo por largos períodos.

Durante el proceso de envejecimiento ocurren cambios químicos complejos que dan como resultado un mejoramiento del sabor, olor (o aroma) y/o bouquet.

I.3. Antecedentes de elaboración de vinos de frutas

La mayor parte del vino se elabora a partir de uvas y a menos que se especifique otra fuente, la palabra **vino** se refiere al producto que resulta de la fermentación del jugo de uva (Brown *et al.*, 1989).

La manufactura de vinos de otras frutas distintas de la uva es muy popular en muchos países del norte europeo donde las condiciones climáticas impiden el desarrollo de la vitivinicultura, especialmente en Polonia, Rusia y Alemania. En Gran Bretaña sólo una pequeña cantidad es producida a escala comercial, pero es muy común la elaboración casera artesanal de vinos de distintas frutas. En los distintos países se usan diferentes frutas para tal fin.

La Asociación de Productores de Sidra y Vinos de Frutas de la Comunidad Económica Europea (CEE) define los vinos de frutas de la siguiente manera:

“Vino de fruta: bebida alcohólica obtenida por la fermentación parcial o completa de jugos de frutas frescos, jugo concentrado o reconstituido; o macerado de pulpa con la adición de agua, azúcar o miel. Finalizada la fermentación se puede adicionar jugo fresco, concentrado o reconstituido”.

“Los vinos de frutas tendrán una concentración alcohólica comprendida entre 8 y 14 % (gramos / 100 mL). Pueden ser sin carbonatar o carbonatados por la inyección de CO₂ o por fermentación secundaria.” (Jarvis, 1996).

En cuanto a los vinos cítricos, los conocimientos más actualizados que se tienen sobre su elaboración son de Turquía y los países asiáticos (China, Japón, Corea), entre los cuales se pueden citar los estudios sobre la producción de vino de naranja realizados por Arici and Yucel, (1994) en China; el aislamiento e identificación de levaduras para la producción de vino de naranja de Young-Hwan-Ko *et al.* (1997) en Corea; estudios básicos de las técnicas de producción de vino de naranja de Yuo-Young-Wang and Guo-Qing-He (2000) en China; estudios de los componentes del flavor en vinos de naranjas variedad Kozan y el efecto del color de las botellas y las condiciones de almacenamiento sobre el amarronado de vino de naranja, ambos de Selli *et al.* (2002-2003) en Turquía.

Sin embargo, hay antecedentes bibliográficos que datan de muchos años, tales como los de Hendrickson y Kesterston (1965) que describen los subproductos que se pueden aprovechar de la manufactura de los cítricos, entre ellos vinos de pomelo y naranja, citando un trabajo de von Loesecke de 1936. En este último, se expresa que si bien el jugo de estos cítricos puede ser convertido en vino de sabor y aroma agradables, se requiere la adición de azúcar y condiciones de elaboración cuidadosamente controladas.

Braverman en *Los agrios y sus derivados* (1952), menciona y describe los pasos para obtener los **vinos de agrios**, a los cuales define como productos obtenidos por fermentación con levaduras vínicas, de zumos procedentes de frutas maduras de las variedades menos ácidas, adicionadas de azúcar, con el fin de obtener vinos de más cuerpo y menos ácidos. En *Handbook of Citrus by-products and Processing Technology* (Braddock, 1999), en el capítulo “Bioconversion products” también nombra los vinos cítricos, pero no especifica el proceso para su elaboración.

En la bibliografía específica de procesos biotecnológicos y elaboración de vinos, si bien en general hay un apartado sobre vinos de distintas frutas, no hay información sobre variables de los procesos tecnológicos, levaduras usadas, características fisicoquímicas y sensoriales de los productos. Dentro de esta bibliografía cabe señalar: *Fabricación de vinos de Vogt* (1971); *Introducción a la biotecnología de Brown et al.* (1989), *Biotecnología de la fermentación de Ward* (1991); *Bebidas: Tecnología, Química, Microbiología, de Varnam y Sutherland* (1997).

Más recientemente, autores como Kolb (2002) han recopilado prácticas artesanales así como también algunos aspectos industriales sobre la producción de “bebidas similares al vino” a partir de frutas, pero concretamente sobre vino de naranja es poco lo que explica, haciendo hincapié sólo en el hecho de la diferencia en la obtención del zumo de esta fruta para su posterior fermentación. Destaca además que al igual que el zumo de piña, el de naranja ofrece la gran dificultad de su contenido en ácido cítrico que puede ser metabolizado por diversas bacterias, las cuales obstaculizan la fermentación alcohólica.

La escasa disponibilidad de datos sobre la tecnología de elaboración y las características fisicoquímicas y sensoriales del vino de

naranja imposibilita cotejar los resultados obtenidos con productos similares; por lo cual se hizo necesario adaptar las prácticas enológicas y comparar los resultados del producto elaborado, principalmente con los vinos de uva de los cuales existe profusa bibliografía; y con vinos de otras frutas, tales como el kiwi (Soufleros *et al.*, 2001) y mango (Obisanya *et al.*, 1987).

Los vinos de kiwi son muy importantes en la economía de Grecia, por la gran producción de esta fruta, lo que hace que aquellas consideradas de descarte se usen como materia prima para la producción de vinos (Luh and Wang, 1984). La información actual sobre técnicas de elaboración de este producto ha sido reportada por Soufleros *et al.*, 2001.

I.4. Justificación

En Argentina, una de las zonas citrícolas más importante se encuentra localizada en la región llamada Mesopotamia, específicamente en la franja de suelos arenosos existentes sobre la margen del río Uruguay, en los Departamentos de Concordia, Federación y norte del de Colón de la provincia de Entre Ríos, continuando al norte hacia la provincia de Corrientes. Su producción especialmente de naranjas y mandarinas, reviste gran importancia desde el punto de vista económico para la región.

Particularmente, de las diferentes variedades cultivadas de naranjas merecen destacarse la Newhall y Washington Navel (ombligo), Salustiana (común) y Valencia.

La producción estimada en toneladas / año para la naranja en los años que van de 2000 a 2002 fue: 789.000, 913.500, y 780.000 (estimado), respectivamente. Es de hacer notar que en general la producción ha ido en aumento a pesar de la importante reducción en la zafra de 2002. Esta merma se dio especialmente en las variedades tardías tal como la naranja Valencia.

A los efectos de utilizar una materia prima típica de la zona para obtener un nuevo producto, adaptando tecnologías usadas en enología, se desarrolló el presente estudio, cuyos Objetivos y Plan de trabajo se describen a continuación:

II OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Objetivos generales:

- Estudiar el comportamiento tecnológico de distintas especies de levaduras aisladas de la flora epifítica de la naranja en paralelo con una levadura vínica comercial, utilizando mostos preparados con jugo fresco de naranja, jugo concentrado reconstituido y jugo pasteurizado.
- Obtener diferentes vinos de naranja usando, por un lado, las levaduras aisladas más adecuadas y, por otro, la levadura comercial.
- Comparar entre sí los productos obtenidos para establecer cuál de las levaduras utilizadas y qué condiciones de proceso rinden el vino de naranja con mejores características.

Objetivos específicos:

- Aislar levaduras de la flora epifítica de al menos 4 variedades de naranjas para utilizarlas como inóculos para la obtención de vino de naranja.
- Adaptar dichos aislamientos en paralelo con una levadura vínica comercial a mostos preparados a partir de jugo de naranjas recién exprimidas, jugo pasteurizado y jugo concentrado reconstituido, para encontrar las condiciones óptimas de desarrollo.
- Definir las condiciones de cultivo para la obtención de biomasa de la/s levaduras/s seleccionada/s.
- Establecer las condiciones del proceso de fermentación de los mostos de naranja y seleccionar la/s levaduras/s más apropiadas para la fermentación a los efectos de obtener fundamentalmente una bebida agradable y de baja graduación alcohólica.

Para alcanzar los objetivos propuestos se cumplimentó el siguiente diseño experimental:

1.- Estudio ecológico de levaduras de la flora epifítica de 4 variedades de naranjas obtenidas de la región citrícola enterrerriana durante

la zafra 2000; y selección de especies aptas para la elaboración de vino de naranja teniendo en cuenta sus propiedades funcionales.

2.- Adaptación de una *Saccharomyces cerevisiae* aislada de jugo de naranja fermentado en paralelo con una *Saccharomyces bayanus* (comercial) a tres tipos de mosto de naranja: jugo fresco, jugo pasteurizado y jugo concentrado reconstituido.

3.- Determinación de los requerimientos nutricionales de *S. cerevisiae* a los efectos de obtener biomasa.

4.- Obtención de biomasa por sistema batch. Comprobación del efecto Crabtree.

5.- Obtención de biomasa por fed-batch. Cálculo de rendimientos.

6.- Determinación de las características de calidad y enológicas de la biomasa obtenida.

7.- Fermentación de los mostos usando las dos levaduras, *S. cerevisiae* y *S. bayanus* IOC 18-2007, dos pHs: 3,5 y 4 y dos temperaturas de proceso: 10°C y 20°C sobre los tres mostos de naranja, jugo natural, jugo pasteurizado y jugo concentrado reconstituido.

8.- Seguimiento de la evolución de algunos parámetros químicos y microbiológicos desde la inoculación hasta la obtención del vino joven.

9.- Ensayos de maduración a dos temperaturas 10°C y 20°C durante 120 días y caracterización química y microbiológica del producto final.

10.- Aplicación de un diseño experimental, para seleccionar las condiciones de elaboración más favorables para la obtención de un vino de naranja aceptable.

**PRIMERA PARTE:
ECOLOGÍA DE LEVADURAS VÍNICAS,
SELECCIÓN Y ADAPTACION A MOSTOS
DE JUGO DE NARANJA**

CAPÍTULO 1
AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN,
SELECCIÓN DE LEVADURAS
AUTÓCTONAS
DEL JUGO DE NARANJA NATURAL Y
FERMENTADO

1.1.- INTRODUCCIÓN

La transformación del mosto en vino es un proceso espontáneo llevado a cabo por las levaduras, principalmente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. El origen de éstas constituye un tema controvertido, tradicionalmente se asumía que todas las especies involucradas en la fermentación vínica provenían de la superficie de la uva. Algunos estudios posteriores evidencian que sólo especies de *non Saccharomyces* están presentes en la superficie de la fruta, mientras que *S. cerevisiae* proviene fundamentalmente del entorno de las bodegas (Torija *et al.*, 2002).

Sin embargo, actualmente los procesos de producción de vino tienden al uso de cultivos iniciadores con lo cual la fermentación es más rápida y predecible. Para obtener vinos de buena calidad, agradables y sin defectos sensoriales es importante conocer cual es el rol que juegan las levaduras en la fermentación. En el mercado hay una gran variedad de levaduras vínicas pero éstas no siempre pueden ser usadas con idéntico resultado, por lo cual cada vez más se seleccionan cepas autóctonas para utilizarlas como estándar. Ellas se adaptan con mayor facilidad a los mostos y se obtienen vinos con características específicas (Walker, 1999).

La selección de levaduras nativas requiere del aislamiento e identificación de las levaduras asociadas a procesos fermentativos espontáneos como etapas previas al proceso de selección sustentado en la evaluación de ciertas propiedades tecnológicas indicativas de su potencial capacidad para uso enológico (Pérez *et al.*, 1999).

El estudio del origen de las levaduras en la industria vínica puede ser dividido en dos partes:

- Los viñedos, los cuales constituyen un ecosistema natural influenciado por las prácticas de cultivo y
- Las bodegas asociadas con la fermentación del mosto, el almacenaje y posterior envasado de los vinos.

Los viñedos: Son pocos los estudios realizados sobre la ecología microbiana de los viñedos comparados con los realizados sobre el mosto y la fermentación, además es necesario el uso de un muestreo adecuado, técnicas de pre-aislamiento, métodos de enriquecimiento, medios de

cultivo para aislamiento y tiempo de incubación perfectamente coordinados. Esto dificulta el conocimiento de la ecología microbiana de la uva (Martini *et al.*, 1996).

En términos generales la información disponible sobre los viñedos se puede resumir así:

- 1) Los niveles de microorganismos en uvas maduras están comprendidos entre 10^3 - 10^5 UFC/g y consisten mayoritariamente de varias especies de levaduras, bacterias del ácido láctico y del ácido acético (Fleet, 1999) y hongos filamentosos.
- 2) Las fuentes de levaduras y microorganismos afines incluyen todo el entorno de la vid como el suelo, el aire, otras plantas y animales vectores (Davenport, 1974).
- 3) Los insectos son el principal vector para el transporte de las levaduras (Mortimer and Polsinelli, 1999).
- 4) La colonización por levaduras en las uvas está influenciada principalmente por el grado de madurez (Rosini *et al.*, 1982).
- 5) La ocurrencia y desarrollo de microorganismos sobre la piel de las uvas es afectada por lluvia, temperatura, variedad de fruta y aplicación de agroquímicos (Davenport, 1974; Van der Westhvizen *et al.*, 2000 b; Sabate *et al.*, 2002).
- 6) Las levaduras están mayoritariamente sobre la superficie de las uvas en los lugares donde hay secreciones de las frutas. Otra fuente es la capa cerosa que posibilita la adherencia de las células microbianas y su colonización (Belin, 1972).
- 7) Las levaduras de la clase *Basidiomycetes* (oxidativas), de las cuales enológicoamente interesan las *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Filobasidium* son mayormente encontradas en el ambiente de los viñedos (suelo, corteza, hojas, uvas) así como también *Aureobasidium pullulans*, el cual es habitual en la piel de la uva (Davenport, 1974; Sabate *et al.*, 2002).
- 8) Las levaduras apiculadas, como *Hanseniaspora* y *Kloeckera spp.* y levaduras oxidativas mayormente *Candida*, *Pichia* y *Kluyveromyces* predominan en las uvas maduras.
- 9) La levadura vínica por excelencia, *S. cerevisiae*, contrariamente a lo esperado está virtualmente ausente sobre la uva y es necesario el análisis de un número importante de muestras para recoger aproximadamente 1 en 1000 (Mortimer and Posinelli, 1999,

revisado por Fleet *et al.*, 2002). El origen de *S. cerevisiae* es todavía muy discutido y para lograr mayores precisiones sería necesario mejorar las técnicas de muestreo. En efecto, la diseminación de las levaduras en la superficie de las uvas es muy variable, generalmente están en una población tan baja como 10 – 100 UFC/g y se hace necesario aislarlas en medios de enriquecimiento (Fleet *et al.*, 2002; Mannazzo *et al.*, 2002).

Por otro lado la microbiología de las uvas dañadas es poco conocida, pero está asociada a la presencia de especies fermentativas (Mortimer and Posinelli, 1999). Esta asociación sugiere que *S. cerevisiae* al ser una levadura fermentativa también se encontrará más fácilmente en las uvas sobremaduras. Además como ya se dijo para recuperar especies de levaduras de la superficie de las uvas son necesarios medios de cultivo selectivos y largos períodos de incubación (Florenzano *et al.*, 1997).

Las bodegas: Las áreas donde se podrían recuperar levaduras vínicas durante la elaboración de los vinos son fundamentalmente la zona de fermentación y crianza. Aquí el estudio de la ecología microbiana confirma que las poblaciones levaduriformes son distintas a las respectivas poblaciones de las uvas, particularmente por la proporción de *S. cerevisiae* (Martini, 1993; Vaughan and Martín, 1995). Por este motivo algunos autores denominan a *S. cerevisiae* como la “primer especie de levadura domesticada”.

Estos conocimientos se pueden extrapolar al estudio ecológico de las frutas cítricas y su entorno.

Una zona con predominancia de producción cítrica puede ser considerada como un ecosistema en el que las plantaciones y los microorganismos del suelo constituyen su biocenosis. El proceso de aclimatación de las distintas variedades de citrus a los factores ecológicos de la zona de producción, evoluciona paralelamente a la aparición de determinadas especies de bacterias, levaduras y mohos que del ambiente pasan a los frutos, las que constituyen la microflora epifítica (Doores, 1987).

La población microbiana primaria o nativa de las frutas está compuesta por los microorganismos adheridos a su superficie por fuerzas interactivas entre la estructura vegetal y la pared celular de los microorganismos. Esta microflora constituye una cubierta microbiana

estable con el tiempo, pero que difiere con el área geográfica, condiciones climáticas, tratamientos con agroquímicos y aún en las distintas partes de una misma fruta.

Por otra parte, hay una microflora secundaria proveniente de fuentes externas tales como agua, viento, insectos, pájaros, contaminación por roedores, etc., la cual puede ser depositada en la superficie de la fruta y puede variar no sólo de una plantación a otra sino también de una planta a otra dentro de la misma plantación y entre distintas frutas del mismo árbol. Por último, están aquellos microorganismos que pueden contaminar las frutas durante su recolección, almacenamiento e industrialización.

La cáscara de las frutas constituye una barrera protectora contra la invasión microbiana hacia los tejidos internos. El proceso de lavado de la fruta sana, que tiene lugar previo a la extracción del jugo elimina mayoritariamente a la flora secundaria y en mucho menor medida a la primaria (Storey and Treeby, 2000). De este modo, restos de la flora primaria pasa al jugo conformando con el mismo un microecosistema. Este está compuesto por tres elementos: físico, químico y biológico, los cuales están en una estrecha y armónica interrelación dinámica y evolucionan desde una base poco estable (organolépticamente dulce) a una etapa más estable (organolépticamente ácido-alcohólica).

Los jugos cítricos poseen una relativamente elevada actividad acuosa (a_w), mediano porcentaje de azúcares y alto de ácidos orgánicos lo cual redundan en un bajo pH. Todos estos factores combinados conducen a que se desarrollen fundamentalmente levaduras, especialmente de los géneros *Candida*, *Zigosaccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces* y *Pichia*, y microorganismos acidófilos tales como bacterias del ácido láctico (*Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*) y bacterias acéticas (*Acetobacter* y *Gluconobacter*) (ICMSF, 1990; Parish and Higgins, 1989).

Las transformaciones que sufre el jugo pueden determinar una alteración desde el punto de vista físico, químico y sensorial. Estas transformaciones son consecuencia de las actividades de las distintas especies microbianas, que algunas veces se alternan, y en otras son simultáneas. Hay casos en los cuales las diferentes especies actúan con efecto sinérgico y, en otros, en los que su desarrollo se obstaculiza mutuamente.

Por otra parte, los microorganismos, a través de sus múltiples y variadas actividades, se insertan de modo determinante en los procesos de producción de diversos productos a partir de substratos azucarados, como son los jugos de frutas.

Actualmente, existe la posibilidad de obtener el así llamado "**vino de naranja**" (Jarvis, 1996), como alternativa a su comercialización como tal, por fermentación del jugo de naranja. Por ello, en esta parte del presente trabajo, se realizó el aislamiento y análisis de la flora epifítica levaduriforme en jugos de distintas variedades de naranjas de la zona. Para ello se utilizaron por un lado jugos frescos, y por otro jugos fermentados en forma espontánea en sus diversos estadios, o sea en la primera etapa, tumultuosa y en las posteriores, lentas.

A los efectos de seleccionar levaduras vínicas se consideraron tres aspectos esenciales: taxonómico, ecológico y tecnológico. El aspecto taxonómico permite identificar las especies de levaduras que conforman la flora primaria. El estudio ecológico se realiza para conocer la distribución de tales especies en las distintas variedades de naranjas ensayadas y en los distintos estadios de fermentación. Finalmente, las pruebas tecnológicas ponen de manifiesto las propiedades funcionales más destacables de cada una de las especies de levaduras que pudieran ser de interés en el desarrollo del proceso biotecnológico de obtención de una bebida alcohólica.

En las tecnologías vínicas, por definición, las propiedades requeridas, por levaduras de la especie *S. cerevisiae* para considerarlas como "iniciador seleccionado para la vinificación" son dos:

- Propiedades primarias, definidas como las estrictamente relacionadas con la formación de alcohol etílico por fermentación.
- Propiedades secundarias que son aquellas relacionadas con la producción de compuestos que afectan otros parámetros tales como cuerpo, producción de alcoholes superiores y la aparición de aromas indeseables (off flavors) (Martini, 2003).

Con el objeto de aislar levaduras de la microbiota de jugo de naranja y seleccionar aquellas con características relevantes como para ser usadas en la elaboración de vino de naranja, se diseñó un protocolo experimental, que incluye aislamiento, identificación por los métodos taxonómicos tradicionales y determinación de las propiedades enológicas

primarias, dejando para otra etapa de este mismo estudio el análisis de las propiedades secundarias.

1.2.- MATERIALES Y METODOS

1.2.1.- Muestreo de la fruta

Se estudiaron las microfloras de naranjas de variedades Navelina, Newhall, Salustiana y Washington Navel obtenidas de siete quintas de la zona, distribuidas de la siguiente manera: las variedades Navelina y Newhall se obtuvieron de dos quintas del Departamento Concordia, la Salustiana se obtuvo de una quinta del Departamento Federación y la W. Navel de una quinta del Departamento Federación y de cuatro del Departamento Concordia.

El período de muestreo correspondió al ciclo de maduración de las distintas variedades según se indica en Tabla 1.2.1. Cabe acotar que el número de muestras de la variedad Newhall fue menor ya que ésta es una variedad nueva y escasa, que recién se está plantando en la región estudiada.

Tabla 1.2.1. Calendario de muestreo de las 4 variedades de naranjas estudiadas

Mes Variedad	<i>Mar.</i>	<i>Abr.</i>	<i>May.</i>	<i>Jun.</i>	<i>Jul.</i>	<i>Ago.</i>	<i>Sept.</i>	<i>Oct.</i>	<i>Nov.</i>	<i>Dic.</i>
<i>Navelina</i>										
<i>Newhall</i>										
<i>Salustiana</i>										
<i>W. Navel</i>										

1.2.2.- Preparación de las muestras

Las naranjas, previamente lavadas con agua potable, se cortaron y exprimieron manualmente, con exprimidor de piña, procesándose de a una variedad por vez. El jugo recién obtenido se recibió en recipientes estériles, en condiciones asépticas. Los análisis se realizaron

transcurridas 2 h de obtenida la muestra de jugo a fin de adaptar la flora epifítica de la cáscara al nuevo ecosistema.

Las muestras de jugo fermentado se prepararon a partir de 1000 mL de jugo natural, obtenido de la forma mencionada anteriormente. Se fraccionaron a razón de 250 mL en matraces de Erlenmeyer de 500 mL con tapón de algodón, a la mitad de los cuales les fue adicionada sacarosa comercial en cantidad suficiente para alcanzar 16 °Brix. Se incubaron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, en condiciones estáticas, a fin de que se produzca una fermentación espontánea predominantemente anaeróbica, efectuándose los análisis microbiológicos en tres momentos diferentes:

1. A las 24 h, al comienzo del desprendimiento de CO_2 , cuando las condiciones aeróbicas declinaban por consumo del O_2 disuelto en el jugo.
2. A las 48 h, durante la fermentación tumultuosa.
3. Hacia el final de la fermentación, aproximadamente 10 días de iniciado el proceso.

1.2.3.- Aislamiento de levaduras

1.2.3.1.- Jugo natural: Se tomaron alícuotas de 1 mL de cada jugo natural examinado, y se sembraron por triplicado con el método de cultivo por extendido en placa. Los medios de cultivos utilizados para todo el procedimiento fueron Agar extracto de malta (Merck, Argentina) (MEA), Agar extracto de levadura-glucosa-cloranfenicol (Merck, Argentina) (YGC) y Agar Sabouroud (Difco, USA) con 4 % de glucosa (ASG).

Las placas inoculadas conteniendo los 3 medios (MEA, YGC y ASG) se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 3 días. Finalizado este período se procedió a examinar macro y microscópicamente a las colonias desarrolladas, procediéndose a reaislar en ASG a todas aquellas levaduras que presentaron alguna diferencia entre ellas (por ejemplo: tamaño, forma y color de colonias, forma, tipo de agrupación y tamaño de las células, etc.). Esto derivó en 63 aislamientos que se sembraron en tubos con MEA y ASG. Los cultivos con MEA (en agar recto) se cubrieron con vaselina estéril y se conservaron a 4°C . Los cultivos en

ASG fueron utilizados para la clasificación de los aislamientos. (Figura 1.2.1).

1.2.3.2.- Jugo fermentado: Se tomaron alícuotas de 1 mL de cada muestra de jugo fermentado en cada una de las tres etapas de fermentación citadas previamente, se sembraron por triplicado en YGC, procediéndose a la incubación y posterior aislamiento de igual manera que para el jugo natural (Figura 1.2.2)

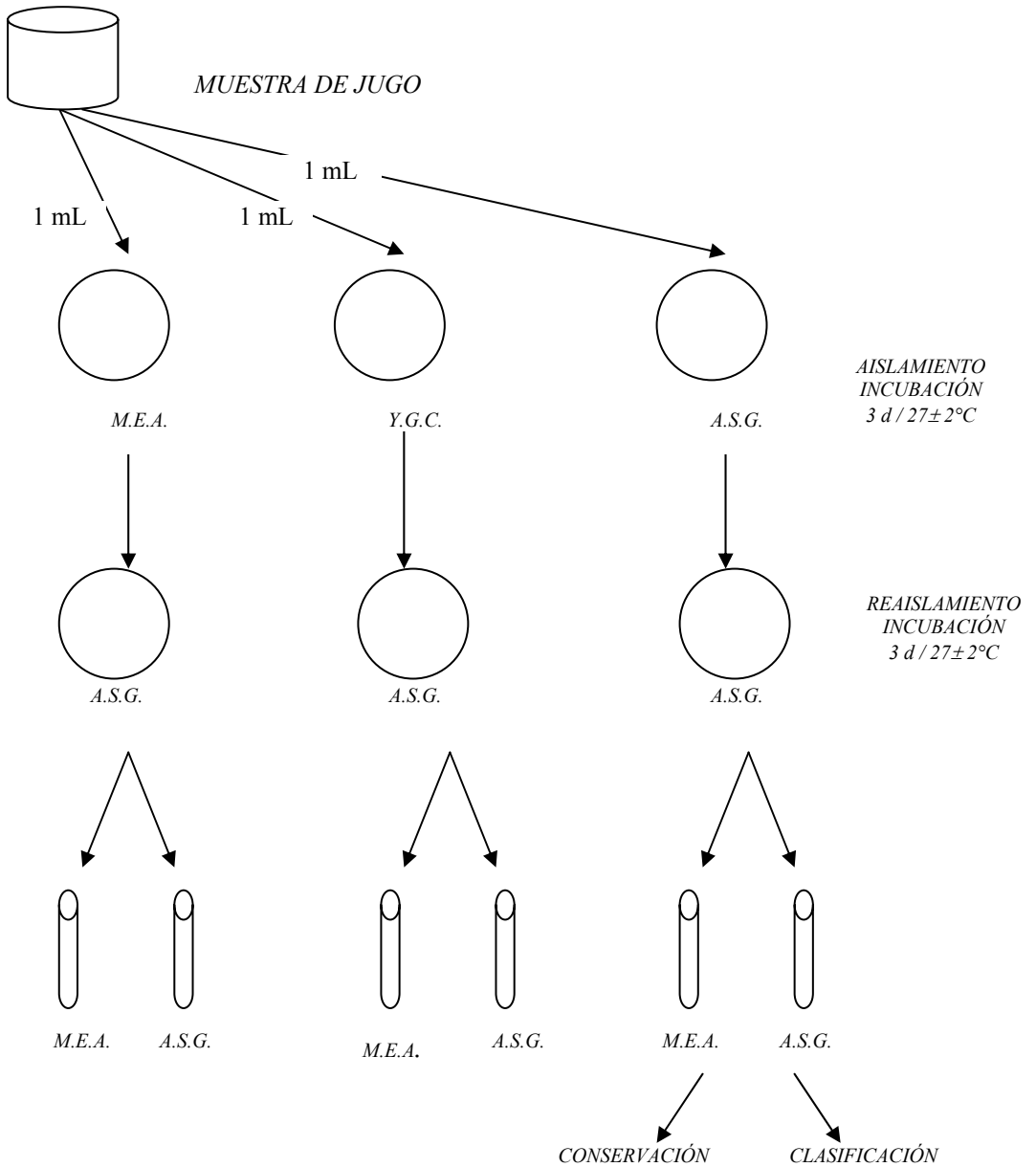


Figura 1.2.1. Aislamiento de la microflora del jugo de naranja natural.

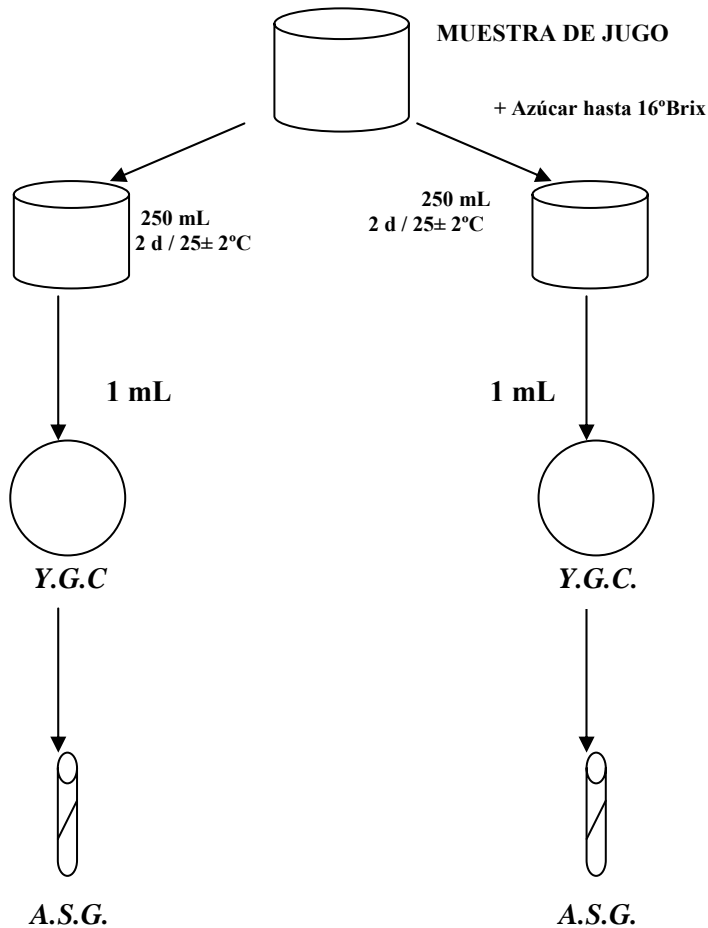


Figura. 1.2.2. Aislamiento de la microflora del jugo de naranja fermentado.

1.2.4.- Caracterización e identificación de levaduras

La identificación taxonómica de las levaduras aisladas se hizo mediante la utilización del kit comercial Yeast ID 32 C (bio Mérieux SA, Francia). Este kit se fundamenta en la asimilación (o no) de 32 fuentes de carbono diferentes. Consiste en tiras con 32 hoyuelos, 30 de los cuales contienen los respectivos sustratos carbonados deshidratados, 1 contiene

solución al 0,01 % de cicloheximida y otro está vacío como control. Se prepara una suspensión de la levadura problema en agua destilada estéril de modo de alcanzar una concentración de biomasa equivalente a 2 unidades turbidimétricas de la escala de McFarland. De esta suspensión se transfieren 250 μL al C médium (provisto por el kit) que posee todos los componentes necesarios para el desarrollo de la levadura excepto la fuente de carbono y energía a ser ensayada. A su vez, de esta nueva suspensión se transfieren 135 μL en cada hoyuelo, se tapa y se incuba a 30°C, durante 24-48 h, dentro de una caja hermética humectada convenientemente para evitar la desecación de las muestras. La lectura de los resultados se hace mediante la determinación visual de desarrollo o no en cada hoyuelo, ingresándose los mismos a una tabla de datos. Los resultados obtenidos fueron procesados con el programa APILAB PLUS.

El estudio taxonómico se completó siguiendo el método de la escuela holandesa de Kreger van Rij (Campbell and Duffus, 1988). También se realizaron las pruebas complementarias recomendadas por el programa de identificación antedicho, a saber:

a) Crecimiento en MEA, 3 días a 25°C, para la observación de la macro- y micromorfología de las colonias.

b) Crecimiento en Caldo extracto de malta (MEC, preparado en el laboratorio), 3 días a 25°C, para la observación del método de multiplicación.

c) Crecimiento en Agar de Gorodkova (AG), según Harrigan y Mac Cance (1979) y Agar con 0,5 % de acetato de sodio (AA), según Smith (1963), ambos preparados en el laboratorio, 2 semanas a 25°C, para el examen de esporas.

d) Crecimiento sobre portaobjetos en Corn Meal Agar (CMA, Baltimore Biological Laboratory, USA), 3 días a 25°C, para la observación de micelio, pseudomicelio y/o artrosporos.

e) Crecimiento en Agar glucosa-nitrato (preparado en el laboratorio según Smith, 1963), 3 días a 25°C, para determinar la habilidad de utilizar nitrato como única fuente de nitrógeno.

f) Fermentación de azúcares con formación de gas en caldo con 0,1 % de $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ (preparado en el laboratorio según Harrigan y Mac Cance, 1979) adicionado de los azúcares: glucosa, fructosa, sacarosa,

maltosa, galactosa, lactosa (todas Carlo Erba) o rafinosa (Merck), 3 días a 25°C.

Finalmente, se ensayaron las siguientes propiedades funcionales de las levaduras aisladas mediante el estudio de: a) Poder fermentativo del mosto preparado a partir de jugo de naranjas. b) Desarrollo en presencia de etanol, a saber:

a) Poder fermentativo sobre mosto de naranja. El mosto fue preparado a partir de jugo de naranjas ajustado con sacarosa comercial a 12 °Brix, esterilizado a 121°C, 15 min. Incubación: 30 días a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ (Suárez e Iñigo, 1992).

Ensayos preliminares de capacidad fermentativa se realizaron de igual manera, pero inoculando 250 μL de cultivos en fase estacionaria con campanitas Durham para recoger el CO_2 liberado y hacer una estimación semicuantitativa basada en la cantidad de CO_2 liberado. Los resultados se expresaron en una escala de cuatro (4) ítems:

Muy débil: gas en el 10 % de la campanita Durham.

Débil: gas en el 25 % de la campanita Durham.

Buena: gas en el 50 % de la campanita Durham.

Muy buena: gas en el 75 % de la campanita Durham.

b) Desarrollo en presencia de etanol de acuerdo a la técnica de Stelling Deker (Suárez e Iñigo, 1992). La técnica consiste en evaluar el crecimiento de la levadura en estudio en medio sintético adicionado de etanol como única fuente de carbono. Las levaduras fueron inoculadas en tubos de 10 mL conteniendo porciones de 4 mL de medio líquido (1 % extracto de levadura + 2 % peptona + 2 % dextrosa) e incubados durante 2 días a 22°C ó 37°C. Se inocularon porciones de 10 μL en tubos de 10 mL conteniendo 4 mL de medio y suplementado con 10, 15, o 18 % v/v de etanol, se incubó de igual manera. Los resultados se expresaron para cada uno de los porcentajes de etanol agregados como: negativo, débilmente positivo y positivo, mediante evaluación de la DO_{625} de los cultivos.

Aunque estas últimas pruebas tienen escaso valor taxonómico, en general, para las levaduras "vínicas" sí lo tienen y, sobre todo, constituyen un recurso de gran importancia y significado biotecnológico.

1.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1.-Aislamiento de levaduras a partir de jugo natural.

El screening en placas de Petri sobre MEA, YGC y ASG de jugo natural demostró la presencia de los microorganismos mesófilos que conforman la flora primaria de la fruta. El MEA fue empleado debido a que es generalmente recomendado particularmente para la conservación de levaduras (Smith, 1963; Heard and Fleet, 1986). El agar YGC es muy útil para la enumeración y el aislamiento de levaduras debido a la presencia de cloranfenicol como inhibidor del crecimiento bacteriano. Finalmente, el agar ASG es tradicionalmente empleado para el aislamiento de levaduras.

Los recuentos de colonias mostraron una tendencia creciente con la época de cosecha de la fruta. Es así que los recuentos para las variedades Navelina y Newhall oscilaron entre 30 y 60 UFC/mL, en tanto que para Salustiana los mismos rondaron las 100 UFC/mL y para W. Navel ascendieron al rango de 250-350 UFC/mL. No se encontró una razón clara para explicar este fenómeno, aunque podría deberse a razones climáticas. Una menor incidencia de radiaciones solares (asociadas a un efecto germicida de las radiaciones ultravioletas) durante la época de maduración de las variedades tardías podría tal vez explicar este fenómeno (Storey and Treeby, 2000).

Del estudio macroscópico de las colonias crecidas en estos medios y de su posterior examen microscópico se demostró la presencia de cocos, bacilos y levaduras. Los mohos se hicieron visibles en muy raras ocasiones, probablemente debido al corto período de incubación, lo cual favoreció el posterior aislamiento de las levaduras. La mayor recuperación de levaduras se obtuvo cuando se usó como medio de aislamiento el YGC (89 colonias), seguido por el ASG (65 colonias) y, en último lugar, el MEA (23 colonias). En este último se obtuvieron la mayoría de las veces, mezclas de colonias de bacterias, levaduras y mohos.

Del total de muestras analizadas se aislaron 63 cultivos de levaduras. De estos, 5 provinieron de la variedad Navelina, 5 de la Newhall; 24, de la Salustiana y 29 de la W. Navel. Nuevamente, aquí se

observa igual tendencia en el número creciente de levaduras con la época de cosecha de la fruta tal como se ha mencionado anteriormente.

El estudio taxonómico se realizó sobre 13 cultivos de los 24 correspondientes a Salustiana, 15 de los 29 de W. Navel, 2 de los 5 de Newhall y 2 de los 5 de la Navelina. El resto de los cultivos, que no se clasificaron taxonómicamente, se conservaron para estudios posteriores.

Todas las levaduras estudiadas, salvo 2 que no se lograron identificar; fueron clasificadas como pertenecientes a 5 géneros (*Candida*, *Cryptococcus*, *Kloeckera*, *Trichosporum* y *Rhodotorula*) y, dentro de ellos, a 9 especies. En la Tabla 1.3.1 se observan los resultados obtenidos mediante el kit ID 32 C, que permitieron identificar las especies; con sus correspondientes valores de porcentaje de identificación. Las características de tales especies (Kreger van Rij, 1984) se presentan en la Tabla 1.3.2.

Resultó sumamente difícil inducir la esporulación de los cultivos estudiados, por lo cual se adoptó el criterio de nombrar las especies con el nombre correspondiente a su estado imperfecto (anamorfo), a pesar de que muchas de ellas poseen un teleomorfo o estado perfecto conocido. Así *Candida famata* anamorfo de *Debaryomyces hansenii*, *Candida lusitaniae* anamorfo de *Clavispora lusitaniae*, *Candida guilliermondii* anamorfo de *Pichia guilliermondii*, *Kloeckera apiculata* anamorfo de *Hanseniaspora uvarum* (Pitt and Hocking, 1987).

La distribución de las especies presentes en los jugos de las distintas variedades de naranjas se consigna en la Tabla 1.3.3. En las variedades Salustiana y W. Navel se observa que las levaduras del género *Candida* son las que se han encontrado en mayor proporción con respecto a las de los otros géneros.

Si bien en los jugos naturales, no se logró aislar una levadura "vínica" verdadera, todas las que fermentaron glucosa y/o fructosa y/o sacarosa fueron sometidas a 2 ensayos tecnológicos: a) fermentación de mosto de naranjas y b) crecimiento en etanol como única fuente de carbono y energía, como se describe posteriormente (Tabla 1.3.4.), a los efectos de evaluar su potencial como vinificadoras.

1.3.2.- Aislamiento de levaduras a partir de jugo fermentado.

Se decidió proceder a la fermentación del jugo, con y sin el agregado de sacarosa, como método de enriquecimiento de la flora levaduriforme autóctona. La fermentación sin el agregado de sacarosa se utilizó como ensayo testigo del procedimiento. Se consideró que el agregado de sacarosa al jugo, previo a la fermentación podría inducir el desarrollo de levaduras fermentadoras con propiedades adecuadas para su uso posterior en la elaboración del vino de naranja. La cantidad de sacarosa adicionada, de modo de alcanzar los 16 °Brix al inicio de la fermentación, estuvo relacionada con las potenciales características que debería poseer la flora levaduriforme a desarrollarse predominantemente durante la fermentación. Esto es, poseer cierto grado de tolerancia a concentraciones de azúcares que una vez metabolizados anaeróbicamente originen tenores de etanol aceptables para una bebida alcohólica, como es el propósito final del presente trabajo. Por otra parte, la fermentación se realizó a 25°C teniendo en cuenta que el objetivo era aislar levaduras mesofílicas adecuadas para ser utilizadas posteriormente en fermentaciones a temperaturas similares. Es dable mencionar que la resistencia de las levaduras al etanol disminuye con el incremento de temperatura (Reynolds *et al.*, 2002).

De modo que las levaduras que podrían desarrollarse a dicha temperatura obviamente serían resistentes a las concentraciones de etanol obtenidas, similares a las que deberían soportar en el proceso de vinificación.

Para el aislamiento de levaduras de los jugos fermentados se utilizó únicamente el agar YGC debido a que éste demostró ser mucho más conveniente para dicho propósito en el caso de los aislamientos a partir del jugo natural.

En la fermentación espontánea de los mostos con y sin el agregado de azúcar se observaron tres fases biológicamente diferenciadas, correspondientes a los tres estadios de análisis previamente señalados.

Son varios los estudios cualitativos que describen la sucesión de especies de levaduras que se desarrollan a lo largo de las fases de fermentación de mosto de uva. La especie *S. cerevisiae* es la dominante

del proceso, pero durante los primeros tres o cuatro días también puede ser significativo el desarrollo de levaduras de diversos géneros tales como: *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Hansenula* y *Pichia* (Heard y Fleet, 1986).

En los mostos de naranja adicionado de sacarosa, durante la **primera fase**, a las 24 h de fermentación, se recuperaron levaduras apiculadas fundamentalmente *Kloeckera* (87 %) y el resto de los aislamientos correspondieron al género *Candida* (13 %). El comportamiento de los mostos fermentados sin el agregado de sacarosa fue diferente, aislándose sólo levaduras del género *Kloeckera*.

Es sabido que *Kloeckera* necesita de mayores concentraciones de oxígeno para desarrollarse condición ésta que sólo se presenta al inicio de la fermentación. Todas las levaduras apiculadas tienden a formar una capa de biomasa en la superficie de medios líquidos, la cual a su vez dificulta la transferencia de oxígeno, que de por sí es muy baja por la falta de agitación impuesta de ex profeso a fin de crear las condiciones de anaerobiosis requeridas. Además, *Kloeckera* no crece en presencia de etanol y fermenta únicamente glucosa, condiciones éstas que predominan al inicio de la fermentación.

En la **segunda fase**, correspondiente a la fermentación tumultuosa, en ambos mostos (con y sin sacarosa) el aislamiento dió como resultado un 99% de especies del género *Candida* (*C. guilliermondii* y *C. pulcherrima*). Estas levaduras crecen bien en anaerobiosis en presencia de bajas concentraciones de etanol como las que existen en esta etapa del cultivo, pero fermentan solamente a la glucosa (en este caso la residual que podría haber quedado remanente de la etapa anterior), lo cual dificulta su desarrollo en etapas posteriores del cultivo.

Finalmente, en la **tercera fase** y particularmente en el jugo adicionado de sacarosa, las levaduras dominantes fueron del género *Saccharomyces*, aproximadamente el 77 % de los cultivos correspondió a la especie *S. cerevisiae*, y el resto no se pudo identificar a nivel de especie por el método utilizado (Yeast ID 32 C).

Las levaduras de la especie *S. cerevisiae* desarrollan adecuadamente en anaerobiosis, poseen buena tolerancia al etanol y tienen la capacidad de asimilar además de glucosa y fructosa

particularmente sacarosa, azúcar predominante tanto en los jugos sin y (fundamentalmente) con el agregado de dicha fuente de carbono y energía.

Las levaduras de géneros *non Saccharomyces* identificadas por tests fisiológicos según criterio de Barnett, (2000) para la identificación fenotípica debería ser confirmada por métodos moleculares (PCR-RFLP) para detectar posibles determinaciones erróneas por fenotipo y en algunos casos para la diferenciación intraespecies (Fernández *et al.*, 1999).

Actualmente los métodos tradicionales basados en las características fisiológicas, bioquímicas o sexuales de las levaduras han sido reemplazados por otros desarrollados basándose por ejemplo en el análisis de proteínas totales, longitud de las cadenas de ácidos grasos e isoenzimas (Fleet, 1992; Loureiro and Querol, 1999). Sin embargo las pruebas fisiológicas y bioquímicas siguen siendo desarrolladas y usadas. Así, los métodos de identificación simplificados (SIM) adaptados y publicados por Deak and Beuchat, 1996, fueron recientemente muy bien empleados para levaduras aisladas de jugos de frutas (Sancho *et al.*, 2000). Velásquez *et al.*,(2001) presentaron un sistema para la identificación de levaduras en productos alimenticios, mediante el uso de kit de 10 pruebas para levaduras vínicas.

Raspor *et al.*, (2002) aislaron e identificaron levaduras vínicas de fermentaciones espontáneas de mosto de uva de la variedad Zametovka, usando el método de electroforesis en gel en campos pulsantes (PFGE). Las especies identificadas fueron confirmadas por pruebas fisiológicas sugeridas para la confirmación de especies individuales por Barnett *et al.* (2000). Por otra parte dos especies de *non-Saccharomyces* que no pudieron ser identificadas por la metodología molecular, se identificaron sólo por métodos tradicionales fisiológicos dando como resultado: *Candida stellata* y *Torulaspota delbrueckii*.

Sin embargo con respecto al uso de diferentes sistemas de identificación de levaduras, es de destacar que en el caso de *S. cerevisiae* el grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método empleado en este trabajo (Yeast ID 32C) y otros similares (SIM y API 20C) es muy alto, con lo cual podríamos asegurar que la levadura aislada en esta etapa es realmente una *S. cerevisiae* (Deak and Beuchat, 1993).

La levadura aislada también fue sometida a los dos ensayos tecnológicos mencionados previamente: a) fermentación de mosto de naranjas y b) crecimiento en etanol como única fuente de carbono y energía (Tabla 1.3.4.). Se concluyó que la *S. cerevisiae* recuperada de los jugos fermentados es típicamente alcoholígena, siendo la levadura que se seleccionó para la vinificación de jugo de naranja.

Es de hacer notar que todas las levaduras aisladas e identificadas en este trabajo, pertenecientes a la microflora del jugo de naranja, son especies similares a las encontradas en las uvas, aunque raramente son usadas en los procesos de vinificación por inoculación. Pero existen trabajos que reportan la muy buena producción de aromas por las mismas (Mamede *et al.*, 2005).

1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN -CAPITULO 1-PRIMERA PARTE - 32

Tabla 1.3.1. Identificación de levaduras según sistema ID 32 C.

Asimilación de:	<i>C. intermedia</i>	<i>C. famata</i>	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. pulcherrima</i>	<i>C. guillermondii</i>	<i>K. apiculata</i>	<i>T. mucoide</i>	<i>C. humicolus</i>	<i>R. mucilaginoso</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Galactosa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Nacetilglucosamina	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
DL-Lactato	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
Arabinosa	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-
Celobiosa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Rafinosa	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Trealosa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
2-Cetogluconato	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
α -Metil-glucósido	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Xilosa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Ribosa	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
Glicerol	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Ramnosa	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Palatinosa	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-

1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN -CAPITULO 1-PRIMERA PARTE - 33

	<i>C. intermedia</i>	<i>C. Famata</i>	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. pulcherrima</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>K. apiculata</i>	<i>T. mucoide</i>	<i>C. humicolus</i>	<i>R. mucilaginoso</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Melibiosa	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Glucuronato	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Melesitosa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Gluconato	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
Levulinato	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Lactosa	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbosa	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Glucosalina	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Resistencia a actidiona	-	-	-	-	+	+	+	-	-	
Pruebas compls.:										
Crec. a 37 °C	NR	NR	+	-	+	-	NR	NR	NR	NR
Esculina	NR	NR	+	+	-	NR	NR	NR	NR	-
Tiamina	NR	NR	-	NR	-	NR	NR	NR	NR	NR
% identificación	99,7	88,0	91,1	96,8	92,2	99,9	99,0	99,2	90,0	99,9

NR: no requerida por el programa para la identificación de la especie.

1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN -CAPITULO 1-PRIMERA PARTE - 34

Tabla 1.3.2.- Caracterización microbiológica de las de levaduras aisladas.

	<i>C. intermedia</i>	<i>C. famata</i>	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. pulcherrima</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>K. apiculata</i>	<i>T. mucoide</i>	<i>C. humicolus</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Crecimiento: M.E.A. (UFC)	Blancas, cremosas. V, S ⁽¹⁾	Blancas, brillantes. V ⁽¹⁾	Blancas. T, S ⁽¹⁾	Blancas, lobuladas. V, S ⁽¹⁾	Blancas, cremosas. T ⁽¹⁾	Pardas, opacas. S ⁽¹⁾	Opacas, rosa pálido. V, s ⁽¹⁾	Blancas, cremosas. V ⁽¹⁾	Rojas, brillantes. S ⁽¹⁾	Blancas, cremosas. V, S ⁽¹⁾
Morfología M.E.A.	(células): Esféricas.	Esféricas, ϕ : 4 μm ⁽²⁾ .	Esféricas, ϕ : 4 μm ⁽²⁾ .	Ovales aisladas. Ovales en racimos.	Gemantes, 5 μm \times 4 μm ⁽²⁾	Apiculadas.	Ovales, gemantes. Artrosporas.	Esféricas, 5 μm \times 6 μm ⁽²⁾	Elipsoidales, aisladas. De a pares.	Esféricas
M.E.C.	Gemantes.	Gemación irregular.	Gemación multipolar.		Gemantes, turgentes.	Germinación □erminal.		Gemantes, turgentes.		Gemantes
Esporas: A.A. A.G.	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	+ -
Pseudomicelio: C.M.A.	-	-	-	+	+ ⁽⁴⁾	+ ⁽⁵⁾	+ ⁽⁶⁾	-	+	+
Fermentación:										
Glucosa	+	+	+	+	d ⁽⁷⁾	+	-	-	-	+
Fructosa	+	+	+	+	d ⁽⁷⁾	+	-	-	-	+
Sacarosa	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Maltosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Galactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asim.NO ₃	-	d ⁽⁷⁾	-	-	-	-	-	-	-	-

⁽¹⁾ V: velo; S: sedimento; T: turbidez; s: sedimento escaso. ⁽²⁾ Medidas obtenidas con micrómetro objetivo. ⁽³⁾ Asca con una ascospora. ⁽⁴⁾ Pseudomicelio con blastosporos. ⁽⁵⁾ Pseudomicelio. ⁽⁶⁾ Micelio verdadero. ⁽⁷⁾ Escasa fermentación.

M.E.A.: Agar extracto de malta. M.E.C.: Caldo extracto de malta. A.A.: Agar acetato de sodio. A.G.: Agar Gorodkova. C.M.A.: Agar harina de maíz.

Tabla 1.3.3. Distribución de las distintas especies de levaduras en cuatro variedades de naranjas.

	Navelina	Salustiana	W. Navel	Newhall
<i>Candida intermedia</i>			3	
<i>Candida famata</i>		1	1	
<i>Candida lusitaniae</i>			1	
<i>Candida pulcherrima</i>	1	4	2	
<i>Candida guilliermondii</i>	1	5	5	1
<i>Kloeckera apiculata</i>		1	1	
<i>Trichosporum mucoide</i>		1		
<i>Cryptococcus humicolus</i>				1
<i>Rodotorula mucilaginosa</i>			1	
No identificadas		1	1	

Tabla 1.3.4.- Características tecnológicas de levaduras fermentativas.

	Crec. en etanol	Fermentación de mosto
<i>Kloeckera apiculata</i>	Negativo	Débil
<i>Candida pulcherrima</i>	Débil	Muy débil
<i>Candida guilliermondii</i>	Débil	Débil
<i>Candida intermedia</i>	Negativo	Buena
<i>Candida famata</i>	Negativo	Buena
<i>Candida lusitaniae</i>	Negativo	Buena
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Positivo	Muy buena

CAPITULO 2.
ADAPTACION DE *Saccharomyces spp*
A MEDIOS DE CULTIVO FORMULADOS A
PARTIR DE JUGO DE NARANJA

2.1.- INTRODUCCION

El ambiente que rodea a las bodegas está poblado de células de levaduras vivas de *S. cerevisiae*, por lo cual constituye un reservorio de diversas cepas que podrían ser usadas como estarter selecto para la vinificación. Las propiedades enológicas de las mismas son comparables a las de las cepas comerciales, sin embargo deben ser adaptadas para su buen desarrollo en los mostos (Martini, 2003).

En el caso especial de vino de naranja , no solo debe probarse la adaptación de la levadura autóctona a los mostos preparados con jugo fresco, pasteurizado y concentrado reconstituido; sino también la de la comercial, *S. bayanus*, cuyas propiedades están probadas para mostos de uva.

Para realizar los ensayos de adaptación se debe partir del conocimiento de los requerimientos nutritivos de las levaduras y verificar si los mostos cumplen con esas exigencias.

Las levaduras como microorganismos quimioheterótrofos necesitan compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía (FCE). Los glúcidos, principalmente las hexosas, son los compuestos más utilizados como FCE tanto para el metabolismo aeróbico como anaeróbico.

Si en el medio de cultivo hay disponibilidad, en concentraciones entre el 1 y 10 %, de las hexosas: D-glucosa, D-fructosa y D-manosa, *Saccharomyces sp.* metabolizará estos glúcidos, en ese orden (Kockova, 1990).

Como fuente de nitrógeno (FN), las levaduras en general, pueden utilizar tanto compuestos orgánicos como inorgánicos. Entre las fuentes naturales más usuales de los primeros se encuentran las peptonas, extractos de malta y de levadura y aminoácidos. De las fuentes inorgánicas entre otras, sales de NO_3^- , NO_2^- y NH_4^+ y urea (Garraway, 1984).

En particular, *Saccharomyces spp.* utilizan como FN no complejas a las sales de NH_4^+ y a la urea, no así al NO_3^- (Campbell and Duffus, 1988).

2.2.- MATERIALES Y METODOS

2.2.1.- Formulación del medio de cultivo y crecimiento de ambas levaduras (*S. cerevisiae* y *S. bayanus*)

A los fines de utilizar jugo de naranja en la formulación de un caldo de cultivo adecuado para el crecimiento de levaduras del género *Saccharomyces*, se procedió a la determinación de diversos parámetros en jugo de naranja de diferentes variedades obtenidos a diferentes tiempos de cosecha según se describe en el Capítulo 1, de tal forma de seleccionar una o dos variedades para tal fin.

Los análisis efectuados y los métodos utilizados fueron:

- Rendimiento en jugo, expresado en g/100 g de fruta fresca.
- pH: Potenciométricamente, con peachímetro TOA HM- 30V
- Acidez: Se determinó por titulación potenciométrica, expresando los resultados como porcentaje de ácido cítrico (AOAC, 942.15, 1984).
- Sólidos solubles totales: Se usó un refractómetro tipo Abbe ATAGO modelo DTM- y los resultados se expresaron en °Brix. Se corrigió por temperatura y acidez (Ting and Rouseff, 1986).
- Azúcares reductores directos y totales: Expresados en g/100 mL jugo (Lane-Eynon, en Ting, 1986).
- Ácido Ascórbico: Expresado en mg/100 mL jugo (AOAC 43.064, 1984).
- Nitrógeno Amínico: Expresado en mg/100 mL jugo (Ting and Rouseff, 1986).
- Nitrógeno total: Método de Kjeldahl. El resultado se expresa en miligramos de Nitrógeno Total por 100 mL de jugo (AOAC 2055, 1984).
- Flavonoides: Expresado como Hesperidina en mg/100 mL jugo por el método de Davis (Ting and Rouseff, 1986).
- Aceites esenciales: Expresado en mL/100 mL jugo (método de Scott-Veldhuis, AOAC 22088, 1984).

Una vez seleccionada la variedad de naranja para formular el medio de crecimiento se procedió a su análisis físicoquímico definitivo.

También se analizaron:

- Jugo de naranja pasteurizado. Se utilizaron naranjas de la variedad W. Navel cosechadas durante el mes de Julio. Las naranjas se exprimieron con un extractor piloto tipo FMC. El tratamiento térmico de pasteurización se realizó en batch en un concentrador piloto a 90°C durante 3,5 min. El jugo se enfrió inmediatamente y se mantuvo a 4°C bajo condiciones asépticas hasta su utilización.

- Jugo concentrado de naranja. Producido durante el mes de noviembre y obtenido de una industria de la zona que utiliza la tecnología de extracción FMC. Como la industria no tipifica el jugo concentrado por naranja de origen, no fue posible determinar exactamente a qué variedad de naranja correspondía. Sin embargo, considerando el momento del año en el cual fue obtenido, se estima que correspondió a la variedad Valencia. Originalmente el jugo poseía 65 °Brix, por lo cual para los ensayos debió ser reconstituido a 11 °Brix tal cual lo especifica el CAA (1999).

Los parámetros analizados, además de los anteriormente citados, fueron:

- Sacarosa, glucosa y fructosa: BOEHRINGER MANNHEIM/ R-BIOPHARM. Enzymatic bioAnalysis/ Food Análisis.

- Pectina: Expresada como Ácido galacturónico anhidro (AGA) en mg/100 mL jugo (método colorimétrico de *m*-hidroxidifenilo) (Blumenkrantz and Asboe, 1973).

- Carotenoides totales: Se utilizó el método colorimétrico descrito por Casas *et al.* (1976), extrayendo los carotenoides del jugo con una mezcla de alcohol isopropílico y hexano y determinando la absorbancia a 450 nm (el máximo de absorción del β -caroteno) en el extracto alcohólico, con espectrofotómetro (Metrolab 325 BD, paso de luz de 1 cm). Los resultados se expresaron en mg de β -caroteno por 100 mL de jugo usando curva de calibración obtenida con la droga pura (SIGMA, Type IV) y blanco de hexano-acetona.

- Sodio, potasio, magnesio y calcio: Espectrofotometría de absorción atómica en equipo AA-6800 marca SHIMADZU provisto de "autosampler" ASC 6100 y software WizA Ard. Se aplica el método de análisis por llama de aire-acetileno (Standard Methods sección 3111),

método de curva de calibrado con estándares certificados y agua de grado 1 obtenida por un equipo E. Pure-Barnsted. Las determinaciones analíticas se efectuaron por duplicado para cada muestra individual compuesta.

Parámetros ópticos:

Metal	Longitud de onda (nm)	Ancho de slit (nm)
Ca	422,7	0,5
K	766,5	0,5
Na	589,0	0,5
Mg	285,2	0,5

Para la digestión de la muestra se utilizó un equipo de microondas MARS 5, marca CEM provisto de contenedores de teflón HP 500 Plus y un sistema de control de presión y temperatura.

Programa de digestión:

Cantidad de muestra por vaso - 0,5 mL

Volumen HNO₃ por vaso – 10 mL

Temperatura de control – 210 °C

Presión – 200 psi

Rampa de tiempo - 25 min

Tiempo de mantenimiento – 5 min

- Fósforo inorgánico: Método U.V. (Wiener, Argentina) para la determinación de fósforo inorgánico en líquidos biológicos. El fósforo inorgánico reacciona en medio ácido con el molibdato para dar un complejo fosfomolibdico que se mide espectrofotométricamente a 340 nm.

Estos parámetros también fueron analizados en muestras de jugo pasteurizado en planta piloto (90°C / 3,5 min) de la misma variedad de naranja, y en jugo concentrado procedente de una industria de la zona.

Sobre la base de la composición química de los jugos: natural,

pasteurizado y concentrado se procedió a la formulación de los medios.

La composición adecuada de un medio de cultivo surge de valorar la composición elemental de la biomasa, cuando esta es lo que se pretende producir (esto es no hay formación de productos). La concentración de azúcares totales iniciales en los medios de cultivo elaborados a partir de los jugos mencionados previamente fue ajustada a 70 g/L. Tomando como base 70 g/L de FCE (lo cual asume que *a priori* no se metabolizarían las demás sustancias carbonadas presentes en dichos jugos), se adicionaron por litro de cada medio: 6 g de urea, 1,7 g de KH_2PO_4 , 0,1 g de CaCl_2 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,06 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 1 g de extracto de levadura. Esta última como fuente de vitaminas y factores orgánicos de crecimiento que podrían no estar presentes en las cantidades necesarias para el crecimiento microbiano.

2.2.2.- Esterilización de los medios, inoculación y crecimiento de las levaduras.

Los tres medios así formulados (sin el agregado de urea) se distribuyeron a razón de 100 mL en 12 erlenmeyers de 1000 mL, a fin de trabajar por duplicado con ambas levaduras. Los medios se trataron térmicamente a vapor fluente en autoclave por 30 min. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se adicionó de modo aséptico la cantidad necesaria de una solución de urea (previamente esterilizada por filtración) para alcanzar la concentración inicial antes mencionada.

Se inocularon dos erlenmeyer por cada medio con suspensiones de *S. bayanus* y *S. cerevisiae* provenientes de sendos tubos inclinados con YGC (incubados 24 h) a fin de lograr una DO_{625} inicial de 0,2.

La incubación se realizó a 30°C en agitador orbital (Selecta, España), con 2 cm de excentricidad, a 200 rpm, hasta alcanzar la fase estacionaria.

El muestreo del cultivo se realizó cada 2 h, tomando 2 mL de cultivo por vez. Cada muestra fue ensayada con respecto a pH y DO_{625} con el fin de construir las respectivas curvas de crecimiento. Asimismo, se efectuaron observaciones microscópicas a los efectos de verificar la ausencia de contaminantes.

2.3.- RESULTADOS Y DISCUSION

2.3.1.- Caracterización de jugos de naranja de diferentes orígenes:

2.3.1.1.- Jugos frescos de naranja.

Del análisis del jugo de las cuatro variedades de naranjas estudiadas durante sus respectivos periodos de maduración, a partir de un índice de madurez (% sólidos solubles / % acidez) de 8, surgen los valores medios de los parámetros fisicoquímicos más relevantes para el desarrollo de las levaduras, los cuales se presentan en la Tabla 2.3.1.

El análisis estadístico no mostró diferencias significativas (ANOVA $\alpha=0.05$) entre los valores medios de los parámetros mencionados para las cuatro variedades.

Las variedades tempranas de naranjas (Navelina y Newhall) mostraron en general menores rendimientos en jugo que las demás variedades (Tabla 2.3.1). Este hecho debe ser tenido en cuenta cuando se considera el costo de la materia prima para el vino de naranja.

Tabla 2.3.1: Contenido medio y desviación estándar de principales componente de jugo de naranja de cuatro variedades.

	Navelina	Newhall	Salustina	W. Navel
Rendimiento en jugo (g/100 g)	43,47±5,14	41,67±5,26	50,70±2,36	47,04±2,97
PH	3,77±0,31	3,44±0,18	3,73±0,11	3,61±0,26
Acidez (% ac. Cítrico)	0,95±0,276	1,15±0,261	1,02±0,178	1,14±0,216
Sólidos solubles totales (°Brix)	11,23±0,846	11,34±1,028	10,92±0,762	10,61±0,679
Azúc. red. (g/100 mL)	3,72±0,797	4,09±0,723	4,11±0,54	3,91±0,767
Azúc. tot. (g/100 mL)	7,78±0,737	7,58±1,111	7,58±0,860	7,25±0,604
Vit. C (mg/100 mL)	114,37±16,451	101,74±47,95	92,59±44,45	76,78±12,92
N amin. (mg/100 mL)	25,33±5,331	25,52±4,619	22,81±5,180	20,30±3,449
N total (mg/100 mL)	65,00±3,25	64,63±2,89	68,20±3,01	77,00±2,54
Flavonoides (mg/100 mL jugo)	106,91±22,82	90,69±31,63	73,46±30,23	87,73±36,81
Aceites esenciales (µL/100mL)	23,83±2,78	10,60±6,75	9,11±1,91	8,03±2,206

Como puede observarse, los valores de pH para las diferentes variedades de naranja estuvieron en el rango aproximado de 3,4 a 3,8. Las levaduras vínicas son muy resistentes a pH ácidos. Su crecimiento no cambia significativamente en el rango de pH del jugo de naranja, sin que se manifiesten cambios significativos en las características globales del proceso fermentativo. Además, las bacterias naturales presentes en el jugo de naranja son mucho más susceptibles a dichos valores de pH, resultando de este modo en un adecuado mecanismo para su control.

El pH también tiene una profunda influencia sobre la efectividad química y biológica del SO₂ adicionado al mosto. El SO₂ se adiciona normalmente para controlar el crecimiento de levaduras silvestres, es muy efectivo en el control de diferentes tipos de bacterias y reduce la oxidación del mosto. La cantidad de SO₂ libre se incrementa con la disminución del pH. Por lo tanto, los bajos valores de pH del jugo de naranja permitirán una reducción en la cantidad de sulfito adicionada al mosto de naranja.

Por todo lo anterior, se puede concluir que el pH del jugo de todas las variedades de naranjas ensayadas es muy adecuado tanto para el crecimiento aeróbico de las levaduras, como para su uso en la preparación del mosto para la elaboración del vino de naranja.

Por otra parte, el periodo en el cual las frutas presentan un índice de madurez aceptable es mayor para las variedades Salustiana y W. Navel, lo que en estos casos permite disponer de materia prima en un período más prolongado.

Los sólidos solubles en los jugos de las 4 variedades de naranjas estudiadas mostraron variaciones oscilantes durante sus respectivos períodos de cosecha. Sin embargo, los mayores valores se encontraron en los jugos de las variedades tempranas, pero también los mayores rangos de variación. Los valores mínimos y máximos para todas las variedades y muestras fueron 9,75 y 13,61 °Brix, respectivamente. De lo anterior, no se puede concluir que alguna variedad de naranja posea características sobresalientes con respecto al resto como para ser seleccionada para la elaboración de vino de naranja.

La velocidad de reducción de acidez a lo largo del tiempo de cosecha fue mayor en los jugos de las variedades Navelina y Newhall en comparación con el resto de los jugos. Se encontró que los ácidos

correspondieron a los siguientes porcentajes de sólidos totales para cada variedad de naranja: Navelina, 7,89 %; Newhall, 9,70 %; Salustiana, 8,95 % y W. Navel, 10,40 %. Lombard (1996) menciona que el jugo de naranja presenta características agradables cuando su acidez alcanza 1 g/100 mL de jugo y el pH es de 3,5. Sin embargo, algunos de los valores de acidez encontrados, particularmente al inicio de la época de cosecha, son mayores que aquellos recomendados para mostos de uva de climas templados (0,65 a 0,85 g/100 mL de mosto). La acidez titulable es el factor primordial del sabor de los vinos, y el gusto del vino es muy áspero cuando la acidez es muy alta. En algunos de nuestros jugos existiría la posibilidad de un ajuste en el contenido en ácidos a los efectos de alcanzar un sabor balanceado en el producto final. Sin embargo, en los casos de las vars. Navelina y W. Navel no haría falta dicho ajuste, particularmente en muestras tomadas al final de la correspondiente época de cosecha.

El ácido cítrico es por lejos el predominante en los jugos de naranja, alcanzando valores del 85-95 % del total de ácidos. El ácido cítrico puede ser biotransformado en ácido láctico, y algunos tipos de bacterias pueden transformarlo en ácido acético originando un serio inconveniente. Se debe realizar un control cuidadoso del crecimiento bacteriano para evitar este problema. Por el contrario, las cantidades remanentes de ácido cítrico después de la fermentación podrían originar un carácter fresco y cítrico al vino, resaltando su sabor en un modo similar al que ocurre en algunos vinos blancos. Además, el ácido cítrico podría mejorar la estabilidad del producto final.

El ratio (o índice de madurez) es la relación entre sólidos solubles y acidez. Este es el indicador primario de la madurez de la fruta. Como se esperaba, este parámetro se incrementó con el tiempo de cosecha para todas las variedades de naranja. Las pendientes de las curvas de ratio vs. tiempo fueron: 1,16 para var. Navelina, 1,20 para var. Newhall, 0,62 para var. Salustiana y 0,59 para var. W. Navel, lo cual indica que las dos primeras variedades poseen una mayor velocidad de maduración. Desde este punto de vista, las variedades intermedias y las tardías serían las más adecuadas para la producción de vino de naranja debido a que poseen menos variación en su composición durante el período de cosecha.

Los porcentajes de azúcares totales en los sólidos solubles totales fueron en promedio: 69,3 % para la var. Navelina, 66,9 % para la var.

Newhall, 69,5 % para la var. Salustiana y 68,8 % para la var. W. Navel. Asumiendo un consumo total de los azúcares durante la fermentación (lo cual puede no ocurrir totalmente) y considerando que el rendimiento máximo de la fermentación es del 46 % (expresado como % del azúcar total transformado en etanol), se podría alcanzar una graduación alcohólica de alrededor de 4,2 % (v/v). Este valor es considerado muy bajo, originando un vino con poco cuerpo. Por lo tanto, sería necesaria una suplementación con azúcares (probablemente sacarosa) cualquiera sea la variedad de naranja utilizada a los efectos de alcanzar un adecuado tenor alcohólico en el vino.

La evolución del contenido en ácido ascórbico mostró valores decrecientes con el tiempo de cosecha en las vars. Newhall y Salustiana, en tanto que se incrementó en las vars. Navelina y W. Navel (datos no mostrados). Las variedades Salustiana y W. Navel mostraron en promedio menores contenidos en ácido ascórbico que el resto.

Las cantidades de ácido ascórbico encontradas en todos los jugos de naranja son substancialmente mayores que las presentes en otros mostos. Estas concentraciones podrían contribuir a la inhibición de procesos de oxidación en colaboración con el SO_2 . Además, la cantidad residual de ácido ascórbico después de la fermentación podría inhibir a las reacciones de pardeamiento del producto final. Desde este punto de vista, todas las variedades de naranja serían adecuadas para la elaboración de vino, aunque sería razonable utilizar a los jugos con mayor contenido.

El contenido en nitrógeno total tendió a incrementarse con la época de cosecha de las variedades ensayadas, con valores desde 65 hasta 77 mg/100 mL de jugo. En cuanto al Nitrógeno amínico, principal indicador del N asimilable los valores oscilaron entre 20,4 y 25,5 mg/100 mL.

Es sabido que en muchos casos los mostos deben ser suplementados con fuentes de nitrógeno extras, usualmente $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, a los efectos de alcanzar adecuados niveles de biomasa de levadura durante la fermentación. (Giannessi and Matta, 1978). Este parece ser el caso de los jugos de naranja conforme a los contenidos de nitrógeno mencionados previamente.

Las variedades tempranas de naranja mostraron los mayores

contenidos en flavonoides. Es conocido que dichas sustancias poseen muy baja solubilidad en soluciones acuosas a bajos pHs, y que su solubilidad puede ser reducida durante la fermentación debido al incremento en la concentración de etanol. Por lo tanto, es esperable que la mayoría de los flavonoides presentes en el mosto precipiten en el sedimento del vino. Sería conveniente usar jugos con el menor contenido en flavonoides posible.

El contenido promedio de aceites esenciales tendió a disminuir con el curso del año para todas las variedades de naranja evaluadas. De todos modos, los bajos valores encontrados en los jugos pueden deberse al método de obtención utilizado, que causa una muy baja ruptura de las vesículas del flavedo. Los aceites esenciales poseen una alta volatilidad y ellos podrían ser eliminados del mosto durante la fermentación por arrastre en la corriente de CO₂. Por lo tanto, se espera que su concentración en el producto final sea aún mucho menor que en los jugos de partida.

Las dos variedades de naranjas que presentan mejores características para su selección en la elaboración de vino de naranja son la Salustiana y la W. Navel. Salustiana presenta mayor rendimiento en jugo, mayores concentraciones de azúcares totales y de flavonoides e igual acidez que W. Navel. Sin embargo, se decidió seleccionar al jugo de las naranjas de variedad W. Navel como el más adecuado de los jugos naturales para los ensayos de vinificación posteriores, debido fundamentalmente a que su período de cosecha es más largo lo que implica disponer de materia prima durante un tiempo mayor. Además, las menores temperaturas ambientales observadas durante su cosecha promoverían una vinificación más lenta, sin necesidad de refrigeración en una escala de producción industrial, como es recomendado para evitar la pérdida de aromas volátiles durante la misma.

2.3.1.2.- Jugos de naranja pasteurizado y concentrado reconstituido.

Se pasteurizó jugo de naranja var. W. Navel a los efectos de reducir la flora nativa que podría competir con las levaduras inoculadas durante la fermentación vínica, y lograr la estabilidad del jugo mediante la inactivación de la pectinmetilesterasa (PME) para lo cual se requiere como mínimo un tratamiento de 90°C/1 min (Basak and Rammaswamy,

1996).

La utilización de jugo pasteurizado de naranja en la formulación de mosto parece ser una interesante alternativa de ser estudiada.

El uso de jugo de naranja concentrado (y apropiadamente diluido en la formulación del mosto) fue también considerado debido a su posibilidad de almacenamiento durante períodos relativamente largos antes de la fermentación. Este es un aspecto remarcable desde el punto de vista industrial debido a que su uso permitiría la realización del proceso de vinificación mucho después de la cosecha de naranjas. Además, la cantidad de microorganismos contaminantes se vería también substancialmente reducida en comparación con la presente en jugos naturales.

Los datos de la caracterización química de los jugos pasteurizado y concentrado (reconstituido a 11 °Brix) se muestran en la Tabla 2.3.2.

Tabla 2.3.2: Composición de jugo natural (W. Navel), pasteurizado y concentrado.

	Jugo Natural (W. Navel)	Jugo Pasteurizado	Jugo conc. reconstituido (11 °Brix)
pH	3,87	3,84	3,70
Sólidos solubles (°Brix)	11,4	11,2	
Acidez (% ác. cítrico anhidro)	0,94	0,86	0,90
Ácido ascórbico (mg/100 mL)	70,00	60,96	56,58
Azúcares red. directos (g/100 mL)	4,32	4,38	5,73
Azúcares totales (g/100 mL)	8,71	8,92	9,36
Sacarosa (g/100 mL)	4,30	4,20	3,58
Fructosa (g/100 mL)	2,20	2,20	2,61
Glucosa (g/100 mL)	1,90	1,80	2,54
N amínico (mg/100 mL)	22,70	30,50	25,33
Flavonoides (hesp. mg/100 mL)	66,47	100,94	110,02
Aceites esenciales (µL/100 mL)	1,3	0,6	6,2
Pectina (mg/100 mL)	133,20	128,35	49,73
Carotenoides (βcarot. mg/100 mL)	1,17	0,62	1,02
Sodio (mg/L)	16	19	25
Potasio (mg/L)	1.690	1.520	1.283
Calcio (mg/L)	131	132	142
Magnesio (mg/L)	136	132	145
Fósforo (mg/L)	202	199	178

El jugo pasteurizado de naranja var. W. Navel se concentró parcialmente (alrededor del 10 %) durante el tratamiento térmico en comparación con el correspondiente jugo fresco. Por lo tanto, se observó un incremento en los valores de sólidos solubles, acidez, azúcares reductores directos y totales y flavonoides en relación al jugo fresco. El contenido en N amínico y total se incrementó en una proporción mayor que los parámetros anteriores debido a una razón desconocida. Por el contrario, los contenidos en ácido ascórbico y en aceites esenciales disminuyeron. La pérdida en ácido ascórbico se puede atribuir a su inestabilidad térmica mientras que la disminución en aceites esenciales se adjudicó a su volatilización durante el tratamiento térmico (llevado a cabo sin recuperación de aromas). En todos los casos se encontraron diferencias estadísticas significativas en los parámetros medidos.

El jugo concentrado (y reconstituido) mostró mayores valores de la relación azúcares reductores directos a totales (0,63) que los jugos naturales debido probablemente a hidrólisis (catalizada por ácido) de la sacarosa durante el tratamiento térmico. Los contenidos en N amínico y total también presentan diferencias con respecto al jugo natural. Lo mismo ocurrió con el contenido en flavonoides. El contenido en ácido ascórbico también sufrió variaciones importantes; los valores promedio cercanos a 70 mg/100 mL en jugo natural de naranjas, en el caso del concentrado representa casi un 20 % menos. No se encontraron mayores diferencias en el contenido de aceites esenciales en comparación con los jugos frescos. En la industria, los aceites se pierden en el primer efecto del evaporador y son recuperados y restituidos al jugo concentrado.

Es muy importante mencionar que los jugos tratados térmicamente pueden mostrar valores menores en las actividades enzimáticas originales, particularmente en el caso de enzimas pectolíticas. Tradicionalmente, el tratamiento térmico del jugo de naranja se realiza en la industria para inactivar enzimas nativas, particularmente pectinesterasa, una enzima que posee comparativamente alta resistencia térmica. Esta enzima actúa sobre los grupos carboxílicos metoxilados de las sustancias pécticas liberando grupos carboxílicos libres y metanol. Posteriormente, los grupos carboxílicos libres reaccionan con los iones calcio presentes en el jugo originando pectatos de calcio insolubles que se separan por sedimentación. En el presente caso, es muy importante la presencia de pectinesterasa activa. Las sustancias pécticas en suspensión, generalmente en forma de micelas, pueden hacer muy dificultosa la

clarificación del vino. Por lo tanto, una reducción en la actividad de la pectinesterasa nativa del jugo de naranja podría tener efectos negativos sobre la calidad del vino. De todos modos, la presencia de actividad residual podría ser suficiente para evitar este inconveniente.

2.3.2.- Cultivos de levaduras utilizando diferentes jugos de naranja:

Los cultivos se realizaron con un medio preparado a partir de jugo de naranja de la variedad W. Navel con un índice de madurez de 12 (11,4 ° Brix/0,94 % ác. cítrico). Para el diseño del medio de cultivo, adecuado para el crecimiento de levaduras del género *Saccharomyces*, se utilizaron los datos mostrados en la Tabla 2.3.2.

Las vitaminas y los factores de crecimiento, si bien no fueron cuantificados en este trabajo, existen suficientes referencias que hacen suponer que el contenido de estos analitos en los jugos de naranjas pueden estar comprendidos dentro de los valores consignados en la Tabla 2.3.3.

Tabla 2.3.3: Contenido en vitaminas y factores de crecimiento en jugo de naranja*.

Vitaminas y factores de crecimiento	Contenido/100mL
Vitamina B ₆	25-80 µg
Tiamina	60-145 µg
Ribofavina	11-90 µg
Acido pantoténico	130-210 µg
Niacina	200-300 µg
Biotina	0,1-2 µg
Acido Fólico	1,2-2,3 µg
Inositol	90-200 µg

*Rangos de variación para el contenido en vitaminas en el jugo de naranja según determinaciones de United States Department of Agriculture.

Del análisis de los resultados se desprende que los jugos estudiados pueden ser usados como base para la preparación de un caldo de cultivo óptimo para crecer *Saccharomyces sp.*



Los componentes básicos para la nutrición de las levaduras son:

- Agua.
- FCE y FN.
- Elementos biogénicos (O, H, P y Mg).
- Elementos oligobiogénicos.
- Vitaminas y factores de crecimiento.

Los tres sustratos analizados tienen nutrientes orgánicos factibles de ser utilizados para el metabolismo microbiano pero en cantidades insuficientes para asegurar una buena productividad. Por ello, se formuló un medio agregando los nutrientes necesarios en las concentraciones adecuadas según la estequiometría de crecimiento de la levadura sin formación asociada de producto, la cual responde a la siguiente ecuación (Ertola *et al.*, 1994).



donde: $\text{CH}_{1,83}\text{O}_{0,916}$ es la fórmula del c-mol para sacarosa (FCE seleccionada para ser adicionada al jugo), a y b son los coeficientes estequiométricos para el NH_3 y el O_2 y $y_{X/S}$ y $y_{\text{CO}_2/S}$ son los rendimientos en biomasa y CO_2 , w es el coeficiente estequiométrico para el agua formada y ϕ es el calor liberado por c-mol de sacarosa consumida.

En la anterior ecuación $\text{CH}_{1,79}\text{O}_{0,5}\text{N}_{0,2}$ representa a la fórmula mínima de la biomasa estándar de levadura. En la misma no aparecen los elementos menores como P, S, Mg, K, Ca, Fe, etc., los cuales forman un 5% de la composición y que por lo tanto deben ser suministrados externamente (Pirt, 1975).

Tomando como base 70 g/L de FCE se realizó un balance de la

FN, urea, y de los micronutrientes; de lo cual resulta la formulación que se muestra en la Tabla 2.3.4:

El pH no fue ajustado, debido a que los tres tipos de jugos de naranja usados para la adaptación de *S. cerevisiae* tienen pH cercanos a 4,0 que es el considerado como el más adecuado para el crecimiento de esta levadura (Fleet and Heard 1993).

Tabla 2.3.4.-: Composición del medio de cultivo base:

Componente	Cantidad
Urea	6 g
KH ₂ PO ₄	1,7 g
CaCl ₂	0,1 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5 g
FeCl ₃ . 6H ₂ O	0,06 g
Extracto de levadura	1 g
Sacarosa	c.s.p. 70 g*
Jugo de naranja**	c.s.p. 1.000 mL

*Cantidades variables de acuerdo a la concentración de azúcares totales de cada jugo ensayado.

**Natural, pasteurizado o concentrado reconstituído a 11 °Brix.

La urea se agregó para aumentar la fuente nitrogenada, activando el crecimiento de las levaduras. Esta forma de nitrógeno es fácilmente asimilable por aminación del ácido α -cetoglutarico con producción de ácido glutámico y posterior transaminación para la biosíntesis de otros aminoácidos de la célula.

El KH₂PO₄ se agrega a fin de obtener un exceso de fosfatos para que se activen las dos fosforilaciones iniciales de la glicólisis hasta la producción de piruvato.

Las otras sales minerales tienen un claro efecto multiplicador en la concentración de levaduras en el mosto.

El extracto de levadura, se usó como suplemento del medio de cultivo por su contenido en vitaminas y factores orgánicos de crecimiento, indispensables para la síntesis de los enzimas involucrados en el metabolismo de las levaduras. La suplementación en concentraciones de décimas de mg/L de Biotina, Piridoxina, Tiamina,

Ácido Pantoténico y Ácido Nicotínico a mostos de uva, acortan la fase de latencia favoreciendo los fenómenos de proteosíntesis (Suarez, 1997).

Si bien ha sido demostrado que *Saccharomyces sp* puede sintetizar sus requerimientos vitamínicos a excepción de Biotina, la adición de un suplemento vitamínico tiene un efecto estimulante deseable en conjunto con la adición de FN.

Los recubrimientos de las levaduras (paredes y membranas) quedan como subproductos en la preparación de extracto de levadura comercial. Estos pueden ser añadidos para reforzar la velocidad de fermentación e incluso reiniciar una fermentación que se ha parado. Su acción puede ser explicada como una disminución de ácidos grasos inhibitorios de C₈ a C₁₀. Se ha reportado que el agregado de este suplemento estimula el desarrollo de las levaduras, ya que es una fuente de ácidos grasos insaturados de C₁₆ a C₁₈, los cuales no pueden ser sintetizados en las condiciones de anaerobiosis de la fermentación. Adicionalmente son fuente de muchos aminoácidos que junto con la urea alivian la acción inhibitoria de los altos niveles de CO₂ (Ingledeew, 1996).

La esterilización de los medios sin el agregado de urea, se realizó a vapor fluente por 30 min., posteriormente se adicionó la urea previamente esterilizada por filtración.

Se inoculó con *S. bayanus* y *S. cerevisiae*, respectivamente y se incubó según la metodología previamente descrita, ya que durante la vinificación las células de las levaduras están sujetas a variaciones de los factores ambientales los cuales afectan adversamente a su desarrollo. Esto es, las células crecen bajo distintas condiciones de estrés tales como alto contenido de azúcar y por ende alta concentración de etanol, limitación de N₂ y O₂, pH, temperatura, tratamiento con SO₂, etc. (Ivorra *et al.*, 1999).

La supervivencia dependerá de la adaptación a estas condiciones ambientales, de la severidad del estrés, de las condiciones fisiológicas de la levadura y del tiempo que se encuentra bajo esas condiciones estresantes (Attfield, 1997).

Una vez logradas las condiciones fisiológicas de cultivo se realizó un muestreo cada 2 h analizándose en cada muestra DO₆₂₅. En cada tiempo se tomó el promedio de las densidades ópticas de los dos erlenmeyer ensayados para cada jugo, con lo que se obtuvieron las

respectivas curvas de crecimiento, representadas en las Figuras: 2.3.1., 2.3.2. y 2. 3.3.

En todos los casos, la fase lag se prolongó por un período mayor a las 5 h, lo cual indica que ambas levaduras necesitan un tiempo relativamente largo para adaptarse a las nuevas condiciones del medio, especialmente la FCE y FN ya que necesitan sintetizar las nuevas enzimas y deben ser inducidos nuevos sistemas de transporte (Crueger y Crueger, 1993).

Por otra parte la concentración de extracto de levadura disminuyó en una relación 5:1 al pasar del YGC a los caldos de cultivo, contribuyendo al efecto anterior.

Cuando el cultivo se preparó a partir de jugo natural de naranja el crecimiento de ambas levaduras mostró comportamiento similar tal como se observa en la Figura 2.3.1. Este comportamiento se puede asimilar a lo reportado por Torija *et al.* (2003) al estudiar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de cepas de *Saccharomyces* sobre mosto de uva, destacándose la aproximación de ambos resultados cuando la temperatura fue de 30°C

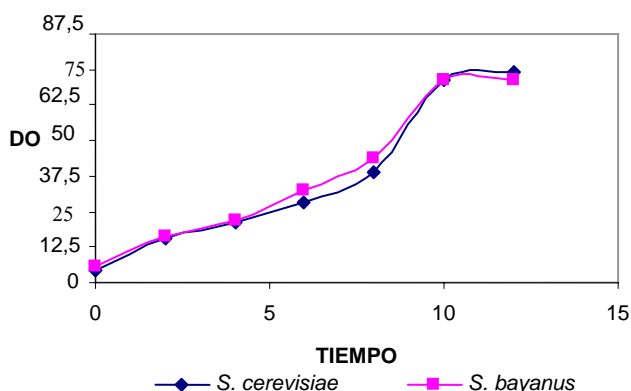


Figura .2.3.1: Curva de crecimiento en jugo natural de naranja

En el caldo de cultivo preparado con jugo pasteurizado el crecimiento de *S. bayanus* se ve incrementado a las 8 h de permanencia en las condiciones de cultivo respecto de *S. cerevisiae*, iniciándose a este tiempo la fase estacionaria máxima, en cambio en *S. cerevisiae* esta fase

comienza a evidenciarse a las 10 h (Figura 2.3.2).

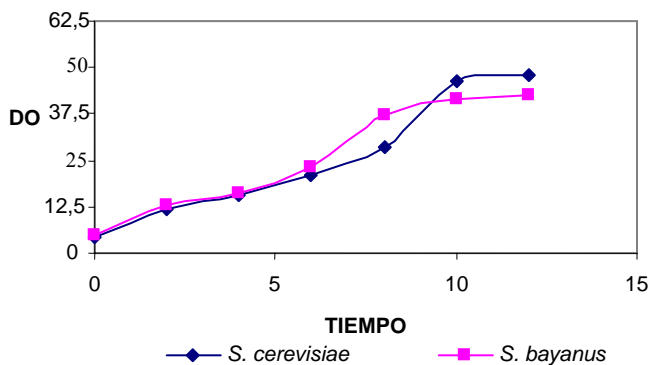


Figura .2.3.2: Curva de crecimiento en jugo pasteurizado de naranja.

En la Figura 2.3.3 se puede observar que los cultivos de ambas levaduras evolucionaron en forma similar hasta las 6 h de incubados en las condiciones fisiológicas óptimas. A partir de ese momento *S. bayanus* presentó mayor crecimiento que *S. cerevisiae* alcanzando ambas, la fase estacionaria a las 10 h.

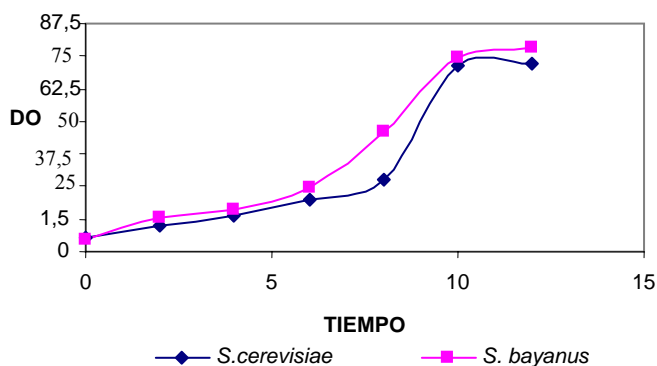


Figura .2.3.3: Curva de crecimiento en jugo concentrado reconstituido (11°Brix) de naranja.

Los valores de DO_{625} alcanzados en los cultivos se equivalen aproximadamente a 25-30 g/L de biomasa. Considerando que se

utilizaron 70 g/L de FCE, es dable esperar que parte de ella se derivara a la formación de algún producto, probablemente etanol. Este fenómeno fue confirmado *a posteriori* (ver sección 2.3.1.1), comprobándose que *S. cerevisiae* es una levadura Crabtree positiva, lo cual implica que produce etanol en presencia de concentraciones de azúcares superiores a 0,6 g/L aún en concentraciones saturantes de oxígeno disuelto. Lo mismo se aplicaría a *S. bayanus*.

Estadísticamente no se hallaron diferencias significativa ($\alpha=0,05$) en el comportamiento de ambas levaduras en los tres mostos.

El hecho de que el jugo concentrado reconstituido tenga una concentración de aceites esenciales casi 10 veces mayor que los jugos natural y pasteurizado no parece haber afectado el desarrollo de las *Saccharomyces spp.* Resultados que están de acuerdo con lo reportado por Kimball, (1991) respecto a que la concentración de aceites esenciales debe ser superior a 0,08 % para que se produzca la inhibición de las levaduras.

Las observaciones microscópicas revelaron que en todos los cultivos sólo crecieron las levaduras inoculadas, sin detectarse ninguna contaminación con otras levaduras o bacterias.

SEGUNDA PARTE:
CULTIVO DE *Saccharomyces cerevisiae*
PARA SU UTILIZACIÓN EN VINIFICACIÓN

CAPITULO 1:
DETERMINACIÓN DE REQUERIMIENTOS
NUTRICIONALES DE *S. cerevisiae*

1.1.- INTRODUCCION

En la primera parte del presente trabajo se describió el aislamiento de una *S. cerevisiae* autóctona para ser utilizada en la elaboración de vino de naranja. Para este fin es necesario obtener la cantidad suficiente de biomasa a los efectos de preparar el inóculo para la fermentación vínica.

Con el objeto de optimizar su crecimiento se deben establecer los requerimientos nutricionales de la cepa a utilizar.

Es sabido que los hongos requieren pequeñas cantidades de varios compuestos orgánicos para su crecimiento. Estos compuestos no son nutrientes como la FCE y la FN, ni los compuestos inorgánicos que se necesitan en mayores cantidades. Globalmente se los denomina factores de crecimiento e incluyen a las vitaminas y a otras moléculas orgánicas que intervienen en el metabolismo microbiano.

Las vitaminas producen crecimiento o desarrollo en concentraciones de 0,01 a 1,0 ppm y tienen funciones catalíticas en la célula, como coenzimas o constituyentes de coenzimas. Un grupo de compuestos orgánicos no caracterizados como vitaminas son igualmente activos a bajas concentraciones, usualmente alrededor de 10 ppm. Estos compuestos son los factores de crecimiento e incluyen, por ej., a los ácidos grasos (Morata *et al.*, 2001).

Los organismos que pueden sintetizar estos compuestos a partir de precursores simples son los Auxoautótrofos, a diferencia de los Auxoheterótrofos que son aquellos que no pueden sintetizar algunas de estas sustancias o bien lo hacen en cantidades subóptimas, por lo cual hay que suministrárselas en el medio de cultivo (Garraway, 1984).

El objetivo de este estudio fue definir las necesidades de vitaminas y factores orgánicos de crecimiento de *S. cerevisiae* aislada de jugo de naranja fermentado. Con este propósito se utilizó un medio base limitado en FCE a los efectos de formular un medio de cultivo completo para la obtención de la biomasa a fin de ser usada como inóculo en la elaboración de vinos de naranja.

1.2.- MATERIALES Y METODOS

1.2.1.- Formulación del medio de cultivo.

Se formuló un medio de cultivo con sacarosa (4 g/L) como FCE y urea como FN, con 6 vitaminas (pantotenato de calcio, piridoxina, tiamina, biotina, niacina, ác. fólico) e inositol y ácido *p*-aminobenzoico (PABA) como factores de crecimiento (Inchaurrondo *et al.*, 1998). El pH se ajustó a 5,0.

La composición del caldo base se indica en las Tablas 1.2.1 a), b) y c).

1.2.2. Esterilización de los componentes del medio.

La esterilización de la FCE más las sales (excepto fosfato) se realizó a 121°C, 15 min. De igual manera se procedió con la solución de fosfato, por separado, para evitar su interacción con iones divalentes que podría originar la formación de precipitados insolubles no asimilables para el microorganismo.

La solución stock de vitaminas y la solución de urea se esterilizaron por filtración ya que ambos componentes son termolábiles. Para ello se usaron, en ambos casos, filtros de 0,45 μm y luego de 0,22 μm de porosidad.

Tabla 1.2.1 a): Composición del medio base.

Componentes	Cantidades (g/L)
Sacarosa	4
Urea	1,28 (3,2 mL/L de solución madre*)
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,79
Microelementos	1 mL solución stock 1
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,6
KCl	0,4
Na_2SO_4	0,5
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,14
Vitaminas	1 mL solución stock 2

* 400 g/L de urea.

Tabla 1.2.1 b): Composición de la solución stock 1.

Componentes	Cantidades (g/L)
FeSO₄ · 7H₂O	15
ZnSO₄ · 7H₂O	5
MnSO₄ · H₂O	3
CuSO₄ · 5H₂O	0,75
CoCl₂ · 6H₂O	0,15
Na₂MoO₄ · H₂O	0,65
H₃BO₃	0,1
KI	0,1
Ac. Cítrico	50

Tabla 1.2.1. c) Composición de la solución stock 2.

Componentes	Cantidades (g/L)
Niacina	12
Pantotenato de calcio	4
Piridoxina	1
Tiamina-HCl	1
Ac. Fólico	1
PABA	1
Biotina	0,06
m-Inositol	60

Las diferentes soluciones se integraron asépticamente antes de comenzar los cultivos.

Las combinaciones de vitaminas adicionadas al medio base se muestran en la Tabla 1.2.2.

El medio completo se usó como testigo (1), preparándose además sobre la misma base otros tres medios: con ausencia de todas las vitaminas y factores orgánicos de crecimiento (2), con pantotenato de Ca, piridoxina, tiamina, biotina e inositol (3) y con esas 4 vitaminas, pero sin inositol (4).

1.2.3.- Inoculación y seguimiento del crecimiento de *S.cerevisiae* en los diferentes medios.

El requerimiento de vitaminas y factores de crecimiento de *S. cerevisiae* se estudió mediante una serie de experimentos en los que se utilizaron los medios de cultivo descritos en la Tabla 1.2.2. Dichas experiencias se basaron en la eliminación progresiva de vitaminas y factores de crecimiento y en la observación del comportamiento del microorganismo ante dicha eliminación (presencia o ausencia de crecimiento) luego de una serie de pasajes sucesivos. Para ello se procedió del siguiente modo:

Se inocularon los 4 medios (uno completo y los demás con ausencia de algún o de todos los componentes) con la levadura en estudio, a partir de un cultivo en estría en agar YGC diluido en agua estéril hasta obtener una DO₆₂₅ inicial de 0,2. Se incubaron a 30°C en 4 erlenmeyers de 1000 mL conteniendo 100 mL de medio, agitados en shaker a 200 rpm. El desarrollo de los diferentes cultivos se evaluó por medidas de pH, DO₆₂₅, concentración de sacarosa remanente (por Somogyi-Nelson previa inversión con HCl 0,1 N), masa seca (MS) y recuento microscópico (mediante cámara de Neubauer).

Tabla 1.2.2: Combinaciones de vitaminas.

Vitamina	1	2	3	4
Niacina	X			
P. de Ca.	X		X	X
Piridoxina	X		X	X
Tiamina	X		X	X
Ac. Fólico	X			
PABA	X			
Biotina	X		X	X
Inositol	X		X	

Luego de 24 h de cultivo, se procedió a tomar de modo aséptico un volumen variable en cada caso de modo de inocular el siguiente erlenmeyer con el mismo número de microorganismos. Este procedimiento se repitió hasta un máximo de 4 veces para cada uno de

los medios empleados, dependiendo de la presencia o no de crecimiento del microorganismo.

Finalmente, se procedió a eliminar de a una vitamina en el caso del medio 4 de modo de generar 4 nuevos medios, a saber: 4a, 4b, 4c y 4d. Dichos medios fueron inoculados con muestras provenientes del medio 4 y cultivados del modo antes descrito.

1.3.- RESULTADOS Y DISCUSION

1.3.1.- Crecimiento de *S. cerevisiae* en los medios de cultivo con diferentes disponibilidades de vitaminas.

En la Figura 1.3.1 se representa la evolución del pH, DO₆₂₅, MS y la concentración de sacarosa remanente en los cultivos llamados 1, 2, 3 y 4. Considerando como valores iniciales los obtenidos a las 24 h de sembrados, a partir de este tiempo se hicieron un primer y segundo pasaje a intervalos de 24 h.

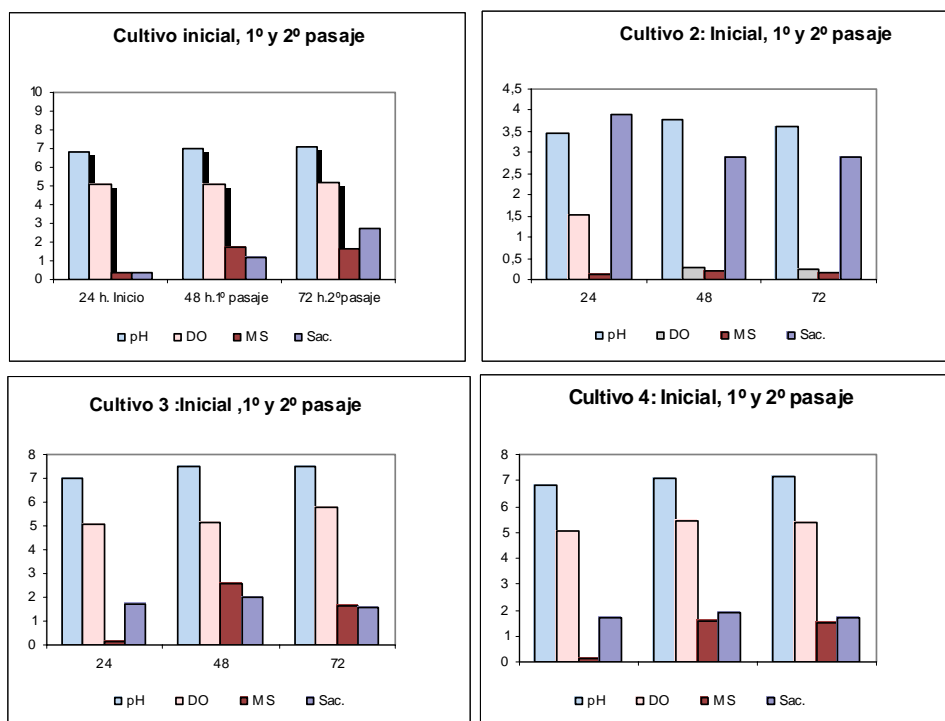


Figura 1.3.1: Evolución de los parámetros de crecimiento de *S. cerevisiae* en medios con diferentes disponibilidades de vitaminas. a) Medio completo, b) medio libre de vitaminas, c) medio carente de niacina, tiamina y ácido fólico y d) medio carente de niacina, tiamina, ácido fólico e inositol.

1.3.1.1.- Evolución de la DO₆₂₅.

En las primeras 24 h se observó un crecimiento muy pobre (DO₆₂₅ = 1,512) en el medio sin vitaminas (Figura 1.3.1 b). En el resto de los

medios los valores de crecimiento ($DO_{625} \approx 5,1$) son similares entre si (Figura 1.3.1 a), c) y d).

Luego del primer pasaje en el cultivo 2 el crecimiento fue aún menor ($DO_{625} = 0,3$) (Figura 1.3.1 b) mientras que se mantuvo constante en el resto. Los resultados obtenidos en el segundo pasaje reafirman lo anterior.

1.3.1.2.- Evolución del pH.

En el medio de cultivo completo (1) el pH mostró un valor cercano a la neutralidad tanto en el cultivo inicial como en el 1° y 2° pasaje (Figura 1.3.1 a). En los medios 3 y 4 el pH evolucionó en forma similar (Figura 1.3.1. c) y d). En el cultivo 2 se produjo una acidificación (pH final entre 3,4 y 3,8) (Figura 1.3.1 b).

1.3.1.3.- Evolución de la masa seca.

En cuanto a la MS, tanto en los cultivos 1 como 3 y 4 hubo un incremento de aproximadamente el 10 %, alcanzando valores de 1,5 g/L. En el cultivo 2 no se registraron variaciones en este parámetro, manteniéndose en valores aproximados a 0,3 g/L (Figura 1.3.1 a), b), c) y d).

El remanente de sacarosa en los cultivos 1, 3 y 4 fue relativamente bajo, del orden de mg/L (Figura 1.3.1 a), c) y d). En cambio, en el cultivo 2, la sacarosa prácticamente no ha sido metabolizada y el remanente es del orden de 2,9 g/L (Figura 1.3.1 b).

1.3.1.4.- Recuento microscópico.

El recuento microscópico fue del orden de 10^8 células/mL en los cultivos 1, 3 y 4, en cambio en el cultivo 2 se observaron valores de 10^6 células/mL

Esto demuestra, *a priori*, que algunas de las vitaminas y factores de crecimiento ensayados son indispensables para el desarrollo de las levaduras.

Para demostrar cuáles de ellas son necesarias se formularon cultivos a partir del medio carente de niacina, ác. fólico, PABA e inositol (4), ya que los resultados obtenidos, como se puede observar en la Tabla 1.3.1., son muy similares a los obtenidos con el medio completo (1).

En los medios (1), (3) y (4) se obtuvo un rendimiento de biomasa respecto del sustrato limitante ($Y_{X/S}$) de $\cong 0,4$, con posible formación de etanol (efecto Crabtree).

Tabla 1.3.1: Resultados finales obtenidos en los cultivos de *S. cerevisiae* en los medios 1, 2, 3 y 4 luego de 2 pasajes en cada uno de ellos.

CULTIVOS	pH	DO ₆₂₅	N° Lev./mL	MS (g/L)	Sacarosa(mg/L)	Y _{X/S}
1	7,10	5,226	$1,4 \times 10^8$	1,64	27	0,36
2	3,78	0,276	$5,0 \times 10^5$	0,2	2930	
3	7,49	5,808	$1,3 \times 10^8$	1,62	16	0,35
4	7,15	5,346	$1,4 \times 10^8$	1,51	17	0,38

A partir del cultivo 4, que carece de niacina, ác. fólico, PABA e inositol, y cuya DO₆₂₅=5,346, se inocularon cuatro nuevos elermeyers con medios a los cuales se les retiraron pantotenato de calcio (4a), piridoxina (4b), tiamina (4c) y biotina (4d) respectivamente, obteniéndose los resultados que se consignan en la (Tabla 1.3.2.).

Tabla 1.3.2 Parámetros de crecimiento de *S. cerevisiae* en medios con distinta composición vitamínica.

CULT. BASE 4	pH	DO ₆₂₅	MS (g/L)	Sacarosa (mg/L)	Y _{X/S}
4a (s/ P. de Ca)	3,59	2,200	0,53	9	0,13
4b (s/ Piridoxina)	7,81	3,450	0,93	11	0,23
4c (s/ Tiamina)	7,90	3,435	0,86	7	0,21
4d (s/ Biotina)	3,29	2,445	0,52	19	0,13

Se compararon los resultados a las 24 h observándose la disminución de pH en todos ellos alcanzándose valores entre 6,7 y 4,4 (Fig 1.3. 2 a), b), c) y d)).

El crecimiento en general fue mucho menor que en la serie anterior, observándose una DO₆₂₅ baja y similar en los cuatro cultivos.

Los valores oscilaron alrededor de 2 siendo mínimo en el medio carente de biotina ($DO_{625} = 1,952$) (Fig.1.3.2 d)).

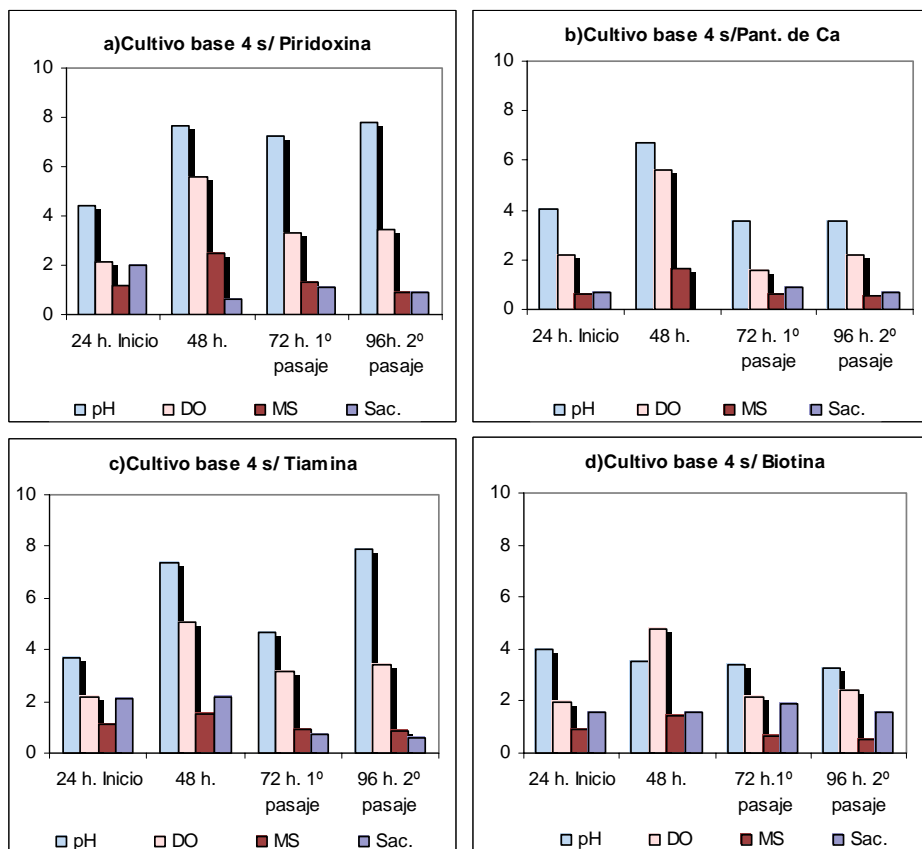


Figura 1.3.2 a), b), c) y d): Evolución de los parámetros de crecimiento en distintos medios de cultivo.

El consumo de la FCE fue casi total, observándose un remanente comprendido entre 0,7 mg/L (para el medio sin piridoxina) y 21 mg/L (para el medio sin tiamina) (Figura 1.3.2. b) y c)).

A las 48 h se advierte un retraso en el cultivo que carece de biotina, no así en los restantes medios.

En la Figura 1.3.2. se ve que los cultivos han sufrido una alcalinización respecto del crecimiento a las 24 h, con pH comprendidos

entre 6,7 y 7,6, salvo en el medio que no tiene biotina, donde se produjo una acidificación pasando el pH de 4 a las 24 h a 3,5 a las 48 h.

La DO_{625} aumentó en todos los casos, pero en una menor proporción en el cultivo sin biotina.

El remanente de sacarosa para los medios sin pantotenato de calcio y sin piridoxina fue prácticamente cero. En cambio, en los medios sin tiamina y sin biotina se mantuvo en los valores registrados a las 24 h.

En el primero y segundo pasaje se notó un decaimiento en los cultivos cuando al medio le faltó pantotenato de calcio (Figura 1.3.2 b)). Por otra parte, en los medios con carencia de piridoxina y tiamina si bien el crecimiento no fue igual al testigo con todas las vitaminas, aún en el segundo pasaje se verificaron valores de DO_{625} de 3,45 y 3,43 respectivamente, los cuales son superiores a los registrados en los medios sin pantotenato de calcio y biotina (2,2 y 2,44) (Figura 1.3.2 a), b), c) y d)).

Es de hacer notar que los requerimientos en biotina de *S. cerevisiae* son muy importantes por el hecho de haber usado urea como FN, y en estas condiciones, el microorganismo necesita sintetizar 3 sistemas enzimáticos que contienen biotina para crecer en condiciones de aerobiosis (Ertola *et al.*, 1994).

En ausencia de pantotenato de calcio y biotina, la levadura acidificó el medio de cultivo y alcanzó un $Y_{X/S} \cong 0,1$; probablemente parte de la FCE se derivó hacia la producción de ácidos orgánicos que no pudo asimilar posteriormente, por lo cual el rendimiento en biomasa fue menor.

En ausencia de piridoxina y tiamina el $Y_{X/S} \cong 0,2$ y con una alcalinización final del medio de cultivo (Tabla 1.3.2.). Podría suponerse que si se formaron ácidos orgánicos, estos fueron asimilados, pero sin alcanzar los rendimientos en biomasa del medio de cultivo testigo

Finalmente, cabe acotar que en estos ensayos se realizaron tanto medidas de MS como de DO_{625} para evaluar el crecimiento microbiano y que en todos los cultivos se evidenció una buena correlación entre ambos parámetros (Figura 1.3.3.).

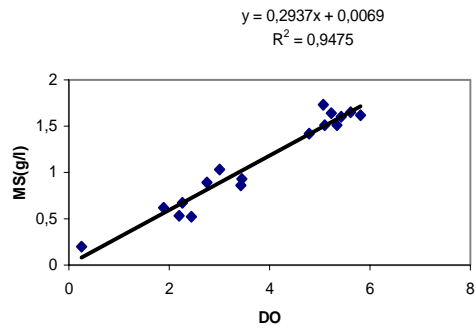


Figura 1.3.3: Relación entre DO_{625} y masa seca.

CAPITULO 2
OBTENCIÓN DE BIOMASA DE LA
Saccharomyces cerevisiae. **SELECCIONADA**
CARACTERISTICAS DE CALIDAD.

2.1.- INTRODUCCION

El proceso biotecnológico para obtener biomasa de un microorganismo con el fin de ser usado como inóculo industrial, se basa en la optimización del rendimiento de células viables con una actividad biológica definida y con buenas características de supervivencia.

Para ello es esencial no sólo diseñar un buen caldo de cultivo, sino conocer las vías metabólicas utilizadas por el microorganismo en la asimilación del sustrato. La producción se puede encarar ya sea mediante un proceso discontinuo (batch), por un sistema continuo, o por una combinación entre ambos (batch alimentado).

El crecimiento en cultivo batch es un proceso espontáneo, cerrado, que culmina cuando se agota/n el/los nutriente/s limitante/s del crecimiento, o cuando las condiciones del medio impiden el desarrollo del microorganismo, por ejemplo por acumulación de metabolitos tóxicos en concentraciones que inhiben las células microbianas. Generalmente, dentro de los objetivos de un buen proceso de este tipo se debe considerar la minimización de la fase lag, a los efectos de reducir el tiempo de proceso, con los costos operativos que ello acarrea.

En el cultivo continuo se mantiene un estado estable por un período teóricamente ilimitado. Ambos procesos siguen cinéticas diferentes, y tanto la utilización de sustrato como la formación de productos pueden expresarse por un balance de masa.

El crecimiento aeróbico de levaduras es un proceso de gran significación en la industria. Muchos trabajos han estudiado el control del metabolismo de *S. cerevisiae* bajo condiciones aeróbicas. A pesar de la gran cantidad de experiencias que han intentado el control de la utilización de azúcar y la magnitud de la fermentación y respiración, es aún un continuo problema (Barford, 1990). En estudios previos el autor encontró que cuando *S. cerevisiae* crecía en cultivo continuo la velocidad específica de consumo de O₂ se incrementaba con la velocidad de dilución hasta un valor máximo después de lo cual permanecía constante, y si se permitía un largo tiempo de adaptación continuaba el crecimiento más lentamente.

Este trabajo desafió los conceptos preestablecidos de control por carbohidratos en *S. cerevisiae*, en especial el efecto Crabtree, un efecto

por el cual se considera que a causa de la alta velocidad de crecimiento o una alta concentración de azúcar, la velocidad específica de consumo de O_2 (o la extensión de la respiración) decrece debido a la represión de la respiración. Este trabajo fue continuado por otros experimentos, los cuales validaron las conclusiones, es decir demostraron la limitada capacidad respiratoria de *S. cerevisiae*.

Se introdujo el concepto de capacidad respiratoria saturada. Un modelo posterior para el crecimiento de *S. cerevisiae* utiliza este concepto.

A diferencia de *S. cerevisiae*, algunas levaduras (*Candida utilis*) no exhiben producción de etanol cuando crecen en condiciones aeróbicas. Otras, sin embargo, tales como *S. uvarum*, o *S. pombe* exhiben un comportamiento similar a *S. cerevisiae*, aunque el perfil es distinto respecto al uso específico de O_2 y excreción de etanol (Barford, 1990).

Ha sido determinado que el catabolismo de glucosa por vía oxidativa y fermentativa se llevan a cabo simultáneamente (Petrik *et al.*, 1983). En quimiostato en condiciones aeróbicas a baja velocidad de dilución, *S. cerevisiae* utiliza glucosa por vía exclusivamente oxidativa produciendo principalmente biomasa y CO_2 y la velocidad específica de consumo de O_2 es proporcional a la velocidad de dilución.

Más allá de una dilución crítica el organismo es incapaz de mantener el proceso metabólico estrictamente oxidativo. Tiene que volver a la vía glicolítica del etanol, para ser capaz de disponer del exceso de glucosa y (e^-) y hallar su energía necesaria. Bajo esta situación la glucosa y el etanol se acumulan en el medio. El exceso de glucosa reprime la síntesis de muchas enzimas involucradas en la gluconeogénesis del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) y de la cadena respiratoria (Fiechter and Seghezzi, 1992). El incremento en la concentración de etanol inhibe el catabolismo respiratorio.

La baja productividad asociada con la operatoria a baja velocidad de dilución hace necesario el uso de batch alimentado en la producción de biomasa. Muchos esquemas de crecimiento fueron investigados y el control estratégico está basado principalmente en el coeficiente respiratorio (CR).

Con la operación batch alimentado, los valores de velocidad de crecimiento específico pueden ser convenientemente manipulados y

mantenidos a los niveles deseados durante un período razonable durante la experiencia (Ejiofor *et al.*, 1994).

Las levaduras exhiben respuestas características a los cambios en la concentración de azúcar en el medio. En organismos tales como *S. cerevisiae*, se activa la fermentación alcohólica cuando crece en condiciones aeróbicas con glucosa limitante si es expuesta a exceso de azúcar. Esta respuesta es instantánea y es conocida como efecto Crabtree (Petrik *et al.*, 1983, van Urk *et al.*, 1988) y es consecuencia de largos periodos de adaptación que involucran la represión de las enzimas respiratorias. Los organismos Crabtree negativos tales como especies de *Candida* no exhiben esta respuesta (Rieger *et al.*, 1983; van Urk *et al.*, 1989). En el esquema siguiente se muestran ejemplos de levaduras Crabtree positivo y Crabtree negativo.

Crabtree positivo	Crabtree negativo
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Cándida utilis</i>
<i>Torulopsis glabrata</i> (*)	<i>Hansenula nonfermentans</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Brettanomyces intermedius</i>	<i>Pichia stipitis</i>

(*) *Candida glabrata*

Para la producción de biomasa de *S. cerevisiae* se usaron dos metodologías de obtención: cultivo en batch y cultivo en batch alimentado, comparando los rendimientos logrados con ambos procesos.

Por otra parte, la calidad de un vino se ve profundamente afectada por el rendimiento bioquímico de la levadura durante la fermentación, razón por la cual se necesitan levaduras que tengan una calidad constante. Por tanto, es muy importante predecir la capacidad de la levadura de siembra para que tenga un adecuado comportamiento durante la fermentación.

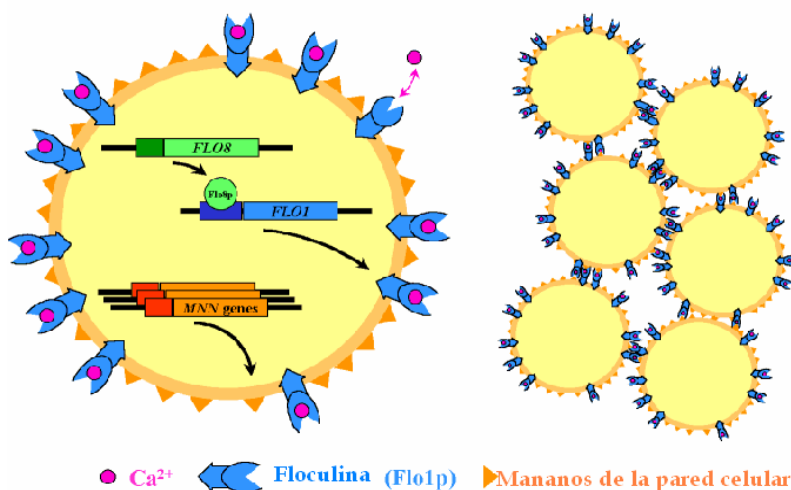
Las características más comúnmente usadas para seleccionar una buena levadura vínica son: baja producción de acidez volátil, alta tolerancia al etanol, producción de etanol según la cantidad de azúcar en el mosto, buena velocidad de fermentación, resistencia al SO₂, baja producción de SH₂ y SO₂, facilidad de sedimentación después de la fermentación, baja producción de acetaldehído, buena producción de

glicerol, y limitada formación de alcoholes superiores (Regodón *et al.*, 1997).

La habilidad de las células de levaduras para flocular es un factor tecnológico importante. La floculación de las levaduras es un proceso reversible en el cual las células se adhieren para formar flóculos de cientos de células y depende del ión Ca^{2+} (Bony *et al.*, 1997).

La floculación se debe a la presencia de lectinas específicas (floculinas) en las paredes celulares de las levaduras floculantes que se

Teoría simplificada de la lectina para la floculación de levaduras



adhieren selectivamente a los residuos de manosa presentes en la pared celular de células adyacentes. El ión Ca^{2+} es necesario para activar la floculina (Iavadekar *et al.*, 2000; Bidard *et al.*, 1995; Costa and Moradas, 2001).

Si el medio en el que crecen las levaduras tiene exceso de manosa, ésta inhibe la floculación competitivamente. Algunas levaduras también tienen inhibida la floculación por la presencia de glucosa, sacarosa y maltosa. (Verstrepen *et al.*, 2003)

El hecho de que con algunas cepas la adición de manosa no presente inhibición de la floculación se puede atribuir al proceso de floculación por un modelo distinto del de lectina o floculina y que requieren por ejemplo aglutininas y estructuras móviles como fimbrias (Straver and Kijne, 1996).

Muchos son los factores que afectan esta cualidad de las levaduras, tal es así que se encuentran resultados contradictorios por ejemplo en lo que se refiere a pH y temperaturas óptimas así como también presencia / ausencia de algunos nutrientes.

Temperatura y pH son dos factores muy importantes. Existen opiniones de que la alta acidez disminuye las cargas negativas de la superficie celular y por ende la repulsión electrostática entre las mismas, permitiendo el contacto célula-célula y la floculación (Stratford, 1992). Recientemente se ha reportado que la floculación puede ocurrir entre pH: 1,5 y 9,0, lo cual indica que el valor de pH no es un factor dominante para la floculación.

Otros autores han demostrado que la floculación se ve favorecida cuando el medio es moderadamente ácido (pH: 3,5-5,8) (Jin and Speers, 2000; Jin *et al.*, 2001; Suarez e Iñigo, 1992). Sin embargo, hay cepas que floculan a valores superiores de pH, indicando que el mecanismo depende de la cepa. Se ha sugerido que la actividad floculante cambia cuando se producen cambios conformacionales en las proteínas de la pared celular. Se podría concluir que no se puede generalizar el mecanismo de floculación porque la misma es diferente cuando se estudian distintas cepas.

La influencia de la temperatura es ambigua Stratford (1992) ha reportado que a temperaturas de entre 15°C-32°C la influencia de la misma es muy pequeña o no existe. A temperatura mayor a los 60°C los flóculos de levaduras, se rompen. Sin embargo en otros casos la floculación es reprimida a 25°C y las células sólo sedimentan a bajas temperaturas (aproximadamente 5°C) (Garsoux *et al.*, 1993). Estas contradicciones indican claramente la dependencia de la cepa.

Otro factor que influye en la floculación de levaduras vínicas es la concentración de etanol. Kamada and Morata (1984) indicaron que el etanol inhibe la floculación y que su influencia depende de la cepa tal como lo comprobaron D'Haucourt and Smart, (1999). El mecanismo a través del cual el etanol influye en la floculación no está aún muy claro. Se ha sugerido que puede alterar la conformación y las cargas de la superficie celular (Jin and Speers, 2000). También ha sido reportado (Jin *et al.*, 2001) un posible incremento de la hidrofobicidad de la superficie celular con el aumento de la concentración de etanol. Otra posibilidad

está relacionada con el factor de estrés a alta concentración de etanol (Teunissen *et al.*, 1993)

Las características que permiten la selección de un estárter para la vinificación, se pueden dividir en dos categorías (Reed and Chan, 1979): primarias, definidas como aquellas estrictamente asociadas a la formación de alcohol etílico, y secundarias como las asociadas a la producción de compuestos que afectan características tales como cuerpo, bouquet y la aparición de olores indeseables (Martíni, 2003).

Por convención, las condiciones enológicas primarias de una levadura son alto vigor de fermentación (VF) o poder fermentativo, entendida como la máxima concentración de etanol obtenida por fermentación en exceso de azúcar, alta pureza de fermentación (PF), expresada como la relación entre el etanol (% v/v) y la acidez volátil (g ácido acético/L) producido hacia el final del proceso fermentativo, alta velocidad de fermentación que es la medida de la habilidad del estárter para completar el proceso fermentativo.

Las condiciones enológicas secundarias afectan los niveles de otras cualidades del vino que determinan características organolépticas específicas. Entre ellas se pueden mencionar: contenido en acetaldehído, acetato de etilo, acetoína y alcoholes superiores.

El objetivo principal de esta parte del estudio fue determinar las condiciones óptimas de cultivo a los efectos de aumentar el rendimiento en la producción de *S. cerevisiae*. Otro objetivo fue determinar la calidad microbiológica y algunas de las propiedades enológicas primarias de la biomasa obtenida en comparación con la *S. bayanus*, comercial usada luego para la producción de vino de naranja.

Las medidas de las características enológicas secundarias y algunas de las primarias forman parte de las evaluaciones de los distintos vinos producidos a partir de jugo de naranja recién exprimido, pasteurizado, concentrado reconstituido; fermentados a pHs 3,5 y 4,0, y a temperaturas de 10°C y 20°C, con un posterior período de envejecimiento a 10°C y 20°C, algunas de las cuales se desarrollan en la tercera parte de esta Tesis.

2.2.- MATERIALES Y METODOS

2.2.1.- Sistema discontinuo (Batch)

2.2.1.1.- Medios de cultivo

- Preparación del medio de cultivo base:

Composición:

Sacarosa	10,00 g/L
Urea	2,50 g/L
K ₂ HPO ₄	1,00 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,60 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,10 g/L
Ácido cítrico.....	0,45 g/L
Sol. de cationes.....	1 mL
Sol. de aniones.....	1 mL
Sol. de vitaminas.....	1 mL
Antiespumante	3 gotas
pH: 5,50 (ajustado con HCl 1 N)	
Volumen de cultivo: 3,0 L.	

Solución de cationes:

Ácido cítrico	50 g/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	15 g/L
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	5 g/L
MnSO ₄ · H ₂ O	3 g/L
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,75 g/L
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,15 g/L

Solución de aniones:

H ₃ BO ₃	0,10 g/L
KI	0,10 g/L
Na ₂ MoO ₄ · H ₂ O	0,65 g/L

Solución de vitaminas y factores orgánicos:

Biotina	60,0 mg/L
Pantotenato de calcio	4,0 g/L

Tiamina-HCl..... 1,0 g/L
Piridoxina 1,0 g/L

- Esterilización del medio de cultivo:

Los fosfatos se esterilizaron por calor húmedo (autoclave), fraccionados en un erlenmeyer con salida lateral, disolviendo la cantidad necesaria para preparar 2,7 L de medio de cultivo, en 500 mL de H₂O y se ajustó el pH en 5,50. El resto de los componentes (excepto la urea y la solución de vitaminas) se disolvieron en 2,2 L. de H₂O y se ajustó el pH en 5,50. Los microelementos se agregaron en solución concentrada 1000 veces a razón de 1 mL/L, se ajustó el pH en 5,50 y se esterilizaron, en autoclave, en el biorreactor.

El tiempo de esterilización fue en ambos casos de 15 min. La urea se esterilizó por filtración. Se preparó una solución madre con 500 g/L de urea y se esterilizó con membrana absoluta. Esta solución se adicionó en proporción de 6,0 mL por litro de medio de cultivo.

Las vitaminas se prepararon en solución concentrada 1000 veces, se esterilizaron por filtración y se adicionaron a razón de 1 mL/L de medio.

2.2.1.2.- Preparación del inóculo.

Tres erlenmeyers de 1000 mL conteniendo 100 mL de medio de cultivo diluido 2,5 veces se esterilizaron por calor durante 10 min. En este caso para mayor simplicidad se esterilizó el medio de cultivo completo (excepto la urea y las vitaminas que se adicionaron en proporción de 0,5 mL y de 0,1 mL de las soluciones madres). Los erlenmeyers fueron sembrados el día anterior a la realización de la experiencia con células de levaduras provenientes de un cultivo en agar inclinado. Las mismas se resuspendieron fácilmente en agua. La temperatura de incubación fue en todos los casos 30 °C.

2.2.1.3.- Procedimiento del cultivo.

a) Termostatación del biorreactor, modelo Bioflo, New Brunswick (Figura 2.2.1) a 30 °C.

b) Conexión del filtro (previamente esterilizado) a la entrada de gases del biorreactor.

c) Arranque del sistema de agitación del biorreactor, fijando la agitación en 800 rpm.

d) Adición, en forma aséptica, de las soluciones conteniendo los fosfatos, la urea y las vitaminas al resto del medio contenido en el biorreactor.

e) Calibración del electrodo para medir O_2 disuelto. Se eliminó el O_2 disuelto en el medio de cultivo mediante pasaje de una corriente de nitrógeno. Una vez que la lectura se estabilizó, se ajustó la lectura a 0 % de saturación (ajuste del cero). Seguidamente, se pasó una corriente de aire a un caudal de 2 L/min para saturar el medio en O_2 . Se ajustó la lectura a 100 % de saturación con la perilla de calibración una vez que la lectura se estabilizó. En ambos casos, la estabilización de las lecturas demoró unos 10 a 15 min.

f) Calibración de los instrumentos de medida para efectuar el análisis de la composición del gas a la salida del biorreactor (analizador de O_2 y de CO_2). Los niveles de O_2 y CO_2 en el gas de salida del reactor se determinaron con un detector Servomex de tipo paramagnético y con un detector Horiba Pir 2000 con sensor infrarrojo, respectivamente.

g) Inoculación del biorreactor. Se transvasó, en forma aséptica, el contenido de los tres erlenmeyers de preparación del inóculo a otro, estéril y vacío, con salida lateral provista de una manguera de conexión al biorreactor. Seguidamente, se sembró el biorreactor con el inóculo.

h) Toma de muestras del cultivo. Luego de 5 min se comenzó con el correspondiente muestreo, retirando unos 15 mL de muestra cada hora (los primeros 2 o 3 mL se descartaron). Se fijó así el tiempo CERO del proceso. En cada muestra se registró el volumen de muestra y el de descarte para realizar los cálculos correspondientes al volumen de medio en el biorreactor.

i) Determinación del porcentaje de O_2 y CO_2 en los gases de salida del biorreactor.

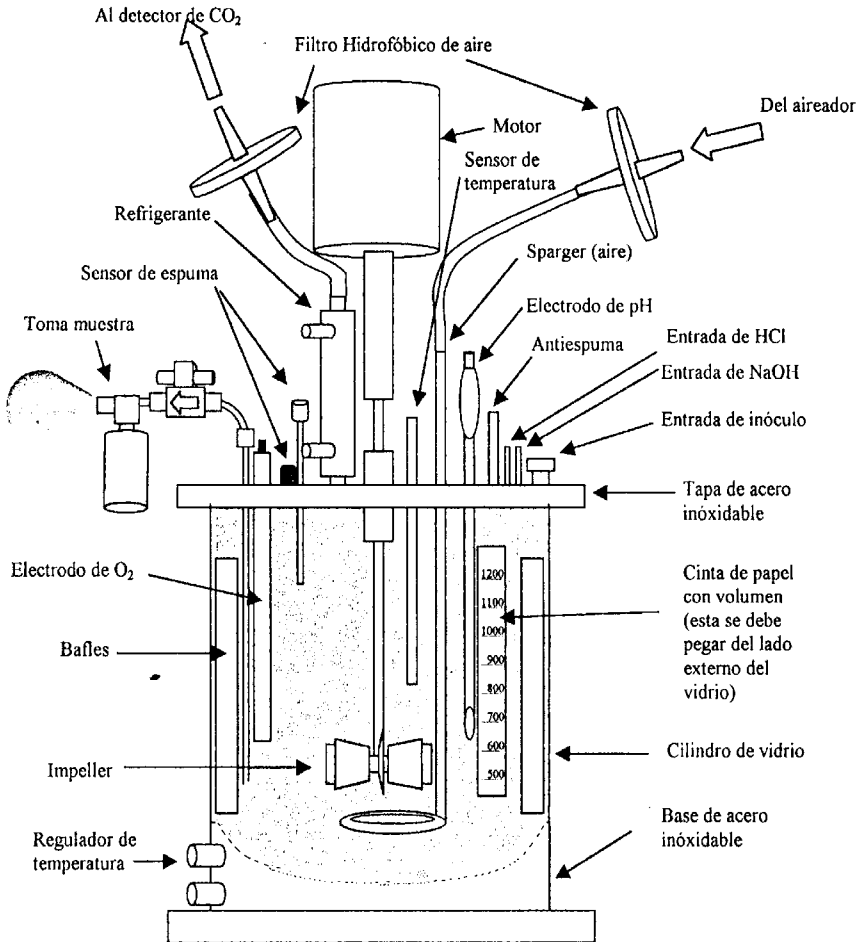


Figura 2.2.1-Esquema del biorreactor utilizado en los ensayos.

2.2.1.4.- Análisis de las muestras.

- Se centrifugaron 10 mL de muestra, 12-15 min a 10.000 rpm en un equipo Sorvall RCF. El sobrenadante se congeló a -20°C para posteriormente realizar la determinación de la concentración de glucosa (por el método colorimétrico de glucosa-oxidasa, Wiener Argentina) y la concentración de etanol (mediante Kit enzimático, BOEHRINGER MANNHEIN / R- BIOPHARMS).

- El pellet de levaduras fue lavado para eliminar restos de medio de cultivo y centrifugado. El nuevo pellet fue resuspendido en agua destilada, transvasado a un pesafiltros previamente tarado y secado a 105°C para determinar el contenido en materia seca (MS) de la muestra.

- En el resto de la muestra sin centrifugar se efectuaron las medidas de pH (con peachímetro BOECO BT 500) y DO₆₂₅ (con espectrofotómetro BECKMAN DH 600). Además se controló el estado de las células y la posible contaminación por observación microscópica.

2.2.2.- Sistema fed-batch

Este método se empleó con el objeto de optimizar la productividad evitando fenómenos de inhibición por sustrato para alcanzar una alta concentración de biomasa sin formación simultánea de etanol.

En el esquema de la Figura 2.2.2-se simbolizan las distintas variables como se detalla a continuación:

F (t): caudal de alimentación.

S_r (t): concentración de sustrato de la alimentación.

V_f: volumen final de trabajo.

V_o: volumen al inicio de la alimentación.

X_o: concentración de biomasa al inicio de la alimentación.

S_o: concentración de sustrato limitante al inicio de la alimentación.

Se realizó un cultivo en batch alimentado de la levadura *S. cerevisiae*, aislada en el laboratorio. El medio y las condiciones de cultivo a emplear en el batch previo al comienzo de la alimentación ya fueron descritos.

El diseño de la alimentación se realizó teniendo en cuenta que para *S. cerevisiae*, el $\mu_{\max} = 0,45 \text{ h}^{-1}$ pero que μ no debe superar el valor de 0,3 ya que por encima de éste el microorganismo produce etanol. Además, se asume que el rendimiento de biomasa en función del sustrato ($Y_{x/s} = 0,45 \text{ g X/g S}$).

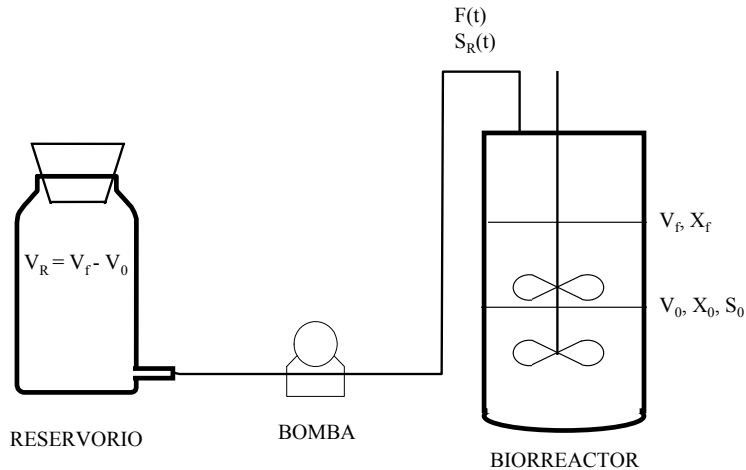


Figura 2.2.2- Esquema del equipamiento usado en el cultivo fed batch.

Con estos datos se calcularon F , S_r y t_f tales que cumplan con las condiciones impuestas. También se evaluó la evolución de: concentración de biomasa (X), velocidad de crecimiento (XV) y velocidad específica de crecimiento (μ) durante la alimentación.

Las condiciones del cultivo alimentado fueron:

$$S_0 \text{ batch} = 14,717 \text{ g/L}$$

$$\text{Peso seco final del batch} = 6,81 \text{ g/L}$$

$$V_0 = 2,5 \text{ L}$$

$$V_f = 3,9 \text{ L}$$

$$F(t) = 2,97 \text{ mL/min (o } 178 \text{ mL/h)}$$

$$\text{Caudal de aire} = 1.820 \text{ mL/min}$$

$$S_r = 63,5 \text{ g/L}$$

$$\text{Tiempo de alimentación: } 8 \text{ h.}$$

El protocolo de trabajo es el mismo que el mencionado para el cultivo en Batch.

- Medios de cultivo para la alimentación (para 500 mL):

Glucosa.....	63,5 g
Urea.....	2,2 ml (del stock con 400 g/L)
K ₂ HPO ₄	6 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	3,6 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,6 g
Ácido Cítrico.....	2,7 g
Sol. de cationes.....	6 mL
Sol. de aniones.....	6 mL
Sol. de vitaminas.....	6 mL

Antiespumante 3 gotas

pH: 5,50 (ajustado con HCl 1 N).

2.2.3.- Evaluación de la biomasa.

2.2.3.1.- Características de calidad de la biomasa.

2.2.3.1.1.- Viabilidad. Prueba del azul de metileno.

Este método permite diferenciar las levaduras vivas de las muertas. Se basa en la presencia de enzimas en las células vivas que reducen el colorante a leucoderivado incoloro. De modo que las células vivas permanecen incoloras y las muertas se tiñen de color azul (OIV).

Técnica: Se resuspende una alícuota de la biomasa en agua estéril, se deposita una gota en portaobjetos, se agrega el reactivo azul de metileno (solución 0,1 %), se cubre con cubreobjetos y al cabo de 5 min se observa al microscopio en campo claro. Las células vivas permanecen incoloras y las muertas se tiñen de azul (OIV).

2.2.3.1.2.- Recuento le levaduras en placa con Agar papa-dextrosa.

Se sembraron diluciones desde 10⁻³ hasta 10⁻⁸ y se incubaron a 30°C ± 2 durante 72 h.

2.2.3.1.3.- Recuento de bacterias del ácido láctico. Método de recuento en placas en Agar de Man Rogosa Sharpe (MRS) (Figura 2.2.3).

Se usaron cinco diluciones a los fines de lograr un conteo inferior a las 300 UFC por placa. La incubación se realizó a 32°C durante 3 días (AOAC, 1984).

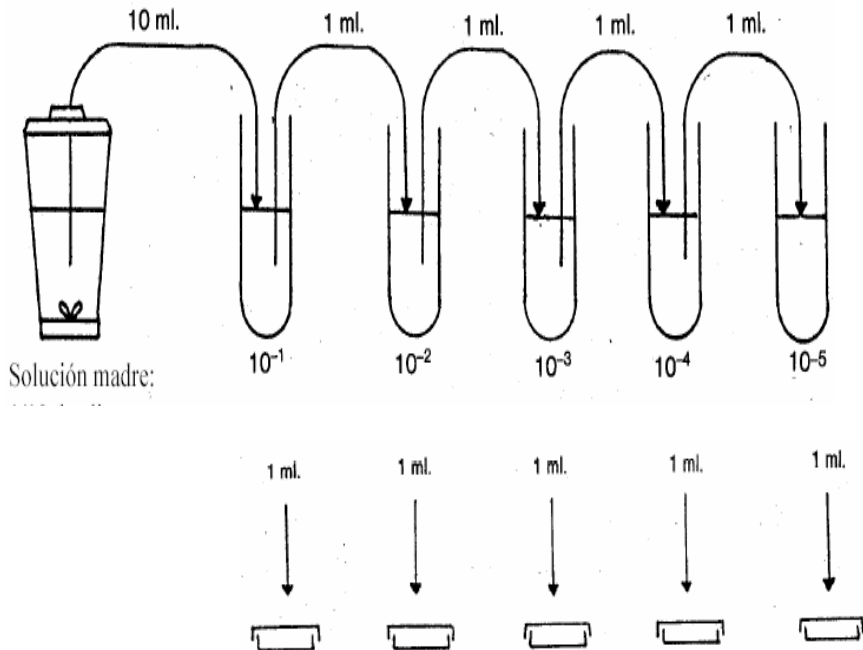


Figura 2.2.3- Esquema del método de siembra para el recuento de bacterias del ácido láctico.

2.2.3.1.4.- Recuento de coliformes totales y fecales. Método de placas Petrifilm.

El recuento de coliformes totales y fecales se realizó según las etapas indicadas en las Figura 2.2.4

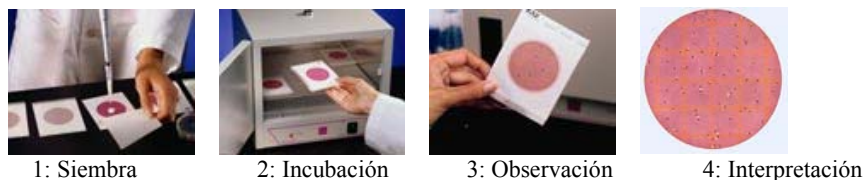


Figura 2.2.4-Método Petrifilm para el recuento de bacterias coliformes.

2.2.3.1.5.- Presencia de Clostridios sulfitoreductores en caldo de hígado (AOAC, 1984). Según Figura 2.2.5.

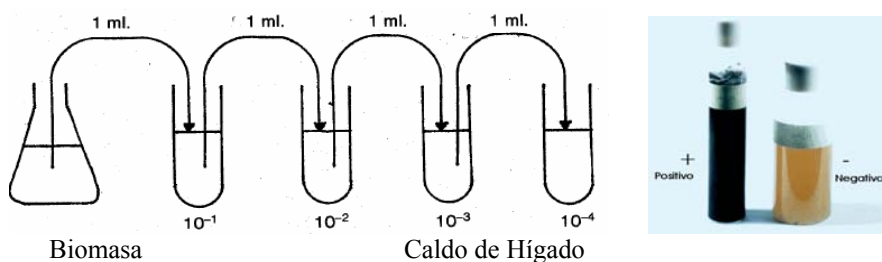


Figura 2.2.5:- Esquema del método de siembra para la detección de Clostridios sulfitoreductores.

2.2.3.1.6.- Presencia de Streptococos fecales en agar con azida sódica.

El resultado positivo de este análisis se evidencia por formación de colonias características, como las que se observan en la Figura 2.2.6 (AOAC, 1984).

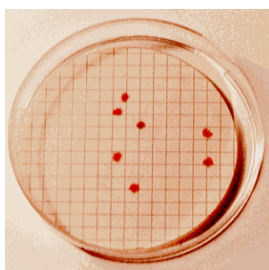


Figura 2.2.6:- Colonias típicas de Streptococos fecales en agar con azida sódica.

2.2.3.2.- Características enológicas primarias de *S. cerevisiae*.

Se determinaron los siguientes parámetros:

2.2.3.2.1.- Poder alcoholígeno a dos temperaturas de fermentación.

Se realizaron microvinificaciones de mosto de jugo natural de naranja (ajustada la concentración de azúcar a 70 g/L), inoculado con la crema de levadura en una concentración de 2 g/L de mosto (UFC/mL $\cong 1,5 \times 10^7$), se incubaron a 20°C y 10°C respectivamente, para estudiar el vigor de fermentación (VF), tolerancia al etanol y las propiedades criotolerantes de *S. cerevisiae*. La cuantificación del alcohol se realizó mediante el kit Enzymatische BioAnalytik, Roche. La tolerancia al etanol se determinó por recuento de células viables en cámara de Neubauer y UFC/mL, una vez finalizada la fermentación.

2.2.3.2.2.- Rendimiento azúcar/alcohol.

De los valores de azúcares consumidos (Lane-Eynon, en Ting and Rouseff, 1986) y el alcohol producido en los ensayos de microvinificación se determinó que cantidad de azúcar (en g/L) fue necesaria para producir 1 % v/v de etanol.

2.2.3.2.3.- Alta pureza de fermentación (PF).

En los productos de los ensayos de microvinificación se determinaron acidez volátil (expresado como g ácido acético/L). Los resultados se expresaron como la relación etanol (% p/v) / ácido acético (g/L).

2.2.3.2.4.- Poder fermentativo a bajo pH.

Se ajustó el mosto de jugo de naranja a dos pHs: 3,5 y 4,0 respectivamente. Se inoculó con la levadura en estudio a razón de 2×10^6 células/mL, e incubó a 20°C. Al cabo de 30 días se determinó la concentración de etanol en ambos medios y el número de células viables de levaduras (por recuento en cámara de Neubauer).

2.2.3.2.5.- Producción de H₂S.

Se determinó cualitativamente mediante reacción con PbC₄H₆O₄ en medio ácido (Pérez *et al.*, 1999).

2.2.3.2.6.- Resistencia al SO₂.

Se procedió a la adición de cantidades crecientes de KHSO₃ (desde 50 hasta 145 ppm) a los mostos de jugo natural de naranja. Se inocularon los mostos con la levadura en estudio, se incubaron en erlenmeyers a 20°C y 10°C. Al cabo de 24 y 48 h se determinaron concentración de azúcares y alcohol etílico. En cada ensayo se tomó el tiempo necesario para que comience la fermentación.

2.2.3.2.7.- Determinación del poder floculante.

Se realizaron microvinificaciones de mosto de jugo natural de naranja a pHs: 3,5 y 4,0, y con el agregado de Ca⁺⁺ en dos concentraciones: 300 y 500 ppm. Los resultados se obtuvieron por observación directa y microscópica.

2.2.3.2.8.- Formación de espuma.

Esta característica fue evaluada para *S. cerevisiae* comparando con *S. bayanus* (comercial). Para ello se inoculó en tubos de ensayo (16 mm × 160 mm) conteniendo 10 mL de mosto estéril (20 °Brix, pH: 3,5). Se incubaron a 10°C y 20°C. Se procedió a realizar las medidas de la altura (mm) de la espuma formada, diariamente durante la fermentación.

2.3.- RESULTADOS Y DISCUSION

2.3.1.- Obtención de biomasa de la *S. cerevisiae* aislada.

2.3.1.1.- Sistema Batch

El seguimiento del cultivo se realizó durante un período de 7,5 h, al cabo del cual se pudo apreciar que la levadura utilizó rápidamente la FCE proporcionada, produciendo etanol (Figura 2.3.1).

También se pudo observar que la producción de biomasa fue muy baja, con un leve aumento luego de 3 h de cultivo.

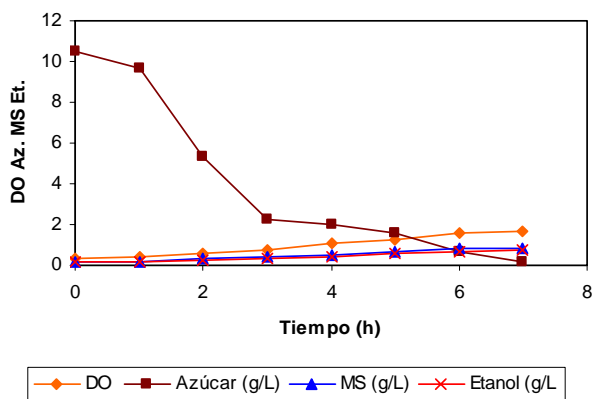


Figura 2.3.1: Evolución del cultivo batch de *S. cerevisiae*

Como es conocido, *S. cerevisiae* cultivada en sistema batch, aún en exceso de O_2 disuelto, presenta efecto Crabtree + y exhibe una cinética de crecimiento de dos fases (diauxia). Durante la primera fase metaboliza la glucosa con producción de etanol. Los datos de rendimientos ($Y_{X/S}$) reportados en esta fase no sobrepasan los 0,1 a 0,15 g X/g glucosa. Debido a la oxidación incompleta de la glucosa, el cociente respiratorio (r_{CO_2}/r_{O_2}) es mayor a 1 (Rose y Harrison, 1987).

En la segunda fase, el etanol formado previamente sirve de sustrato. Después de 1-2 h, durante las cuales el medio se agota en glucosa, las células comienzan a metabolizar el etanol. El coeficiente

respiratorio desciende, aproximándose a un valor de 0,66 (teórico). $Y_{X/S}$ alcanza valores de 0,35 g X/g glucosa (Rose y Harrison, 1987).

Muchos autores apoyan la definición del efecto Crabtree como consecuencia de la capacidad respiratoria limitada de la célula. La razón es que se satura el ciclo de Krebs a altas velocidades de consumo de glucosa. Es evidente que las células no presentan un metabolismo fermentativo puro; una parte de la glucosa total se degrada por oxidación en el ciclo de respiración, el resto se degrada fermentativamente siendo el acetaldehído el aceptor de electrones

En condiciones en donde se lleva a cabo la respiro-fermentación ocurre una adaptación fisiológica celular expresada en una disminución de las funciones mitocondriales (Barford, 1989).

No obstante, se ha demostrado que en cultivos de levaduras la limitación en la capacidad respiratoria no es la causa primaria del efecto Crabtree. Este efecto puede ser atribuido a la diferencia en la cinética de la asimilación de glucosa, la síntesis de carbohidratos de reserva y el metabolismo del piruvato (van Urk *et al.*, 1989).b

En un cultivo batch se ha identificado que el catabolismo oxidativo y fermentativo de la glucosa ocurren simultáneamente, resultando en una disminución del rendimiento de biomasa.

La determinación del cociente respiratorio (CR) mediante el análisis de los gases de salida del biorreactor reafirma el mencionado comportamiento de *S. cerevisiae* en cultivo batch (Figura 2.3.2).

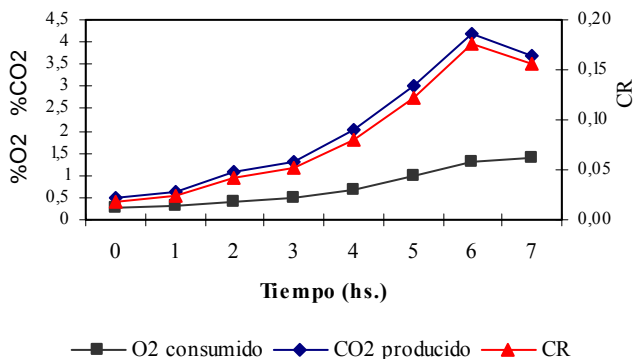


Figura 2.3.2: Evolución de los gases de salida y del cociente respiratorio (CR) en cultivo batch de *S. cerevisiae*.

La evolución del pH refleja claramente el metabolismo de la urea que es hidrolizada a CO_2 y NH_3 , este último se consume produciendo un descenso en el pH por liberación de protones desde el interior de la célula.

La disminución del pH se ve favorecida por la producción de ácidos por el microorganismo (Figura 2.3.3).

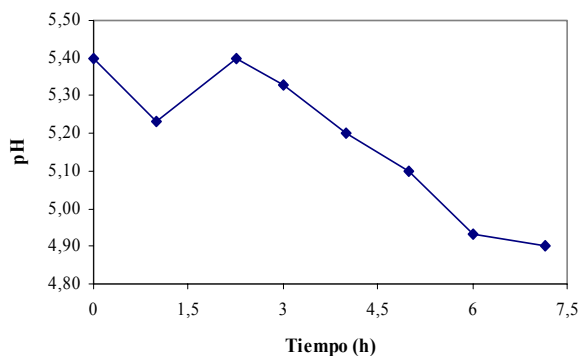
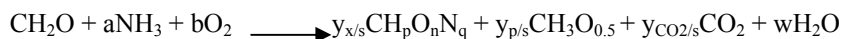


Figura 2.3.3: Evolución del pH en cultivo batch de *S. cerevisiae*.

Al cabo de 23 h de cultivo, el pH alcanzó un valor de 7,14, lo cual es consecuencia de la asimilación de los ácidos producidos.

Con los datos de MS se determinó que la velocidad específica de crecimiento de la levadura, en las condiciones del cultivo fue de $0,27 \text{ h}^{-1}$. El rendimiento obtenido, determinado como $Y_{x/s} = -\Delta X / \Delta S$ fue de $0,06 \text{ g X/g glucosa}$.

El metabolismo respiro-fermentativo de la levadura sobre glucosa puede ser representado por una simple ecuación:



Donde a , b , $y_{x/s}$, $y_{p/s}$, $y_{\text{CO}_2/s}$ y w son los coeficientes estequiométricos, y CH_2O , $\text{CH}_p\text{O}_n\text{N}_q$ y $\text{CH}_3\text{O}_{0.5}$ corresponden a las composiciones elementales del sustrato (glucosa), biomasa y etanol

(producto extracelular), respectivamente.

El balance energético puede ser escrito como:

$$\eta + \varepsilon + \xi = 1$$

Donde η es el rendimiento energético en biomasa, ε es la fracción de electrones transferidos al oxígeno y ξ es el rendimiento energético del producto.

El balance correspondiente para el carbono es:

$$y_{x/s} + y_{p/s} + y_{CO_2/s} = 1$$

Donde $y_{x/s}$, $y_{p/s}$ y $y_{CO_2/s}$ son las fracciones de carbono del sustrato transferido a la biomasa, al producto y al CO_2 , respectivamente.

Para realizar los balances se consideró que la fórmula elemental de la levadura corresponde a la de un microorganismo promedio, en consecuencia $\sigma_x = 0,446$ y $\gamma_x = 4,2$, siendo σ_x y γ_x la fracción de carbono del sustrato transferido a la biomasa y el grado de reducción de la biomasa, respectivamente. Para el sustrato (glucosa) $\gamma_s = 4,0$ y para el etanol $\gamma_{Et} = 6,0$.

Experimentalmente se obtuvo: $y_{x/s} = 0,0691$ cmol/cmol; $y_{p/s} = 0,562$ cmol/cmol y $y_{CO_2/s} = 0,389$ cmol/cmol. Los balances correspondientes para la FCE son:

- Balance para la fuente de carbono:

$$0,0691 \text{ cmol/cmol} + 0,562 \text{ cmol/cmol} + 0,389 \text{ cmol/cmol} = 1,020$$

- Balance de energía:

$$0,0691 \text{ cmol/cmol} \times 4.2/4,0 + 0,562 \text{ cmol/cmol} \times 6/4 + \\ + 0,0596 \text{ cmol/cmol} \times 4/4 = 0,975$$

Estos valores se encuentran dentro de los límites de aceptabilidad determinados estadísticamente, no poniendo en evidencia errores experimentales en las determinaciones (Ertola *et al.*, 1994).

De los datos obtenidos puede concluirse que este tipo de cultivo no es adecuado si el objetivo es producir biomasa ya que el rendimiento

obtenido es muy bajo debido al efecto Crabtree. Cabe destacar que la masa celular obtenida, aproximadamente 0,06 g/g de glucosa, fue marcadamente inferior al promedio encontrado en bibliografía para esta levadura que es de entre 0,1 y 0,15 g/g de glucosa (Rose and Harrison, 1987).

2.3.1.2.- Sistema fed-batch

Para incrementar el rendimiento celular se decidió trabajar en cultivo discontinuo alimentado (fed-batch). Este cultivo se inicia a partir de un cultivo en batch utilizando como sustrato limitante la glucosa. Se calcularon la evolución de la biomasa durante el cultivo, la velocidad específica de crecimiento y la productividad.

Se empezó el batch alimentado con 1,5 L de cultivo del día anterior y se alimentó a razón de 2,75 mL/min. El caudal de aire inicial fue de 1041,33 mL/min. Luego se cambió a 2331,765 mL/min. La primera muestra se tomó 15 min después de haber comenzado la alimentación.

El diseño de las condiciones de cultivo (F y S_r) se realizó en función de las condiciones iniciales del cultivo (X_0 y V_0), del volumen final (V_f), la cantidad de biomasa total que se desea obtener ($X_f V_f$) y de datos fisiológicos del microorganismo (μ e $y_{x/s}$).

Debido a que *S. cerevisiae* produce etanol cuando crece a velocidades específicas mayores que $0,3 \text{ h}^{-1}$, se comienza a alimentar teniendo en cuenta este valor y no μ_{\max} . Considerando una biomasa inicial y final de 7 g/L y 15 g/L respectivamente, un volumen inicial y final de 2,5 L y 4,0 L respectivamente y un rendimiento de 0,5 g/g, se determina un caudal de 178 mL/h a una concentración de glucosa de 63,5 g/L.

El batch previo se sembró en un medio con una concentración de glucosa de 15 g/L (aprox.). La biomasa inicial del batch alimentado (BA) es de 6,81 g/L.

Pudo observarse que el crecimiento total de biomasa (XV) en función del tiempo es lineal, lo que es coherente con el diseño de alimentación a caudal constante.

Debido al ingreso de sustrato a velocidad constante, las velocidades de consumo de O_2 y producción de CO_2 mantienen valores estables durante todo el cultivo.

A diferencia de lo que ocurrió en el cultivo en batch, durante toda la fase de crecimiento se observó que el cociente respiratorio fue cercano a 1 y no se detectó producción de etanol.

El rendimiento celular fue mucho mayor que el correspondiente a la fase de consumo de glucosa del batch (debido a la ausencia de formación de producto)

Considerando crecimiento con formación de biomasa y CO_2 como únicos productos carbonados, los balances de carbono y grado de reducción (balance energético) dan 1,02 y 1,051 respectivamente, lo que indica que el modelo utilizado responde muy bien a la realidad del cultivo.

Puede observarse que debido a que la velocidad volumétrica de crecimiento ($r_X V$) es constante y al continuo incremento de biomasa (XV), la velocidad específica de crecimiento (μ) disminuye continuamente durante el cultivo.

Los resultados se muestran en la Tabla 2.3.1.

Tabla 2.3.1. Resultados cultivo fed batch *S. cerevisiae*

Muestra	T. (h)	Vol. alic. (mL)	Vol. (mL)	PS (g/L)	X.V (g)	Glucosa (mg/L)	O ₂ (%)	CO ₂ (%)	rO ₂ (mmol/L.h)	rCO ₂ (mmol/L.h)	CR	rO ₂ .V (mmol/L.h)	rCO ₂ .v (mmol/L.h)	μ	μ teórico
1	0	30	2698	6,81	18,37	ND	18,08	2,43	51,0	40,7	0,80	137,70	109,70	0,345	0,345
2	1	32	2844	7,46	21,22	ND	17,89	3,45	48,4	55,3	1,14	137,75	157,38	0,299	0,257
3	2,5	30	3081	10,36	31,92	ND	17,01	3,6	60,1	52,8	0,88	185,03	162,72	0,199	0,185
4	4	65	3283	13,13	43,11	ND	18,75	2,3	31,0	31,8	1,03	101,66	104,54	0,147	0,145
5	5,5	35	3515	14,14	49,70	ND	18,32	2,9	34,0	37,6	1,11	119,41	132,09	0,128	0,119
6	7	30	3752	16,33	61,27	ND	17,87	3,2	37,7	38,8	1,03	141,45	145,48	0,103	0,101
7	8	30	3900	17,72	69,11	ND	17,60	3,37	39,7	39,2	0,99	154,74	153,02	0,092	0,092

CO₂ total producido = 1108,96 mmoles

O₂ total consumido = 1104,4 mmoles

Sr. (Vf-Vi) (Sustrato total consumido) = 90,42g Y_{x/s} = 0,561g/g

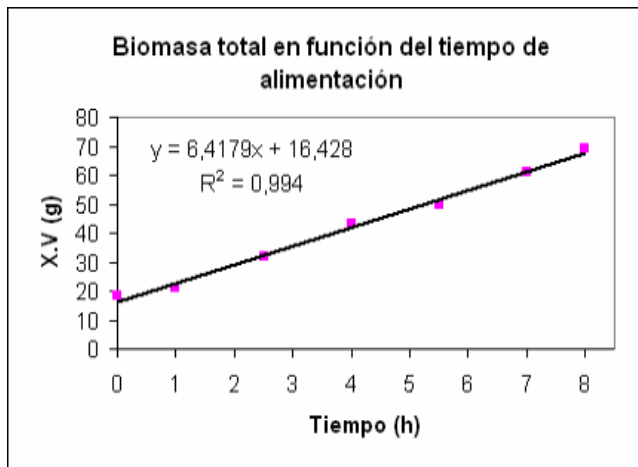
y_{x/s} = 0,652 cmol/cmol

y CO_{2/s} = 0,36794

b = 0,36642

Balance de C = 1,02

Balance de Grado de Reducción = 1,051



2.3.2.- Evaluación de la biomasa

2.3.2.1.- Viabilidad.

La calidad de las levaduras para vinificación se describe, normalmente, refiriéndose a su "Viabilidad" o a su "Vitalidad." La viabilidad de la *S. cerevisiae* se determinó mediante técnicas de proliferación celular o recuento en placa y tinción con azul de metileno en tampón citrato.

La prueba de viabilidad con azul de metileno se realizó por triplicado y arrojó un valor promedio de 80% de células viables.

2.3.2.2.- Recuento de levaduras en placa con Agar papas-dextrosa.

Se realizó en las placas incubadas con las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} . El promedio de dicho recuento fue de $5,2 \times 10^8$ UFC/g de biomasa húmeda. Para la levadura comercial se reporta $> 2 \times 10^{10}$ UFC/g de levadura seca.

2.3.2.3.- Recuento de bacterias lácticas.

El examen de bacterias del ácido láctico arrojó un número menor a $1,2 \times 10^3$ UFC/g de biomasa. Este valor está dentro de los límites señalados para productos comerciales.

2.3.2.4.- Recuento de coliformes totales y fecales.

En cuanto a los análisis de microorganismos contaminantes peligrosos, los ensayos revelaron ausencia de: coliformes totales y fecales

2.3.2.5.- Presencia de Clostridios sulfitorreductores.

Los análisis revelaron ausencia de Clostridios sulfitorreductores

2.3.2.6.- Presencia de Estreptococos fecales.

Los análisis revelaron ausencia de Estreptococos fecales.

Estos tres últimos resultados garantizan la inocuidad de esta levadura desde el punto de vista de contaminación bacteriana.

2.3.3.- Características enológicas primarias de la biomasa

2.3.3.1.- Poder alcoholígeno.

Cada ensayo se realizó por triplicado, y cuando los cultivos alcanzaron como promedio 2 g/L de azúcares residuales (24 h para los incubados a 20°C y 72 h para los incubados a 10°C), se cuantificó la concentración de etanol dando como resultado, para el ensayo a 20°C una media de 10,6 g/100 mL, mientras que para el ensayo a 10°C la media fue de 12 g/100 mL. Estos valores son similares a los reportados por Regodon *et al.* (1997), quienes trabajaron con levaduras preseleccionadas en mostos de uva fermentados.

Los resultados de los recuentos de células viables, cuando se incubó a 10°C y 20°C fueron $1,2 \times 10^2$ y < 10 células/mL, respectivamente. Es de hacer notar que los mismos se llevaron a cabo a las 24 h el primero y a las 72 h el último. La supervivencia de las levaduras a estas concentraciones de alcohol se podría deber al efecto protector de algunas sustancias del mosto, tales como los esteroides. Pina *et al.* (2003) estudiaron la tolerancia al etanol de *S. cerevisiae* y levaduras *non-Saccharomyces*, en medios de cultivo con 25 mg/L de ergosterol y 1 g/L de Tween 80, comparando los resultados con los inoculados en medio sin suplementar. Ellos encontraron que la supervivencia aumentaba en el medio suplementado.

El etanol y su metabolito precursor el acetaldehído son tóxicos para todas las levaduras, incluidas *Saccharomyces sp.* El etanol afecta profundamente el metabolismo de estos microorganismos especialmente alterando la membrana citoplasmática (MC) y por ende la asimilación de N y transporte de glúcidos.

Son varios los factores que de hacerse presentes junto con la concentración de alcohol etílico inhiben el desarrollo de las levaduras. Entre ellos cabe mencionar: pH muy bajos, altas temperatura, agotamiento de FN, glúcidos, ácidos grasos de cadena corta y deficiencia de esteroides y vitaminas (Stanley and Douglas, 1993).

El etanol es claramente inhibitorio para las levaduras. El crecimiento de las células se detiene a concentraciones relativamente bajas de etanol y la fermentación a concentraciones relativamente altas. La disminución de velocidad de producción de etanol está relacionada con la disminución en el número de células viables. La inhibición del desarrollo celular por el etanol es no competitiva y puede ser descrita por una función lineal o exponencial de la concentración de etanol.

La fisiología básica del efecto inhibitorio del etanol aún no es demasiado clara. Las cepas altamente tolerantes son aquellas que almacenan menos lípidos comparadas con otras. La membrana citoplasmática es sensible al contacto con etanol, ya que el etanol es anfipático. La composición lipídica de la membrana citoplasmática puede ser importante para la tolerancia al etanol.

Los esferoplastos provenientes de células etanol tolerantes son estables en solución con 20 % (v/v) de etanol. Se ha reportado que la membrana citoplasmática tolera mejor el etanol en medios suplementados con proteolípidos. Concentraciones intracelulares de etanol cercanas al umbral de inactivación de alcohol deshidrogenasa matan la célula (Benítez *et al.*, 1983).

2.3.3.2.- Rendimiento azúcar / alcohol.

Los resultados promedios obtenidos fueron 16,7 g/L para la fermentación a 20°C y 15,7 g/L para la fermentación a 10°C. La especificación de la levadura comercial para esta característica es de 16 g/L de azúcar para producir 1 % (v/v) de alcohol.

Los resultados del poder fermentativo y del rendimiento azúcar/alcohol ponen en evidencia que la *S. cerevisiae* en estudio tiene buenas características criotolerantes.

Si bien *S. cerevisiae* fue aislada de jugo de naranja fermentado, lo cual revela que la misma crece espontáneamente en las condiciones naturales del jugo, particularmente a su bajo pH, es de importancia tecnológica determinar la producción cuantitativa de etanol en estas condiciones extremas.

En los ensayos realizados la concentración alcohólica (poder fermentativo) dieron como promedio 9,5 g/100 mL para la fermentación a pH 3,5 y 12 g/100 mL para pH 4. Esto revela que el valor extremo de pH no inhibe la producción de etanol hecho que por otra parte resulta beneficioso para impedir el desarrollo de la microbiota natural del jugo que podría resultar en fermentaciones anormales. Para la levadura comercial se reporta buena actividad fermentativa a baja temperatura y a pH de medio a bajo.

Sin embargo, el mayor porcentaje de etanol producido a pH 4,0 hace suponer que la levadura es sensible a la alta acidez. Circunstancia que se corrobora en los respectivos recuentos, que a pH 4,0 se redujo en

4 ciclos logarítmicos, mientras a pH 3,5 lo hizo casi en 6. El estrés de la concentración alcohólica sumado al descenso de pH puede incrementar la sensibilidad de la levadura, tanto en lo que respecta al poder fermentativo como al crecimiento (Gao y Fleet, 1988).

2.3.3.3.- Alta pureza de fermentación (PF).

El ensayo que arrojó un valor medio de 10,6 % (p/v) de etanol, resultó con un contenido medio de 1,2 g/L de ácido acético, mientras que cuando el contenido medio de etanol fue de 12 %, (p/v) la acidez volátil fue 1,4 g de ácido acético/L. Estos valores denotan la habilidad de esta levadura para formar pocos productos indeseables en el curso de la fermentación (Martini, 2003).

2.3.3.4.- Producción de SH₂.

El SH₂ puede aparecer como producto natural en el vino debido a que lo producen en pequeña proporción, ciertas levaduras a partir de los aminoácidos azufrados (Herraiz y Cabezudo, 1989). En los ensayos realizados no se detectó presencia de H₂S a ninguna de las dos temperaturas, probablemente esto se deba a la composición de los aminoácidos del jugo de naranja.

2.3.3.5.- Resistencia al SO₂.

El agregado de SO₂ hasta cantidades de 150 ppm no afectó la cinética de la fermentación, pero se observó un leve retraso a 10°C, lo cual también se observó sin el agregado de SO₂. Por lo que se concluye que la levadura utilizada soporta adecuadamente las cantidades de SO₂ utilizadas.

El comienzo de la fermentación se dio a las 24 h a 20°C y a las 72 h a 10°C. Es probable que la levadura soporte concentraciones mayores que la máxima probada pero por razones sanitarias y sensoriales, en la elaboración del vino de naranja no se superó el límite de 150 ppm compatible con el uso de frutas sanas y procesadas en condiciones asépticas.

Se ha demostrado que *S. cerevisiae* en presencia de 250 mg/L de SO₂ libre comienza su proceso de fermentación después de 4 días de haber sido inoculado (Regodon *et al.*, 1997). Otros estudios demostraron, que la fermentación por levaduras seleccionadas se completaba con correcta cinética hasta valores de 350 mg/L de SO₂ total, valores superiores producían retrasos de hasta 1 día en el arranque de la

fermentación, aunque algunas cepas acababan con valores superiores a 500 mg/L de SO₂ total (Morata *et al.*, 2001).

2.3.3.6.- Determinación del poder floculante.

El carácter floculante en cepas vínicas de *S. cerevisiae* constituye una propiedad tecnológica de gran interés en la elaboración de vinos, ya que la capacidad que manifiestan las células de levaduras para agregarse espontáneamente permite una rápida sedimentación de las mismas en los mostos. Esto conlleva a facilitar las operaciones de trasiego.

La floculación es una característica intrínseca de la pared celular de las levaduras controladas por factores genéticos y ambientales. Entre las condiciones ambientales consideradas se encuentran: pH, concentración de alcohol etílico y concentración de Ca⁺².

El Ca⁺² es un catión esencial para la inducción de la floculación porque activa las lectinas específicas de la pared celular de las levaduras reduciendo adicionalmente las fuerzas de repulsión electrostática de las células (Soares y Seynave, 2000).

Los resultados observados fueron los siguientes: a pH 4, el líquido separado estaba perfectamente límpido la observación microscópica reveló la presencia de cinco levaduras por campo. A pH 3,5, el líquido presentaba una marcada turbidez y microscópicamente se observaron a razón de quince levaduras por campo. En cuanto a los ensayos con el agregado de Ca⁺² estos revelaron que a mayor concentración de iones Ca⁺² mayor limpidez y por ende menos células en suspensión. Esto demuestra que la capacidad floculante de esta levadura aumenta con el pH y concentración de Ca⁺².

Hay información acerca del efecto del pH y la concentración de CaCl₂ sobre la floculación de *S. cerevisiae* que remarca el hecho de que a mayor concentración de esta sal y a mayor valor del pH menor es la capacidad de floculación de levadura (Simón *et al.*, 2001).

2.3.3.7.- Formación de espuma.

Las dos levaduras ensayadas en las condiciones indicadas en la metodología mostraron baja producción de espuma, con medidas menores a 2 mm durante la fermentación tumultuosa y a las dos temperaturas (10°C y 20°C).

Cabe aclarar que no se estudió el fenotipo respecto al carácter killer de la levadura autóctona, ya que estudios recientes han cuestionado la importancia tecnológica que hasta ahora se le había otorgado al mismo para la selección de una levadura vínica (Epifanio *et al.*, 2001).

TERCERA PARTE:
PRODUCCION DE VINOS DE NARANJA

CAPITULO 1:
FERMENTACION DE LOS MOSTOS

1.1. INTRODUCCION

En todo proceso microbiológico se deben considerar tres aspectos importantísimos a saber:

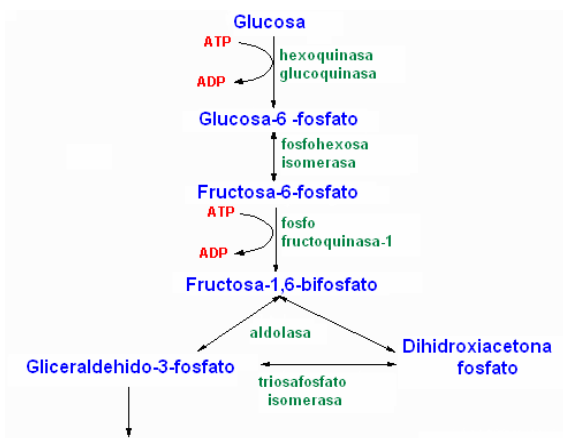
- La materia prima.
- Los factores físicos y químicos.
- El/los microorganismos.

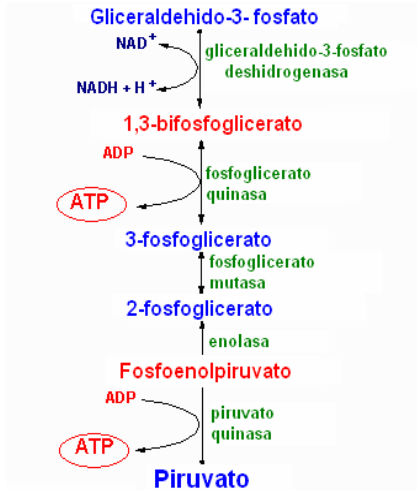
El proceso de vinificación es una fermentación industrial atípica ya que no interesa la obtención de un producto concreto sino la transformación global del mosto en vino. Este proceso se realiza en condiciones no estériles. Los factores a considerar son: **composición del mosto, condiciones operativas y microbiota implicada.**

1.1.1.- Microbiota implicada en el proceso fermentativo

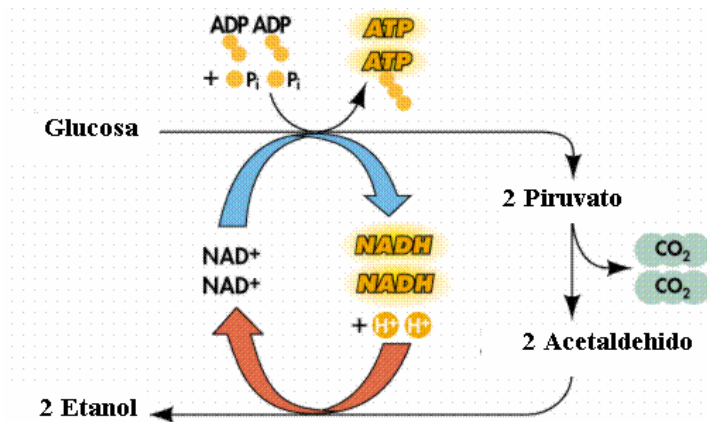
De los tres aspectos mencionados se desarrolló en profundidad el concerniente a la microbiota, específicamente las levaduras lo que para este proceso en particular es un factor fundamental.

La degradación de azúcares por las levaduras, vía glicolítica, comprende un conjunto de reacciones catalizadas por enzimas citosólicas que permiten a las células transformar las hexosas del mosto (glucosa y fructosa) en ácido pirúvico. Esta ruta procede de la siguiente manera:





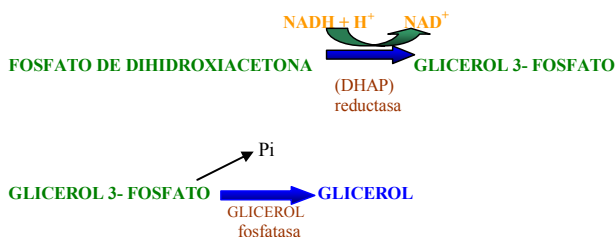
Estas reacciones de degradación de los azúcares hasta ácido pirúvico constituyen el primer estadio de la fermentación alcohólica. Luego el ácido pirúvico es descarboxilado y transformado en acetaldehído, que finalmente es reducido a alcohol, gracias a la alcoholdehidrogenasa en presencia de NAD reducido.



Entre las propiedades enotécnicas de las levaduras vínicas se deben destacar en primer lugar las denominadas propiedades primarias, definidas como las estrictamente relacionadas con la formación de alcohol etílico por fermentación, y las secundarias como aquellas relacionadas con la producción de compuestos que afectan otros parámetros tales como cuerpo, producción de alcoholes superiores y la aparición de olores y sabores indeseables.

No todas las moléculas de azúcares del mosto son degradadas con producción de 2 moléculas de etanol y 2 de CO₂ por cada molécula de glucosa metabolizada. Algunas se degradan mediante fermentación gliceropirúvica, dando como producto final el glicerol.

La formación de glicerina componente más importante después del etanol, y al que se le atribuye características de suavidad y aterciopelado en el vino, se lleva a cabo por reducción de la fosfodihidroxiacetona proveniente de la degradación de la fructosa-1,6-difosfato en la ruta de Embden Meyerhoff.

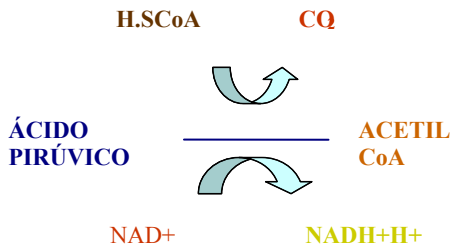
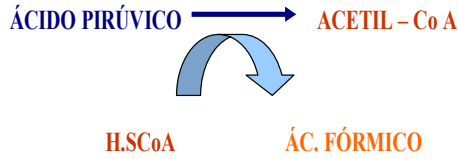


Además, toda fermentación está acompañada por el ácido acético y sus ésteres.

La misma puede tener lugar simultáneamente a las del ácido fórmico, que se encuentra en los vinos en niveles muy bajos.

También puede tener lugar por descarboxilación oxidativa del piruvato, especialmente en *S. cerevisiae*.

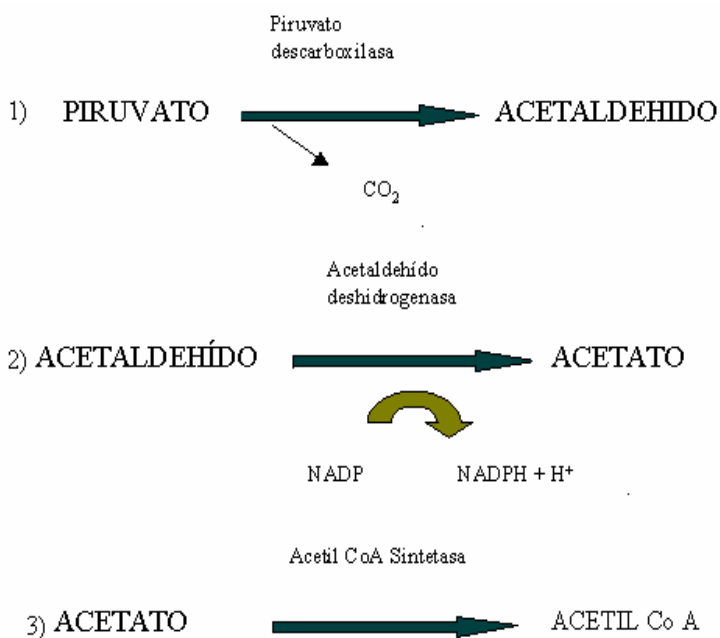
En el siguiente esquema se observa su formación



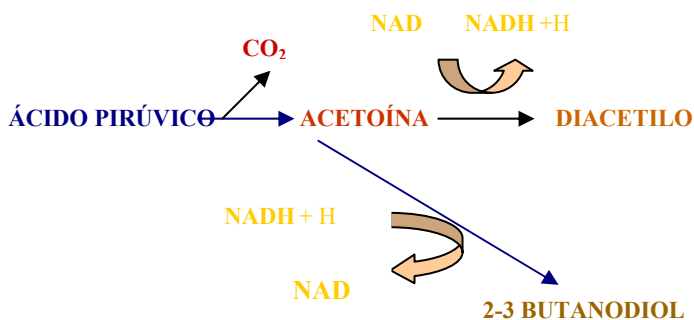
Esta ruta está mediada por el complejo enzimático de la piruvato deshidrogenasa que transforma al piruvato en acetil Co A, (ver esquema anterior)

Parte del acetil Co A, finalmente puede ser hidrolizado por la acetil Co A hidrolaza rindiendo acetato. Esta vía se desarrolla en la matriz mitocondrial y está limitada en las condiciones de anaerobiosis durante la fermentación.

Por otra parte, en condiciones anaeróbicas el ácido acético puede producirse por descarboxilación del piruvato a acetaldehído, reacción catalizada por la piruvato descarboxilasa y posterior oxidación a acetato vía la acetaldehído deshidrogenasa, enzima dependiente del NADP el cual se reduce. Finalmente el acetato puede activarse a Acetil CoA a través de una reacción catalizada por la acetil CoA sintetasa. El acetil CoA se destina a la biosíntesis de ácidos grasos saturados y de ésteres de acetato. Esta vía denominada *by pass* de la piruvato deshidrogenasa es la principal responsable de los elevados niveles de acetato en condiciones anaeróbicas (ver esquema).

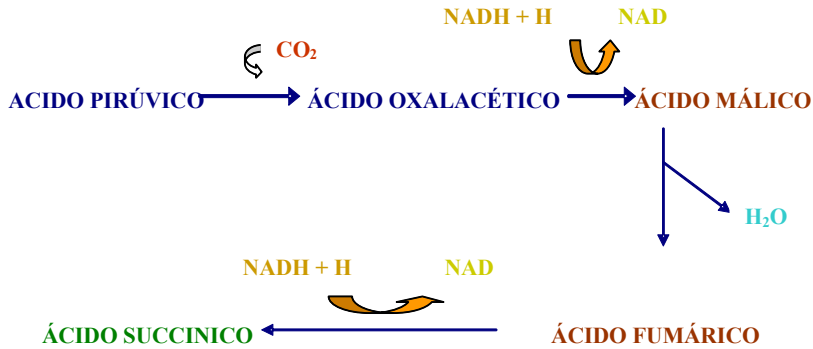


Las sustancias acetoínicas (acetoína, diacetilo y 2,3-butanoldiol) siempre están presentes en los vinos. Algunas especies de levaduras forman acetoína por condensación de dos moléculas de pirúvico seguida de descarboxilación (ver esquema).

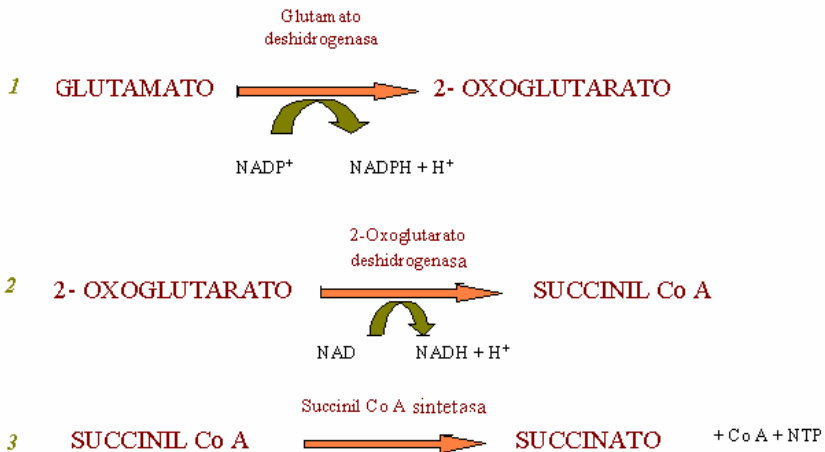


Además la fermentación alcohólica de los azúcares siempre se acompaña de una pequeña fracción de ácido succínico. La formación de

este ácido comienza con la carboxilación de ácido pirúvico, y posteriores reacciones redox.



Es importante destacar que la formación de succinato en levaduras, si bien depende de las cepas, mayoritariamente está correlacionada con la formación de 2- oxoglutarato, cuya formación está fuertemente favorecida por la presencia de glutamato, a través de un camino oxidativo vía succinil-CoA, como puede observarse en el siguiente esquema:



Es generalmente aceptado que un vino de calidad se produce a partir de un buen mosto si se usa la levadura adecuada. Todo vino es obra de las levaduras, pero éstas se encuentran siempre, temporal y espacialmente en situaciones ecológicas determinadas, condicionándose con ello el resultado del producto final (Suarez, 1997).

La fermentación puede ser conducida como un proceso natural o por el uso de un cultivo puro. En el primer caso las levaduras presentes en el jugo de fruta inician y completan la fermentación. En el caso de usar cultivos selectos de *S. cerevisiae*, las cuales se inoculan en número entre 10^6 a 10^7 UFC/mL, éstas son especialmente tolerantes a altas concentraciones de azúcar, etanol y SO_2 . Por otra parte crecen y fermentan rápidamente a los bajos pH de los mostos, Consecuentemente metabolizan los azúcares completamente con producción primaria de etanol y productos del flavor.

A pesar de que existen levaduras comerciales para realizar las fermentaciones, es más efectivo el uso de cultivos puros de levaduras que procedan de la zona vitivinícola donde se van a utilizar lo que se conoce como levaduras locales seleccionadas, (Degré, 1983) ya que se cree que las levaduras que se encuentran en una microzona son:

- Específicas del área.
- Totalmente adaptadas a las condiciones climáticas de la zona.
- Totalmente adaptadas a la materia prima, es decir al mosto a fermentar.
- Responsables, al menos parcialmente, de las características únicas de los vinos obtenidos (Martín, 1993).

El género de levadura más importante en vinificación es el *Saccharomyces*, dentro del cual hay diferencias metabólicas en las distintas especies. Éstas pueden diferenciarse considerando su habilidad para producir ciertas y determinadas sustancias en los vinos, sustancias que de estar presentes producen un efecto beneficioso y cuando no, provocan falta de sabor.

Con la fermentación espontánea es más factible que se produzcan fallos, pero el producto obtenido puede tener características particulares por la producción de algunos metabolitos deseables (Fleet *et al.*, 2002). En cambio el uso de cultivos puros da como resultado una fermentación más limpia, rápida y predecible; y se reducen los riesgos de contaminación (Torija *et al.*, 2003).

Muchos factores afectan la ecología microbiana durante la producción de vino siendo los más significativos la composición química del jugo de uva y el proceso de fermentación. En el complejo ecosistema microbiano se encuentran mezclas de distintas especies y/o cepas, de ahí la posibilidad de que ocurran interacciones individuales entre sí, determinando así la ecología final. Durante la producción de vino las posibles interacciones se dan entre levaduras/levaduras, levaduras/mohos y levaduras/bacterias (Fleet, 2003).

La teoría ecológica describe una serie de asociaciones interactivas entre los microorganismos (Boddy and Wimpenny, 1992). Estas son: neutralismo, comensalismo, mutualismo o sinergismo, amensalismo o antagonismo, predación o parasitismo y competencia. En la elaboración del vino estas interacciones podrían o no mejorar o inhibir el desarrollo de una especie o cepa particular.

Si en el mosto los primeros microorganismos en crecer son levaduras, se produce un empobrecimiento de los nutrientes que dificulta el desarrollo de otros microorganismos. Además se generan metabolitos, que pueden ser tóxicos para otras especies. El efecto inhibitorio del etanol y de algunos ácidos grasos de cadena corta sobre los microorganismos ha sido objeto de muchos estudios (Bisson, 1999; Bauer and Pretorius, 2000; Fleet, 2001).

Durante la fermentación se producen grandes cantidades de biomasa de levadura que al autolizarse, liberan aminoácidos y vitaminas que favorecen el desarrollo de especies tardías (Fleet, 2001). Además la biomasa absorbe sustancias tóxicas del ecosistema como iones metálicos o compuestos fenólicos. Las especies de levaduras proteolíticas y pectinolíticas podrían también contribuir al desarrollo de otras especies por la formación de sustancias provenientes de la hidrólisis de proteínas y pectinas del jugo de uva, que sirven como sustratos (Charoenchai *et al.*, 1997).

La fermentación del jugo de uva presenta un ecosistema complejo que involucra crecimiento interactivo y actividades bioquímicas de una mezcla de especies y cepas de levaduras. Esto tiene origen en 1) flora de la uva, 2) la flora asociada con los equipos y ambiente de bodegas y 3) uso de cultivos iniciadores. Generalmente especies de *Hanseniaspora* (*Kloeckera*), *Candida* y *Metschnikowia* inician la fermentación y provienen de la flora de la uva. Especies como *Pichia*, *Issatchenkia* y *Kluyveromyces* también pueden crecer en esta etapa.

Estas levaduras se desarrollan aproximadamente hasta 10^6 - 10^7 UFC/mL, pero a mediados del proceso fermentativo comienzan a declinar y mueren. Es en este momento que *S. cerevisiae* comienza a predominar (10^7 - 10^8 UFC/mL) y continúa con la fermentación hasta completarla (Esteve *et al.*, 1998).

Durante la fermentación alcohólica, el desarrollo de levaduras se ve afectado por factores tales como: población inicial y diversidad de especies y cepas presentes en el jugo, inoculación con estárter apropiados, composición química del jugo incluyendo la presencia de residuos de fungicidas y pesticidas, condiciones de proceso tales como concentración de SO_2 , temperaturas de fermentación y la interacción entre las levaduras presentes (Fleet and Heard, 1993; Bisson, 1996 y Fleet, 2001).

La producción de etanol por *S. cerevisiae* es considerado el factor que gobierna el desarrollo de *non Saccharomyces* durante la fermentación. Generalmente especies de *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Issatchenkia* que están en el jugo de uva no son tolerantes al etanol en concentraciones de 5 – 7 %, (v/v) por lo cual declinan y mueren cuando progresa la fermentación (Heard and Fleet 1998; Gao and Fleet, 1988).

Sin embargo, las bajas temperaturas aumentan la tolerancia al etanol de estas especies por lo tanto los mostos fermentados a temperaturas entre 15°C–20°C pueden mostrar la contribución de especies tales como *Hanseniaspora* y *Candida* que junto con *S. cerevisiae* completan la fermentación, lo cual impacta en el flavor del vino (Erten 2002; Heard and Fleet 1988). Hay informaciones recientes que demuestran que especies de *Candida* presentan tolerancia al etanol similar a *S. cerevisiae* (Cocolin *et al.*, 2001; Mills *et al.*, 2002). Cepas de *C. stellata* entran en esta categoría y han sido usadas como co-cultivos

junto con *S. cerevisiae* para mejorar el contenido en glicerol y otras características del flavor de los vinos (Ciani and Ferraro, 1998; Soden *et al.*, 2000). *S. pombe*, *Z. bailli* y *Z. fermentati* pueden tolerar hasta concentraciones mayores de 10 % (v/v) de etanol, pero no contribuirían a la fermentación del jugo de uva, principalmente por sus características no competitivas frente al desarrollo de *S. cerevisiae* (Fleet, 2001; Romano and Suzzi, 1993).

Los nutrientes disponibles y los limitantes modulan la ecología de las levaduras durante la fermentación. Hay especies que producen nutrientes necesarios para otras especies. Las *non Saccharomyces* toleran menos la escasez de O₂ que *S. cerevisiae*, por lo tanto en condiciones de fermentación predominan estas últimas. (Hansen *et al.*, 2001). Sin embargo las *non Saccharomyces* que se desarrollan durante la primera fase fermentativa utilizan aminoácidos y vitaminas, lo que limitan el posterior desarrollo de *S. cerevisiae*. Por ejemplo, *K. apiculata* consume tiamina (Bissón, 1999; Mortimer, 2000), pero a su vez es proteolítica y genera aminoácidos que podrían ser usados por *S. cerevisiae*. Por otra parte la autólisis de aquellas puede ser fuente de nutrientes para la última (Charoenchai *et al.*, 1997; Dizzy and Bisson, 1999; Hernawan and Fleet, 1995).

Una alternativa que se está imponiendo en muchos lugares es un proceso intermedio por el cual el jugo puede ser inoculado con un cultivo mixto de: **levaduras autóctonas más una cepa comercial**. Las diferentes especies parecen influir en el metabolismo individual de cada una, resultando en la producción de vinos de características particulares. Las cepas autóctonas están dotadas de propiedades enológicas excepcionales y capaces de producir componentes volátiles que aparentemente contribuyen al bouquet del producto de origen (Martini, 2003; Hansen *et al* 2001).

1.1.2.- Composición química del mosto

El efector químico más importante en enología es la presencia de nutrientes y la ausencia de sustancias inhibitoras provistas por la materia prima o agregada de *ex profeso*. Las paradas de fermentación se deben casi siempre a la falta de los nutrientes necesarios para procurar un desarrollo abundante de levaduras. Las fermentaciones lentas, incompletas o la detención de las mismas es un problema crónico en las bodegas de todo el mundo. Normalmente la fermentación se da por

completa cuando el contenido de azúcar residual alcanza 2 g/L o menos, en 5 a 15 días, dependiendo de la temperatura y de la concentración inicial de azúcar. Sin embargo cuando la fermentación es lenta puede requerir varios meses y puede parar con concentraciones de azúcar mucho más altas que 2 g/L.

Tales fermentaciones son generalmente un indicador de problemas ambientales o fisiológicos y pueden resultar en vinos parcialmente fermentados los cuales son microbiológicamente inestables con producción de H₂S y/o ésteres de ácidos grasos de olores desagradables (Henick and Edinger 1996).

Las deficiencias nutricionales son algunas de las causas de las fermentaciones incompletas o paradas de la fermentación (Agenbach, 1997; Alexandre and Carpentier, 1998; Amerine and Berg, 1980; Dubois and Manginot, 1996). Tales deficiencias pueden interferir por la falta de nutrientes necesarios para la reproducción de las levaduras o para su mantenimiento en la fase estacionaria. Algunos componentes del medio son requeridos en ambas situaciones.

Ciertas causas de fermentaciones anormales son la deficiencia en FN, temperaturas extremas (> 30°C o < 10°C), toxicidad del etanol, presencia de factor killer u otras toxinas, desbalance catiónico, competencia microbiana, residuos de pesticidas y fungicidas y prácticas enológicas incompetentes (Bisson, 1996; Boulton *et al.*, 1996; Casey and Ingleden, 1985; D'Amore and Steward, 1987; Dombeck and Ingram, 1986; Nabais y Sa-Correia, 1988; Ough and Huang, 1991).

Desafortunadamente estos factores pueden interactuar produciendo un efecto sinérgico, lo cual puede resultar más inhibitorio que cada uno de los agentes por separado. Para hacer un diagnóstico de las posibles causas de una mala fermentación hay que considerar el efecto conjunto de cada uno de los factores inhibitorios.

Dentro de los nutrientes, primordialmente influye la FCE. El contenido de enzimas y componentes nutricionales de las frutas juegan un papel importante en la formación de productos secundarios, los que dependen del pool enzimático y de los cultivos de levaduras, así como también de la FN y factores de crecimiento (Ubeda y Briones, 2000). Es necesario una concentración suficiente de esteroides en las células no

proliferantes, sobre todo cuando los aminoácidos son escasos (Ough, 1996).

Cuando hay limitación de PO_4^{-3} se afecta el crecimiento celular y el rendimiento en biomasa, por ende influye sobre la velocidad de fermentación. Los compuestos de PO_4^{-3} (ATP y ADP) juegan un rol fundamental en la energética celular: La relación ATP/ADP afecta las rutas metabólicas. Por ejemplo, si la concentración de ATP es alta y la de ADP baja, la captación de glucosa por la célula puede ser considerablemente reducida (Gancedo and Serrano, 1989). Otros compuestos celulares que incorporan considerables cantidades de PO_4^{-3} son los ácidos nucleicos, fundamentales en la fisiología celular.

La deficiencia de varios iones puede resultar en una reducción en la velocidad de fermentación. El Zn^{+2} y el Mg^{+2} afectan directamente el uso de glúcidos (Dombeck and Ingram, 1986). La insuficiencia de Ca^{+2} incrementa la sensibilidad de las células de levaduras al etanol (Nabais *et al.*, 1988). Altas concentraciones de Mg^{+2} bajan la captación de Mn^{+2} . También lo opuesto es encontrado, por ejemplo altas concentraciones de Mn^{+2} bajan la captación de Mg^{+2} (Blackwell and Tobin, 1997).

Es un hecho comprobado que las levaduras no incorporan igualitariamente a los aminoácidos. Algunas los utilizan al comienzo del proceso, otras más tarde y algunas a lo largo de todo el proceso. El NH_4^+ es siempre consumido preferentemente a los aminoácidos. De ahí la importancia de la elección como nutriente de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Si sólo se agrega esta fuente de nitrógeno (FN) al comienzo, la velocidad de fermentación puede ser excesiva y originarse un desbalance en la captación y uso de aminoácidos. Por ello se usa preferentemente la adición en etapas. Por ejemplo, a los 16 °Brix y luego a los 10 °Brix (Manginot *et al.*, 1998).

Mientras que la adición de sales de NH_4^+ puede no tener un efecto beneficioso significativo durante la fase estacionaria (Lafon and Ribereau, 1984), la adición de aminoácidos específicos podría tener un efecto estimulante y extender la actividad fermentativa (Manginot and Sablayrolles, 1997).

La adición de una FN externa, cuando se ha completado la mitad del proceso fermentativo puede no ser usada por las levaduras debido al efecto del alcohol que impide su captación. Por esta razón la adición de

nutrientes cuando la fermentación se ha parado, es raramente efectiva. Cuando aumenta la concentración de etanol, aumenta la permeabilidad de la membrana citoplasmática a los H^+ . Luego para expulsar los mismos al exterior de la célula a fin de balancear el pH interno y externo es necesaria la presencia de ATP-asa. Debido a la naturaleza competitiva de los sistemas de transporte, el N es introducido a la célula en las fases tempranas de fermentación y es almacenado en vacuolas para ser usado cuando hay demanda. Por lo que el N adicionado en las últimas etapas de fermentación no ingresa a la célula (Bisson, 1996).

Las levaduras del género *Saccharomyces* son capaces de sintetizar todas las vitaminas esenciales excepto biotina. Sin embargo se ha demostrado que la presencia de otras vitaminas estimulan el crecimiento y la fermentación (Monk, 1982). En la Segunda Parte, Capítulo 1 del presente trabajo se comprobó que *Saccharomyces cerevisiae* aislada de jugo de naranja requiere cuatro vitaminas para crecer adecuadamente en condiciones aeróbicas (biotina, tiamina, pantotenato de Calcio y piridoxina).

Ciertas especies de *Kloeckera* (*Hanseniospora*) son bastante eficientes en la utilización de la tiamina en mosto (Bataillon *et al.*, 1996). Por eso cuando éstas están presentes en gran número pueden producir una parada en la fermentación por dejar el mosto deficiente en esta vitamina antes de la inoculación con *S. cerevisiae*. La presencia de ácido acético puede reducir la capacidad de *Saccharomyces sp.* para el transporte de tiamina (Drysdale and Fleet, 1989). Se ha sugerido que las levaduras silvestres utilizan rápidamente la tiamina en los jugos no inoculados, produciendo ácidos, mayoritariamente ácido acético, el cual inhibe el crecimiento de *S. cerevisiae*.

La sensibilidad a la toxicidad del etanol varía de una cepa a otra del género *Saccharomyces*. El etanol afecta el flujo de H^+ (Cartwright and Juroszek, 1986; Kudo and Vagnoli, 1992). En estas condiciones para la célula le es extremadamente difícil mantener constante el pH interno. En casos en el que el etanol es adicionado directamente a los cultivos de levaduras éstas morirán debido al cambio en el pH del citoplasma. Sin embargo, también afecta la translocación de Ca^{+2} y Mg^{+2} , lo cual contribuye a su toxicidad (Nabais *et al.*, 1988).

La tolerancia al alcohol puede elevarse supliendo el medio de crecimiento con ácidos grasos insaturados, vitaminas y proteínas.

Edwards *et al.* (2003) estudiaron el impacto que ejercen la biotina y el ácido pantoténico, junto con el contenido de nitrógeno asimilable, en fermentaciones inducidas por *Saccharomyces*, encontrando que aumenta la velocidad de fermentación y la tolerancia de las levaduras hacia el etanol.

Es de hacer notar que para la vinificación en blanco, es práctica común clarificar el mosto para eliminar los sólidos en suspensión que pueden conferir malos sabores al vino (Lee, 1996). Pero la excesiva clarificación del mosto puede causar fermentaciones lentas o incluso puede fallar la misma (Reed and Peppler, 1973). Esto puede ser debido a diversos factores, de los cuales el más importante es la pérdida de los nutrientes presentes en la piel de la uva.

1.1.3.- Condiciones operativas del proceso fermentativo

Los factores físicos que se deben considerar en la vinificación son esencialmente el pH y la temperatura de fermentación. Los mostos de uva tienen un pH comprendido entre 3,0 y 3,6 y a estos valores sólo los microorganismos acidotolerantes como las levaduras vínicas son capaces de metabolizar anaeróbicamente la FCE.

La temperatura acelera el crecimiento de las levaduras y la velocidad de fermentación. Basándose en la viabilidad de las cepas dominantes (*Saccharomyces*) a relativamente bajas temperaturas y la volatilidad de compuestos aromáticos a temperaturas más altas, se ha postulado una “temperatura media” de vinificación en blanco de 15°C (Charoenchai *et al.*, 1998).

La temperatura tiene un efecto muy importante en el proceso de fermentación ya que condiciona el metabolismo de las levaduras afectando principalmente la producción de compuestos volátiles. Las bajas temperaturas favorecen la obtención de vinos con carácter frutado (Mallouchos *et al.*, 2003).

Los mostos blancos se inoculan y fermentan generalmente entre 10°C y 15°C. La menor temperatura de fermentación da lugar a vinos más frescos y el riesgo de infección bacteriana y la producción de ácidos volátiles es reducida (Ward, 1991). Un aspecto interesante del uso de bajas temperaturas en la vinificación es el hecho de que se reduce el crecimiento de bacterias del ácido láctico y del ácido acético y por lo tanto se hace más fácil el control de la fermentación alcohólica. Sin

embargo, la temperatura óptima de crecimiento de *S. cerevisiae* es de 25°C, mientras temperaturas tan bajas como 13°C son restrictivas e incrementan los riesgos de parada de las fermentaciones (Meurguest, 1996).

Los tintos se fermentan entre 20°C y 30°C. La ecuación de Arrhenius a la que se ajusta la fermentación es una relación lineal entre la velocidad de fermentación y temperatura en el amplio intervalo de temperaturas comprendidas entre 10°C y 32°C.

El rango de temperaturas recomendado para el desarrollo de las levaduras es aquel que no afecta la integridad y funcionalidad de la membrana citoplasmática (MC). Cuando las levaduras crecen a temperaturas por encima del límite superior, provocan la inactivación / desnaturalización de las proteínas de transporte y otros enzimas asociados a la MC, mientras que cuando las temperaturas son muy bajas se ve comprometida su fluidez / flexibilidad. Por otra parte, la función de la MC se ve afectada por la presencia de altas concentraciones de etanol. Si estos factores (temperatura y concentración de etanol) actúan en forma sinérgica el rango de temperatura tolerado por *Saccharomyces sp.* se ve reducido, pudiendo ocasionar la interrupción de la fermentación. Temperaturas de fermentación por debajo de 10°C hacen necesaria la adición no sólo de nutrientes sino una mayor concentración de inóculo (Stanier *et al.*, 1976).

El SO₂ influye positivamente en la fermentación alcohólica, puesto que se une al acetaldehído impidiendo que éste participe en reacciones de pardeamiento. Además inhibe algunas de las reacciones indeseables de oxidación, así como algunos microorganismos tales como las bacterias del ácido láctico y acético y algunas levaduras que, de estar presentes, podrían provocar características anormales en los vinos. Asimismo actúa como estimulante de la actividad de las levaduras vínicas y tiene como consecuencia la aceleración de la velocidad de fermentación (Aleixandre, 1999).

Las fermentaciones: alcohólica y gliceropirúvica, demuestran una competencia entre dos aceptores de hidrógeno, el acetaldehído por una parte, y la fosfohidroxiacetona por otra. Así pues, cuando hay SO₂ en el mosto, se combina con el acetaldehído a medida que éste se va formando, y en consecuencia, la fermentación de los azúcares sigue el camino de la fermentación gliceropirúvica, con formación de glicerina. Por lo tanto,

cuando se emplean mayores dosis de SO₂, mayor es el contenido de glicerina.

El éxito de su utilización depende de la dosis y de las condiciones de empleo. Para vinificación en blanco y vendimias sanas se recomiendan generalmente 10 a 20 g/HL, teniendo en cuenta el pH del medio, ya que la acción del SO₂ como antiséptico se debe a la molécula H₂SO₃, sin disociar (Ubeda *et al.*, 2000) y otros aconsejan entre 60 y 80 ppm para obtener vinos con buenas características aromáticas.

Durante la fermentación vínica diversos factores tales como: concentración de glucosa y SO₂, temperatura de fermentación, contenido en tiamina y biotina y aún el contenido en etanol pueden influir en la fermentación maloláctica (MLF) ralentizándola o incluso deteniéndola (Tortia *et al.*, 1993).

Junto con la disminución de acidez, la MLF produce cambios aromáticos deseables o no, dependiendo del tipo de vino que se elabore (Davis *et al.*, 1985; Henick and Park., 1996).

Basado en la habilidad o inhabilidad de las levaduras para metabolizar los compuestos intermediarios del ciclo de ácidos tricarbónicos (TCA), usándolos como FCE, las levaduras se dividen en K (+) o K (-) (Goto *et al.*, 1978; Barnet, 1990; Rodríguez and Thorton., 1990).

El grupo de las K (-) comprende aquellas levaduras capaces de utilizar los intermediarios del ciclo TCA sólo en presencia de glucosa u otra FC asimilable. De acuerdo a esta definición, los cultivos de *Saccharomyces* (incluyendo todas las especies vnicas), *Schizosaccharomyces pombe* y *Zigosaccharomyces bailli* son clasificadas como K (-). Pero aún dentro de este grupo, las distintas cepas tienen diferencias respecto a su habilidad para degradar el ácido málico. Así, la mayoría de las especies de *Saccharomyces* son generalmente menos eficientes para metabolizar el ácido málico extracelular, mientras que *S. pombe* y *Z. bailli* son capaces de degradar altas concentraciones de este ácido (Baranowski and Radler, 1984; Taillandier and Strehaiano, 1991). Existen diferencias marcadas entre las distintas especies de *Saccharomyces* respecto a su habilidad para descomponer el ácido málico durante la fermentación alcohólica (0–3 g/L de ácido málico) (Subden *et al.*, 1998).

El metabolismo del ácido málico por parte del género *Saccharomyces* depende de la temperatura óptima de crecimiento de las distintas especies. Por ejemplo, las criotolerantes tales como *S. bayanus* y *S. pasteurianus* pueden sintetizar ácido málico, mientras que las termotolerantes como *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* pueden degradar cantidades significativas de ácido málico (aproximadamente 48 %) (Rainieri *et al.*, 1998 ab).

La habilidad de los cultivos de levaduras para degradar el ácido málico extracelular depende de la eficiencia en el transporte de los ácidos dicarboxílicos y de la eficacia de las enzimas málicas intracelulares (Ansanay *et al.*, 1996). Estudios previos han demostrado que *S. cerevisiae* puede ingresar ácido málico y otros ácidos dicarboxílicos por difusión simple, pero es incapaz de degradar efectivamente el ácido málico extracelularmente (Salmon, 1987). Las enzimas málicas de *S. cerevisiae* tiene muy baja afinidad por el sustrato ($K_m = 50$ mM), lo cual la hace ineficiente para degradar dicho ácido (Temperli *et al.*, 1965, Osothsilp, 1987). Un aspecto adicional, es el hecho de que bajo condiciones anaeróbicas *S. cerevisiae* ve afectada su habilidad para degradar ácido málico, pues la enzima se localiza en las mitocondrias, las cuales en condiciones de vinificación son muy escasas o disfuncionales.

Por otra parte, *S. pombe* puede degradar efectivamente el ácido málico en presencia de una FC asimilable. El ácido málico ingresa mediante transporte activo y la enzima málica de esta levadura posee una gran afinidad por el sustrato ($K_m = 3,2$ mM).

En general las enzimas málicas catalizan la descarboxilación oxidativa de L-malato y/o oxalacetato a piruvato y CO_2 en presencia de cofactores NADP^+ y Mn^{2+} o Mg^{2+} (Viljoen *et al.*, 1998). Las enzimas del ácido málico exhiben un alto grado de homología, pero su función y regulación metabólica varía entre distintas especies y tipos de tejido.

Las enzimas del ácido málico en *S. cerevisiae* dependen del NADP-mitocondrial. En contraste en *S. pombe* la enzima málica depende de NAD^+ que juega un rol fundamental en la provisión de NAD-citosólico bajo condiciones fermentativas (Groenewald and Viljoen, 2001). La alta afinidad por el sustrato y la localización de la enzima en *S. pombe* hace a esta especie incapaz de degradar ácido málico a etanol durante la fermentación alcohólica. Sin embargo, se han reportado

producción de aromas indeseables durante la vinificación. En conclusión, *S. pombe* no es una especie vínica aceptable.

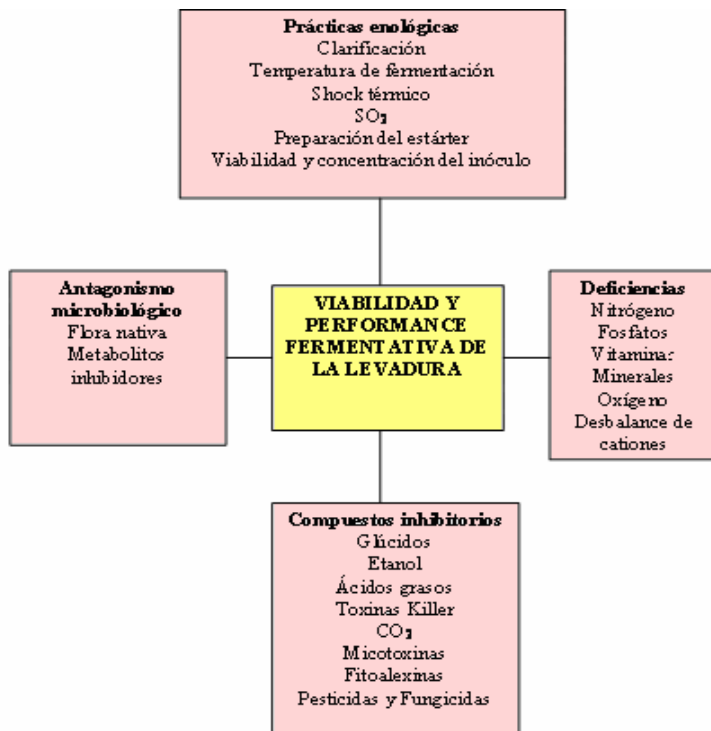
Si bien el SO_2 por sus propiedades es eficaz en la vinificación, existe una cierta preocupación acerca de su seguridad en lo que respecta a la salud del consumidor. Se ha propuesto la aplicación de la pasteurización del mosto en sustitución del tratamiento con SO_2 , aunque hasta ahora no se conocen trabajos en este sentido (Varnam y Sutherland, 1997). Por otra parte se debe tener presente que durante la fermentación, se producen compuestos del azufre, tales como SO_2 y SH_2 .

Se acepta que para obtener un vino de buena calidad es necesario partir de un buen mosto, emplear las levaduras adecuadas y mantener las condiciones enotécnicas favorables para el tipo de vino que se desea obtener.

Teniendo en cuenta lo antedicho, se procedió a elaborar vino de naranja utilizando para la preparación de los mostos: jugo de naranja recién exprimido, jugo de naranja pasteurizado y jugo de naranja concentrado reconstituido. En cuanto al pH fueron ensayados: $\text{pH} \cong 3,5$ (natural del jugo) y $\text{pH}: 4,0$ (ajustado con CaCO_3), mientras que las temperaturas elegidas para la fermentación fueron 10°C (las levaduras usadas demostraron su carácter criotolerante) y 20°C , a los fines de comprobar si estas diferencias en las condiciones enotécnicas marcan alguna diferencia en los parámetros fisicoquímicos del vino, lo cual llevaría a contribuir al desarrollo de características organolépticas definidas.

El vino de naranja podría considerarse similar a un vino blanco, por lo cual se siguieron las pautas de elaboración de un vino de este tipo.

En el siguiente esquema se resumen las condiciones necesarias para llevar con éxito todas las etapas de la vinificación.



1.2. MATERIALES Y METODOS

1.2.1.- Microorganismos usados para la vinificación de mostos de naranja.

Para llevar a cabo la fermentación se ensayaron dos levaduras:

- *Saccharomyces bayanus*, Killer (IOC 18-2007) proveniente del Instituto Enológico de Champagne, de Paris-Grignon. Esta levadura se utilizó como cultivo de referencia y sus características analíticas y enológicas reportadas por el fabricante son:
 - Levaduras viables $> 2 \times 10^{10}/g$.
 - Carácter Killer: factor killer de fenotipo K2 actividad valorada.
 - Fermentación total de azúcares.
 - Poder alcoholígeno: 16 g de azúcar por 1% V de alcohol.
 - Producción de acidez volátil: 0,10 g/L (H₂SO₄) máxima.
 - Producción de glicerol ≥ 6 g/L.
 - Producción de SO₂: nulo.
 - Formación de espuma: débil.
 - Pureza microbiológica: $> 99,995$ %.
 - Buena actividad fermentativa a baja temperatura y a pH de medio a bajo.

- *Saccharomyces cerevisiae*, levadura autóctona aislada y seleccionada a partir de jugo fermentado de naranjas. Para la elección de la levadura vínica se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:
 - a) Rápida capacidad fermentativa (producción de alcohol).
 - b) Resistencia a los aceites esenciales (antimicrobianos) presentes en el jugo.
 - c) Resistencia al SO₂.

- d) Amplio rango de temperatura de fermentación.
- e) Tolerancia a la acidez del jugo.
- f) Baja producción de acidez.
- g) Buena producción de aroma.
- h) Características del depósito formado.
- i) Formación de espuma.

1.2.2.- Obtención del mosto de jugo natural de naranja.

La variedad de naranja seleccionada para la vinificación fue la W. Navel con un índice de madurez (°Brix/% acidez) de 12.

Se procesaron en planta piloto aproximadamente 600 kg de fruta (lavada pero no encerada) procedente de un empaque de la zona. Luego de la recepción, la fruta se volvió a lavar en mesa lavadora con circulación de agua a los efectos de disminuir la población microbiana de la superficie, que se estima en un número de 10^4 UFC/cm². Estos microorganismos pueden pasar al jugo en la etapa de extracción. Pao (2000) ha encontrado que del total de los gérmenes aeróbicos presentes en la cáscara de la fruta, entre 1,7 y 2,6 %, pasan al jugo recién exprimido y entre 2,3 a 2,6 % de los organismos acidófilos se introducen durante la extracción.

Se procedió a la extracción del jugo en extractora FMC, modelo FS BR 1. Se filtró con malla metálica (tamiz ASTM # 18), se recolectó en un tanque pulmón y se ajustó a 20 °Brix con sacarosa (azúcar comercial) a los efectos de incrementar la posibilidad de obtener un vino con mayor graduación alcohólica.

Es de hacer notar que si bien el vino de naranja podría considerarse "similar" a un vino blanco, para el cual está permitido el uso de enzimas pectinolíticas o una combinación de enzimas pectinolíticas y tierras de diatomea con el objeto de clarificar el mosto (Resolución INV N° 432/65 y Resolución INV N° 813/63), para la preparación del mosto de jugo de naranja no se procedió a la clarificación del jugo, con el fin de facilitar la fermentación por parte de los microorganismos encargados de la misma, atendiendo al hecho de que al separar la pulpa también se

arrastran nutrientes esenciales para las levaduras. Un sistema biológico con condiciones adversas tales como bajas temperaturas y empobrecimiento de nutrientes debido a la clarificación del mosto inhiben las levaduras (Varela *et al.*, 2001).

La presencia de los sólidos insolubles no sólo es importante como sustrato nutritivo sino que también actúa como reservorio de O_2 durante las fases tempranas de fermentación y como soporte sólido para las levaduras nativas e inoculadas antes de que comience la producción de importantes cantidades de CO_2 .

Es un hecho conocido que una reducción de aproximadamente 5 % de los sólidos puede resultar en una deficiencia nutricional y prematura sedimentación de las levaduras. La adición de bentonita puede ayudar a mantener las levaduras en suspensión al inicio de la fermentación favoreciendo la estabilidad de las proteínas pero este compuesto puede reducir el N disponible por lo que se requiere la suplementación de una FN (Manginot *et al.*, 1998).

La clarificación reduce la concentración de cationes especialmente Fe^{2+} y Cu^{2+} , cuya presencia en el vino está relacionada con los sólidos suspendidos en el mosto. Por otra parte las concentraciones de Mg^{2+} y Na^+ no experimentan grandes variaciones; en cambio se han reportado disminuciones de hasta 11 % en la concentración de K^+ y 25 % en la de Ca^{2+} debido a una simple sedimentación estática (Rodríguez-Moza, 1999).

Siguiendo con el proceso se añadieron 150 ppm de $KHSO_3$ (Resolución INV N° 281/85) a los efectos de mantener la dosis de SO_2 libre en valores entre 30 y 40 ppm, necesarios para una buena conservación de los vinos blancos (Menegazzo, 1978). Esta dosis se recomienda para un pH aproximado a 3,5.

El SO_2 forma combinaciones de adición con diferentes constituyentes del mosto, de modo que se encuentra bajo dos estados de equilibrio: la forma libre y la forma combinada (Lafon y Peynaud, 1974).

La forma en que el SO_2 ejerce el mayor poder antiséptico es como ácido sulfuroso sin disociar (H_2SO_3), mientras que disociado como ión bisulfito (SO_3H^-) o sulfito ($SO_3^{=}$) no tiene prácticamente acción. El equilibrio: $(SO_3H_2 / (SO_3H^-))$ depende del pH (Aleixandre, 1999).

Los autores disienten en la concentración favorable de SO₂ para llevar a cabo una buena fermentación. Ubeda *et al.* (2000) aconsejan entre 60 y 80 ppm para obtener buenas características de aroma. Nigam (1999) aconseja 150 ppm para uvas botritizadas.

El mosto así preparado se dividió en dos partes: la mitad se ajustó a pH 4 con CaCO₃. Se usó este compuesto a fin de facilitar la sedimentación de la borra una vez finalizada la fermentación (Resolución INV N° 281/85) y la otra mitad se mantuvo al pH del jugo natural (≈ 3,5).

El mosto estandarizado fue distribuido en 8 damajuanas de vidrio color verde, de 30 L de capacidad (4 damajuanas con mosto a pH 4,0 y 4 damajuanas con mosto a pH 3,5).

1.2.3.- Obtención del mosto de jugo de naranja pasteurizado.

Para obtener el mosto de jugo pasteurizado se procedió al tratamiento térmico del jugo natural recién exprimido, lo cual se realizó en un intercambiador de calor en planta piloto, a 90°C durante 3,5 min. Posteriormente se añadió 100 ppm de KHSO₃. Se eligió esta dosis por considerar que el tratamiento térmico minimiza los riesgos de alteración microbiana, y por lo tanto la única función que debería cumplir el SO₂ sería la de antioxidante.

El mosto de jugo de naranja pasteurizado una vez hechos los ajustes correspondientes, según el protocolo seguido para el mosto de jugo natural, se distribuyó también en 8 damajuanas de vidrio color verde, de 30 L de capacidad (4 damajuanas con mosto a pH 4,0 y 4 damajuanas con mosto a pH 3,5).

1.2.4.- Obtención del mosto de jugo de naranja concentrado reconstituido.

El mosto de jugo concentrado (reconstituido) se elaboró a partir de un concentrado comercial de 65 °Brix el cual fue diluido hasta 11 °Brix y luego ajustado a 20 °Brix con sacarosa comercial. Este procedimiento permite mantener la acidez dentro de los valores propios

de los mostos de jugo natural. La dosis de SO₂ libre se ajustó para mantener valores entre 30 y 40 ppm.

El mosto de jugo de naranja concentrado reconstituido, preparado como se describió previamente para los otros dos mostos (de jugo natural y de jugo pasteurizado), se distribuyó en 8 damajuanas de vidrio color verde, de 30 L de capacidad (4 damajuanas con mosto a pH 4,0 y 4 damajuanas con mosto a pH 3,5).

1.2.5.- Elaboración del vino de naranja.

Para elaborar el vino se utilizó el método de precultivo o "pie de cuba" a los fines de unificar el número de células de ambas levaduras, atendiendo a que la comercial está en forma de levadura seca activa (LSD) y la autóctona como crema de levadura.

En las Figuras 1.2.1 y 1.2.2 se muestran los diagramas de flujo de las distintas operaciones efectuadas para la vinificación de mostos de jugo natural, pasteurizado y concentrado reconstituido.

Se prepararon los precultivos de ambas levaduras de acuerdo al siguiente procedimiento: se distribuyeron 4 L de cada jugo con un contenido de hasta 70 g/L de azúcares reductores directos, adicionado de 10 g/L de (NH₄)₂HPO₄, a razón de 500 mL en 8 erlenmeyers de 1 L. Se trataron a vapor fluente durante 30 min. Se enfriaron hasta temperatura ambiente y se inocularon en condiciones asépticas, 4 erlenmeyers con 100 mg cada uno de *S. bayanus* levadura seca activa (LSD) y 4 erlenmeyers con 200 mg de *S. cerevisiae* (biomasa con 48 % de humedad). Se incubaron a 25°C ± 2 durante 24 h.

Atendiendo a que el rango de temperatura que favorece el desarrollo de las levaduras vínicas está comprendido entre 25°C y 35°C se eligió la temperatura mínima para que el ΔT entre el inóculo y el mosto a inocular no sea demasiado grande a fin de evitar una disminución en la densidad de células viables. Se han reportado valores de hasta 50 % de muerte celular cuando la diferencia de temperatura entre el cultivo y el mosto inoculado alcanza 25°C (Monk, 1986).

Finalizadas las 24 h de incubación, se realizó un análisis microbiológico siguiendo la técnica de coloración vital con azul de

metileno (O.I.V.), y recuento microscópico en cámara de Neubauer para determinar densidad de población y vitalidad de la misma.

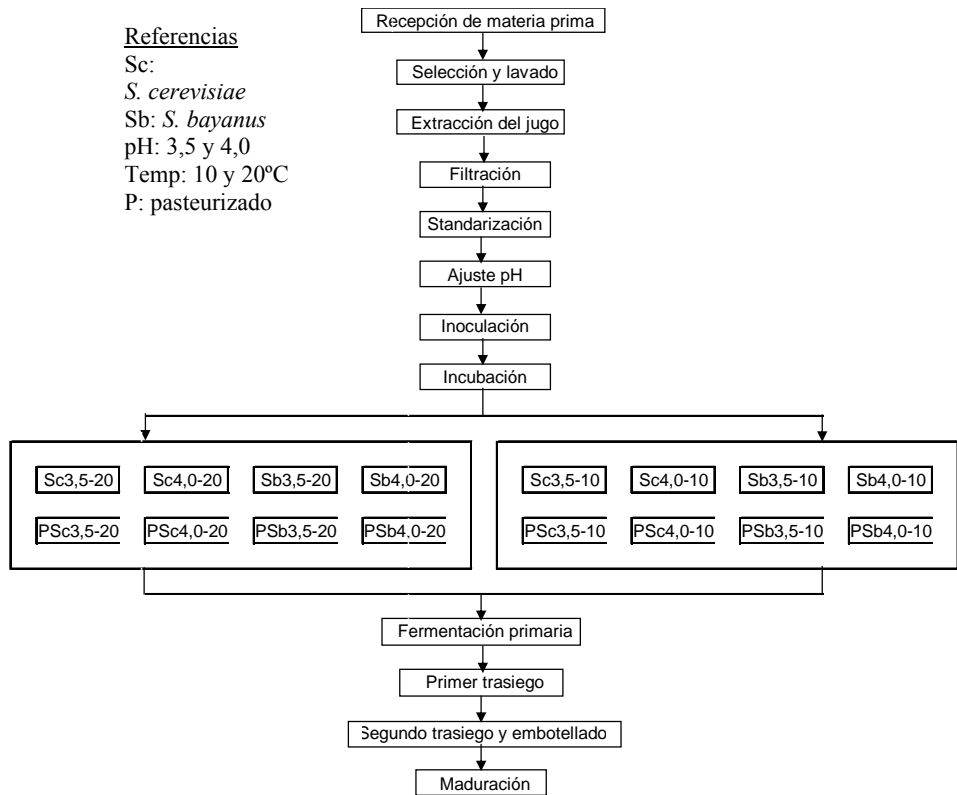


Figura 1.2.1.- Diagrama de flujo: Obtención de "Vino de naranja" a partir de jugo de naranja natural y pasteurizado.

En el caso de *S. bayanus* para su rehidratación, se siguió estrictamente el protocolo del fabricante a los efectos de asegurar su máxima viabilidad. Esto es suspensión de la cantidad necesaria de levadura para el volumen de mosto a fermentar, en agua a temperatura entre 35°C y 40°C. Sin embargo, varios estudios han demostrado que la actividad metabólica de las levaduras en el posterior proceso de

vinificación, varía con el procedimiento de rehidratación (Degré, 1999), por ello es muy importante la pre-adaptación al medio de vinificación.

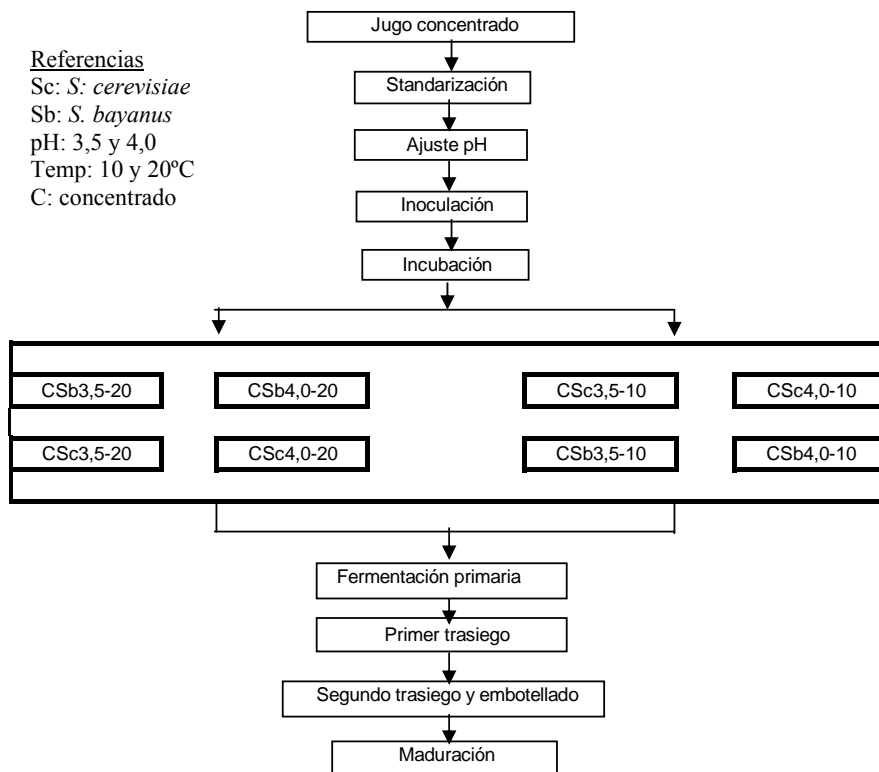


Figura 1.2.2.- Diagrama de flujo: Obtención de "Vino de naranja" a partir de jugo de naranja concentrado reconstituido.

En el presente trabajo (Capítulo II, Parte 1), se desarrollaron técnicas de adaptación de las dos *Saccharomyces* a medios de cultivo formulados a partir de jugo de naranja natural, pasteurizado y concentrado reconstituido.

1.2.5.1.- Fermentación primaria de los mostos.

Las damajuanas de 30 L fueron inoculadas con los precultivos de *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, respectivamente, a razón de 2 L por cada 100 L de mosto a fermentar.

Con este volumen de cultivo se aseguró un número de células viables de levaduras entre 1×10^6 y 1×10^7 células/mL. Es esencial comenzar la fermentación con un número alto de levaduras, ya que el éxito de la siembra con una levadura seleccionada depende de la dosis elegida (Lopez *et al.*, 2001). Esta población aseguraría un avasallamiento del inóculo sobre las levaduras nativas del jugo, con lo cual la fermentación puede comenzar rápidamente (Monk, 1986).

Las damajuanas se cubrieron durante las primeras 24 h con una gasa fina, a fin de permitir un crecimiento aeróbico de las levaduras, lo que acontece hasta el agotamiento del O₂ disuelto en el mosto. El O₂ es requerido por las levaduras, entre otras cosas, para la síntesis de los precursores de los componentes de la membrana celular, incluyendo esteroides como el ergosterol y lípidos, principalmente los derivados de ácidos oleanoleicos de la membrana citoplasmática. Las levaduras que se propagan aeróbicamente contienen una alta proporción de ácidos grasos insaturados y un nivel de esteroides casi tres veces superior a las que crecen anaeróbicamente.

Sin O₂ inicial la replicación está usualmente restringida a 4 o 5 generaciones y en cada ciclo de brotación se reduce el contenido de esteroides aproximadamente a la mitad. Cuando el nivel de O₂ llega a un punto crítico, se detiene la replicación, pero la fermentación continúa con la población presente (Brecht *et al.*, 1971).

Una simple aireación de los cultivos iniciadores de levaduras juega un papel importante en el comportamiento durante la fermentación. Wahlstrom and Fugelsang (1988) reportaron un incremento de densidad óptica y mayor velocidad de fermentación cuando los estáter eran aireados, comparados con los estáter sin airear.

Luego se sellaron con cierre hidráulico y se incubaron a 10°C y 20°C, respectivamente. Ubeda and Briones (2000) y Fish and Block (2003) recomiendan para vinos blancos entre 16°C y 18°C.

Las llamadas levaduras de fermentación en frío ejercen una actividad fermentativa aún a temperaturas de 6°C (Vogt, 1971). Argiriou

et al. (1996) trabajaron con varias cepas de *S. cerevisiae* para adaptarlas a bajas temperaturas con el fin de usarlas en vinificación en frío. En el caso del vino de naranja tanto *S. cerevisiae* como *S. bayanus* han demostrado poseer características criotolerantes, por lo cual además de a 20°C se realizó la vinificación a 10°C.

El parámetro utilizado para evaluar la velocidad de la fermentación fue el desprendimiento de CO₂. Se utilizó un equipo del tipo de Orsat, registrándose el volumen de CO₂ liberado por minuto.

1.2.5.2.- Primer Trasiego.

A los 10 días de iniciado el proceso de fermentación, cuando ya no se observó desprendimiento de CO₂, se efectuó el primer trasiego para separar la borra del sobrenadante. En este momento se tomaron muestras para los ensayos fisicoquímicos y microbiológicos.

El trasiego se realizó por caída natural del vino a damajuanas limpias y previamente enjuagadas con una solución de KHSO₃ al 1%. Estos recipientes se sellaron con cierre hidráulico y se continuó con la incubación a 10°C y a 20°C, respectivamente.

Las muestras se tomaron en condiciones asépticas, impidiendo la entrada de aire por aumento de la presión en el interior de las damajuanas para homogeneizar el contenido y lograr la representatividad de las mismas.

Los ensayos realizados fueron los que se detallan a continuación. Los mismos fueron ejecutados por triplicado.

- Sólidos solubles: expresados como °Brix.
- pH: Potenciométricamente.
- Azúcares reductores directos y totales. Método de Lane y Eynon.
- Sacarosa, glucosa, fructosa (Enzymatische BioAnalytik, Roche).
- Acidez titulable: Expresada como % de ácido cítrico anhidro.
- Ácido ascórbico: Expresado en mg/100 mL jugo (AOAC

982.13, 1989)

- Nitrógeno amínico: Expresado en mg/100 mL jugo (Ting and Rouseff, 1986).
- Carotenoides totales: método colorimétrico (Casas *et al.*, 1976).
- Aceites esenciales: método de Scott-Veldhuis (AOAC 22088, pág. 424, 1984).
- Flavonoides: método de Davis (Ting and Rouseff, 1986).
- Análisis microbiológicos:
 - Recuento directo de levaduras y diferenciación de otros microorganismos por observación microscópica en fresco.
 - Prueba de viabilidad de células de levaduras con azul de metileno.
 - Observación microscópica de preparados teñidos por Gram.
 - Cultivo en medio sólido en placa con medio Man Rogosa y Sharpe (MRS) a 25°C de 4 a 10 días en microaerofilia (O.I.V.), para detectar presencia de bacterias del ácido láctico.
 - Caracterización de bacterias del ácido láctico (Holt *et al.* (1994) pág. 529, 541;).

1.2.5.3.- Segundo Trasiego y envasado.

Luego del primer trasiego, a los 45 días del inicio de la fermentación, se realizó un segundo trasiego, fraccionándose inmediatamente los productos de los 16 ensayos (Fig.1.2.1.), en botellas de vidrio color verde de 750 mL, que se cubrieron con tapones de corcho semi-microparticulado aglomerado. El producto así obtenido se llamó "vino joven" y se procedió a su acondicionamiento para la maduración. Es de hacer notar que algunos de los productos no estaban totalmente clarificados al momento del embotellado y que no se usó ningún método adicional de clarificación sino sólo una decantación natural.

En esta etapa se realizó un nuevo muestreo para realizar los ensayos anteriormente citados (por triplicado) incorporando además, los siguientes:

- Graduación alcohólica (Enzymatische BioAnalytik, Roche).

- Ácidos orgánicos: Se dosaron Ácidos orgánicos (Cítrico, Málico y Quínico) por HPLC con fase reversa y detector UV, en las siguientes condiciones de trabajo: Fase móvil: KH_2PO_4 2 %, pH 2,4. Velocidad de flujo: 0,5 mL/min. Temperatura: 25°C. Volumen de inyección: 20 μL . Longitud de onda (λ) = 214 nm. Columna Hipersil C18-0,5 μm (25 cm \times 4,5 cm). Guarda columna: C18.

Las muestras de vinos fueron diluidas pesando 1,5 g y llevando a 30 g con H_2O calidad HPLC. Se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min y el sobrenadante se filtró a través de filtro de acetato de celulosa de 0,45 μm .

- Cultivo en medio sólido en placas con agar nutritivo a 25°C durante 2 a 4 días en aerobiosis. Pruebas para detectar presencia de *Acetobacter*.

- Análisis de bacterias del ácido láctico: se sembró en MRS Merk con cicloheximida (solución alcohólica 1%) agregada al agar en una concentración final de 50 mg/L. 1 mL de la muestra se inoculó en placas adicionando luego el agar fundido atemperado. Se incubó en condiciones anaeróbicas a 42°C por 2-3 días.

- Análisis de bacterias del ácido acético: En agar Carr y Pasmore- cicloheximida: 20 mL de etanol, 1 mL de solución al 2,2 % de verde de bromocresol y 5 mL de solución al 1 % de cicloheximida en etanol esterilizado por filtración y adicionado asepticamente en volumen suficiente al agar fundido (10 g de extracto de levadura y 15 g de agar bacteriológico (Disco); pH 4,5. Las placas se inocularon con 0,1 mL de muestra e incubaron a 30°C por 2-3 días.

Se hicieron los análisis por duplicado, expresándose los resultados en UFC/mL.

- Análisis de levaduras: en YGC (Ubeda y Briones, 2000).

1.3.- RESULTADOS Y DISCUSION

1.3.1.- Caracterización de las levaduras usadas como inóculo.

Como ya se mencionó, las levaduras usadas fueron:

- *S. cerevisiae* (autóctona) cuyas propiedades enológicas fueron estudiadas y reportadas en la Primera y Segunda Parte de este trabajo.
- *S. bayanus* (comercial) cuyas características analíticas y enológicas reportadas por el fabricante son las que constan en Materiales y Métodos.

1.3.2.- Caracterización de los mostos de jugos de naranja.

Los mostos de jugo de naranja natural, pasteurizado y concentrado reconstituido poseen muchas sustancias disueltas. Entre ellas se destacan en cuanto a la cantidad e importancia: la glucosa, fructosa, sacarosa y los ácidos cítrico, málico y quínico, además de sustancias minerales y compuestos nitrogenados. En las Tablas 2.3.1 y 2.3.2 (Primera Parte, Capítulo 2) se observan las concentraciones de los tres azúcares y de los minerales Na, K, Mg, Fe y P y el contenido de vitaminas de los jugos.

Del estudio realizado sobre la concentración de ácidos, el contenido de los mismos en los distintos mostos es el que se muestra en la Tabla 1.3.1.

Tabla. 1.3.1: Contenido en ácidos de los distintos mostos.

Ácidos	Mosto Jugo Natural	Mosto Jugo pasteurizado	Mosto jugo concentrado
Cítrico (mg/L)	10599	9163	9630
Málico (mg/L)	1838	1305	1541
Quínico (mg/L)	519	776	476

Puesto que el contenido en glúcidos es insuficiente para obtener un grado alcohólico adecuado los jugos fueron adicionados de sacarosa en cantidades suficiente para alcanzar entre 20 y 21 °Brix. La concentración de azúcares totales en el jugo de uva presenta una media de 250 g/L (Vogt *et al.*, 1986).

Las sustancias nitrogenadas presentes en los mostos de uva se encuentran en cantidades que oscilan entre 0,3 y 1,5 g/L (Aleixandre, 1999). En los mostos de naranjas el contenido en nitrógeno amínico está comprendido entre 0,2 y 0,3 g/L, por lo cual es frecuente el agregado de sales de nitrógeno, principalmente $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ para activar la iniciación de la fermentación (Vogt, 1971). También se puede suplementar con tiamina para una mejor nutrición del cultivo de levadura (Kolb, 2002). (Resolución INV N° C- 6/99 y Resolución INV N° C-12/00).

Morris *et al.* (1996) sugirieron que se requieren entre 500 y 900 mg/L de N asimilable para una buena fermentación. Si la concentración de N es baja, como ocurre en la mayoría de los jugos de frutas, algunas levaduras también pueden tener una buena performance de fermentación. No obstante, el crecimiento de las levaduras fermentativas está condicionado a una buena suplementación, no sólo de N sino también de PO_4^{-3} (Henschke and Jiranek, 1993), el cual tiene un impacto directo en el desarrollo celular como fuente inorgánica de P para la síntesis de ATP y ADP, y de ácidos nucleicos. La suplementación debe hacerse usando una fuente balanceada de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, el que proveerá un 25,8 % de NH_4 y 74,2% de PO_4^{-3} . Cabe acotar que la adición de 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ posee 258 mg/L de N asimilable, el cual excede los niveles recomendados. En Argentina es legal el uso de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Resolución INV N° C 6/99) como asimismo el de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y clorhidrato de tiamina como activadores de la fermentación y nutriente respectivamente (Resolución INV N° C-12/00).

Las especies *non- Saccharomyces* presentes en el mosto (especialmente de jugo natural) tales como *Kloeckera* y *Hanseniaspora* pueden dominar los estadios iniciales de la fermentación consumiendo nutrientes como N y Vitaminas especialmente tiamina con producción de altos niveles de acetato de etilo. Por otra parte *Kloeckera sp.* es también tolerante a las bajas temperaturas y a la presencia de SO_2 (Smith, 1999).

La producción de metabolitos inhibitorios por parte de mohos, levaduras nativas o bacterias puede tener un efecto significativo en la calidad de la fermentación por *Saccharomyces sp.* Entre las sustancias inhibitorias cabe destacar la producción de ácido acético que altera el producto de la fermentación alcohólica (Rasmussen *et al.*, 1995).

En el presente trabajo se inocularon masivamente los cultivos de levaduras de tal manera que la fermentación comenzó inmediatamente después de un breve período de crecimiento, hasta agotamiento del nitrógeno presente por lo cual se decidió no suplementar con FN. Si hay pocos aminoácidos proliferarían menos las células y mayor cantidad de azúcar pasaría a etanol. Es difícil predecir en términos absolutos la multiplicación de las levaduras y la producción de etanol debido a la complicada bioquímica de las levaduras (Ough, 1996).

Las distintas cepas de *Saccharomyces sp.* tienen distintos requerimientos en términos de N asimilable durante la fermentación. Henschke y Jiranek (1993), reportaron que la cepa *Montrachet* que presenta alta demanda en N, exhibe durante la fermentación una alta relación entre aminoácidos e iones NH^{+4} acumulados, en relación al azúcar fermentado.

En los mostos de uva existen pequeñas cantidades de sales minerales cuyos cationes en orden de concentración decreciente son: K, Ca, Mg y Na (Aleixandre, 1999). En los mostos de naranja el análisis del contenido en minerales mostró que la relación entre los cationes es igual a la indicada para los mostos de uva (Tabla 2.3.1 Primera Parte, Capitulo 2).

Estos macroelementos regulan el metabolismo celular manteniendo el pH del citoplasma y el balance iónico del cultivo el cual es muy importante en relación a la transferencia de protones y a la actividad enzimática de la membrana celular. (Rodríguez, *et al* 1999).

Kudo and Vagnoli (1998) demostraron la importancia de la relación entre la concentración de $\text{K}^{+}/\text{H}^{+}$ y el progreso de la fermentación alcohólica. Han sugerido una relación mínima $\text{K}^{+}/\text{H}^{+} = 25/1$. Cuando el pH disminuye alcanzando valores por debajo de 3,2 el incremento de H^{+} es un riesgo que puede ocasionar la detención prematura de la fermentación.

El contenido de P en los jugos de naranja está por debajo de lo

considerado para el correcto desarrollo de las levaduras (0,38 g/L), sin embargo se decidió trabajar sin el agregado de una fuente externa, por la misma razón expuesta en el caso de las sustancias nitrogenadas; y por otra parte para que el producto obtenido resulte lo más natural posible.

El contenido de ácidos en el mosto de uva está comprendido entre 6 y 14 g/L dependiendo de la variedad, de la región, del clima y del grado de madurez. (Vogt, 1971). Entre ellos existen varios ácidos orgánicos libres y/o combinados en forma de sales algunas de ellas ácidas. Se destacan el ácido tartárico, bitartratos, el ácido málico y sus sales. Estos ácidos más las sales minerales de carácter ácido y otras sustancias como el SO₂ constituyen la acidez total, la cual es muy importante para conseguir una perfecta fermentación de los mostos, proteger los vinos de posibles alteraciones y facilitar la clarificación de los mismos (Aleixandre, 1999).

Los ácidos orgánicos son importantes para el desarrollo de las levaduras porque pueden ser utilizados como FC, contribuir al potencial osmótico intracelular, contribuir al equilibrio de cargas intracelulares e intervenir en el control de pH intracelular. (Jenings, 1995).

En el caso de los mostos de naranja, el ácido predominante es el cítrico el cual se encuentra en concentraciones entre 9 y 11 g/L. Los bajos valores de pH resultantes favorecen la fermentación por levaduras las cuales toleran muy bien la acidez elevada, y por otro lado actúan como inhibidores para aquellos microorganismos alterantes. La composición particular en ácidos orgánicos del jugo de naranja es uno de los factores que determinan el sabor característico del producto.

Las levaduras tienen necesidades vitamínicas, no sólo para su crecimiento en aerobiosis, sino también para los procesos fermentativos, ya que éstas forman parte de las coenzimas que intervienen en el metabolismo productor de energía. (Edwards, *et al* 2003).

El contenido en vitaminas del jugo de naranjas, especialmente, tiamina está comprendido entre 60 y 145 µg/100 mL. No obstante cabría considerar, que debido a la flora nativa, particularmente *Kloeckera apiculata*, la cual es conocida como consumidora importante de vitaminas, especialmente tiamina, los niveles antes mencionados pueden estar disminuidos (Doneche, 1993).

1.3.3.- Evolución de la Fermentación.

La fermentación comienza en el momento que se alcanzan las condiciones del proceso: **número de células de levaduras, temperatura y pH.**

La evolución de la fermentación puede ser evidenciada de diversas maneras: desprendimiento de CO₂, medidas de densidad y medidas de sólidos solubles. El método utilizado en el presente trabajo fue la medición del CO₂, el cual permitió además evaluar la velocidad en los primeros estadios de la fermentación (Obisanya *et al.*, 1987).

En la Figura 1.3.1 se puede observar que *S. bayanus* a los dos pH desarrolla una fermentación tumultuosa hasta las 48 h y en mayor proporción en los mostos incubados a 20°C.

Las bajas temperaturas incrementan la duración del proceso, disminuyen la velocidad de crecimiento de las levaduras y se modifican la ecología de la fermentación alcohólica

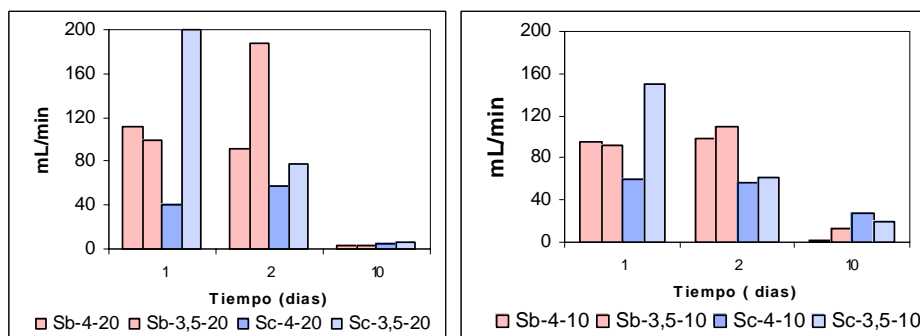


Figura 1.3.1 -Evolución del volumen de CO₂ desprendido durante el primer estadio.

Las levaduras *non-Saccharomyces* pueden contribuir al proceso fermentativo más marcadamente a temperaturas por debajo de 20°C (Fleet and Heard, 1993). Esto se ve reflejado positivamente en la composición química y características sensoriales de los vinos.

S. cerevisiae mostró un comportamiento diferente en la velocidad de fermentación no sólo con la temperatura sino también con el pH. A

pH 3,5 el desprendimiento de CO₂ es notable aún a 10°C, aunque dicho desprendimiento es más lento.

Cabe aclarar que la fermentación comenzó normalmente no viéndose afectada por el agregado de aproximadamente 7,5 g/HL de SO₂, a pesar de que se han reportado retrasos de hasta 12 h en la producción de CO₂, en mostos de uva cuando las concentraciones de SO₂ estaban por encima de 8 g/HL (Gerbaux y Meurgues, 1995).

Lo antedicho se manifestó para los vinos elaborados a partir de mosto de jugos natural y pasteurizado, no así para los de mosto de jugo concentrado reconstituido, en el cual tanto para las dos temperaturas y los dos pHs, como para las dos levaduras ensayadas se registró una notable disminución de la liberación de CO₂ a los 2 días de iniciado el proceso. Esto indica una disminución en la velocidad de la fermentación, lo cual puede deberse a alguna/s limitación/es nutricional/es que condicionen el desarrollo de las levaduras (Ough, 1996).

Una posible causa de la disminución de la velocidad de fermentación podría estar asociada al efecto tóxico ocasionado por el agregado de altas concentraciones de azúcar unido al hecho de que el mosto tiene deficiencia en N, luego la fermentación comienza lentamente y se dificulta su concreción. En estos casos cuando los niveles de glúcidos agregados al mosto corresponden a 25 – 30 °Brix el cultivo de levaduras agregado debe tener una población no menor a 5×10^6 células/mL. Para concentraciones mayores a 30 °Brix es necesario adicionar 1×10^6 lev/mL (Gump and Pruet, 1993).

1.3.4.- Cálculo de la cantidad de calor durante la fermentación tumultuosa.

La fermentación es una reacción exotérmica, cuya cinética regula el calor desprendido y la velocidad con que se produce. El calor retenido depende de factores tales como tamaño del depósito, relación superficie/volumen, pérdidas a través de las paredes del recipiente, entre otras.

La mayor velocidad de fermentación se alcanza cuando la densidad celular llega a su valor máximo, luego a medida que la concentración de alcohol etílico va aumentando el rendimiento fermentativo se reduce. Esto se debe, por un lado a la toxicidad del etanol

hacia las levaduras y por otro al calentamiento que puede sufrir el mosto, producto del metabolismo el que se puede representar por la siguiente reacción:



A temperaturas entre 20°C y 25°C, y al principio de la fermentación cuando la concentración alcohólica está por debajo de 1%, una levadura seleccionada es capaz de producir 0,4 mL de etanol por gramo de levadura seca activa (LSA) y por hora (Kolb, 2002). De ello se deduce que al principio de la fermentación existe una velocidad de producción de alcohol:

$$V_o = 2 \text{ g LSA} \times 0,4 \text{ mL C}_2\text{H}_5\text{OH/g LSA} \times \text{h}$$

$$V_o = 0,8 \text{ L C}_2\text{H}_5\text{OH/m}^3 \times \text{h}$$

Se puede calcular la cantidad de calor producido cuando la velocidad de fermentación es máxima de la siguiente forma:

$$92,1 \text{ g C}_2\text{H}_5\text{OH} \text{ ----- } 64,8 \text{ mL C}_2\text{H}_5\text{OH} \text{ ----- } 23,5 \text{ Kcal}$$

$$800,0 \text{ mL C}_2\text{H}_5\text{OH} \text{ ----- } 290 \text{ Kcal}$$

El calor generado en el proceso de vinificación de 30 L (0,030 m³) de mosto en cada una de las damajuanas viene dado teóricamente por la siguiente ecuación:

$$Q_G = \text{Vol. de mosto} \times 290 \text{ Kcal/m}^3 \text{ h}$$

$$Q_G = 8,7 \text{ Kcal / h}$$

Se puede calcular el calor disipado por el mosto en fermentación tumultuosa en condiciones ideales, haciendo las siguientes suposiciones:

1) Se considera una damajuana en la que se está produciendo la fermentación, ubicada en una habitación en la cual la temperatura del aire se mantiene a 20°C por convección natural.

2) Se toma como coeficiente global de transmisión de calor $U = 5 \text{ Kcal/h m}^2 \text{ }^\circ\text{C}$, a partir de los valores reportados en Perry (1978) para coeficiente de transmisión gas / líquido en convección libre comprendido entre 5 y 15 $\text{Kcal/h m}^2 \text{ }^\circ\text{C}$.

3) Para el cálculo de la superficie de transmisión calórica se considera la damajuana como un cilindro de diámetro 0,32 m y altura 0,50 m. Se desestima la superficie de la base por estar apoyada sobre el piso por lo cual no hay convección. La superficie total (S_T) es de 0,58 m².

4) El cálculo se hizo fijando como temperatura máxima a alcanzar por el mosto, 25°C. Luego el calor disipado (Q_D) será:

$$Q_D = S_T \times U \times \Delta T$$

$$Q_D = 0,58 \text{ m}^2 \times 5 \text{ Kcal/ h m}^2 \text{ }^\circ\text{C} \times (25-20) \text{ }^\circ\text{C} = 14,5 \text{ Kcal/h}$$

Comparando el calor generado con el calor disipado se puede concluir que la cantidad de calor generado en el momento de máxima velocidad de producción alcohólica es menor a la capacidad de disipación de calor del recipiente, por lo tanto no se alcanzan 25°C en el mosto y se podría deducir que la fermentación transcurrió entre 20°C y 23°C.

La alta disipación de calor se puede explicar por la superficie específica (S_e):

$$S_e = S_T/\text{Vol.} = 0,58 \text{ m}^2 / 0,03\text{m}^3 = 19,3 \text{ m}^2 / \text{Ton. de vino (considerando } \delta = 1).$$

Esta circunstancia deberá ser considerada en un futuro cambio de escala.

El cálculo para la fermentación a 10°C, no fue realizado por considerar que a esta temperatura es imposible un recalentamiento del mosto.

Las temperaturas usadas durante la fermentación se consideran lo suficientemente bajas como para inhibir la actividad bacteriana que junto con la adición de concentraciones apropiadas de SO₂ permitieron el pleno desarrollo de la fermentación alcohólica, limitando la posibilidad de ocurrencia de fermentaciones por bacterias.

1.3.5.- Evolución de algunos parámetros químicos y microbiológicos hasta la obtención del vino joven.

Los resultados de los parámetros obtenidos de las muestras tomadas inmediatamente después del primer trasiego se expresan en la Tabla 1.3.2. Estos se comparan con los respectivos mostos, de jugo

natural, jugo pasteurizado y jugo concentrado reconstituido, a los fines de observar cuales son los parámetros que cambian y si lo hacen aumentando o disminuyendo su valor.

1.3.5.1.- Sólidos solubles.

Se observa que la disminución de los °Brix durante la fermentación primaria (tumultuosa) es muy marcada, alcanzando reducciones del orden del 40 a 50 % comparados con el inicial del mosto, debido a la rápida transformación de los azúcares por parte de los microorganismos, coincidentemente con la intensidad en la velocidad de desprendimiento de CO₂.

1.3.5.2.- Perfil de azúcares reductores y totales.

Analizando la evolución de los parámetros químicos desde la inoculación de ambas levaduras en los mostos de jugo natural y jugo pasteurizado de naranja hasta la obtención del vino joven para las condiciones operativas en estudio, se puede observar en la Tabla 1.3.3 a) el correspondiente perfil de azúcares reductores y totales para los productos elaborados con *S. cerevisiae*, y en la Tabla 1.3.3 b) los correspondientes a los elaborados con *S. bayanus*.

La fermentación con *S. bayanus* presentó una disminución más marcada durante los primeros 10 días del proceso consumiéndose entre el 93 y 99 % del azúcar total del mosto. A partir de los azúcares remanentes, después de la fermentación tumultuosa, sólo se consumieron entre 27 y 29 % de los mismos.

Con *S. cerevisiae*, al final del primer trasiego se alcanzó a consumir entre 89 y 98 % de los azúcares totales, mientras que el consumo en la etapa siguiente varió entre 25 y 84 % de los azúcares remanentes de la etapa anterior. Estos resultados son comparables con los reportados por Obisanya *et al.* (1987).

Si bien el comportamiento de ambas levaduras con respecto al metabolismo anaeróbico de los azúcares fue similar, se pudo observar que *S. bayanus* en todas las condiciones de trabajo consumió casi la totalidad de los azúcares en el primer período mientras que *S. cerevisiae* evidenció diferencias principalmente con respecto al tipo de mosto

utilizado. Con mosto de jugo de naranja pasteurizado el remanente de azúcar en los vinos jóvenes fue mayor.

Tabla 1.3.2: Parámetros fisicoquímicos del producto obtenido luego de la fermentación primaria medidos después del primer trasiego.

	°Brix	Acidez %	pH	Az reduct g/100mL	Az totales g/100mL	Vit C mg/100mL	Nitrogeno mg/100mL	Aceite µL/100mL	Caroteno mg/100mL	Hesperidina mg/100mL
Natural	20	1,22	3,4	3,55	17,70	85,38	11,82	2,60	0,075	48,82
Sb3.5-10	10	1,16	3,56	0,62	0,95	79,21	2,74	1,60	0,047	40,00
Sb3.5-20	10	1,15	3,52	0,29	0,37	78,18	4,47	1,20	0,005	44,12
Sb4.0-10	9	0,76	3,95	0,32	0,34	81,27	3,03	1,28	0,001	35,88
Sb4.0-20	9,5	0,78	4,01	0,16	1,23	74,07	4,33	1,86	0,012	37,05
Sc3.5-10	8,5	1,10	3,55	0,22	0,36	79,21	3,46	1,20	0,009	36,47
Sc3.5-20	9	1,34	3,42	0,53	0,74	76,13	4,33	0,83	0,020	32,35
Sc4.0-10	8	0,87	3,9	0,46	0,55	83,69	5,19	0,70	0,017	31,18
Sc4.0-20	9,5	0,81	3,9	0,79	1,14	76,13	4,04	0,70	0,015	32,35
Past.	25	0,93	3,55	4,26	18,52	63,78	14,42	1,90	0,043	60,88
PSb3.5-10	9,5	0,99	3,72	0,45	0,60	70,98	3,17	1,20	0,030	40,00
PSb3.5-20	9	0,93	3,66	0,23	0,33	65,84	3,61	1,20	0,026	54,71
PSb4.0-10	9,5	0,70	4,16	0,62	0,73	69,95	3,46	1,50	0,040	44,11
PSb4.0-20	9,5	0,70	4,05	0,17	1,06	65,84	4,18	1,69	0,014	46,47
PSc3.5-10	10	1,05	3,6	1,79	1,96	71,73	4,61	0,29	0,004	55,29
PSc3.5-20	10	0,99	3,61	1,10	1,11	67,90	3,89	1,20	0,007	50,59
PSc4.0-10	9,5	0,87	4,01	1,27	2,05	73,91	3,75	0,50	0,002	40,59
PSc4.0-20	10	0,76	3,93	0,94	1,13	64,81	4,47	1,60	0,031	48,24
Conc.	24	0,99	3,67	5,07	23,00	63,78	17,88	4,50	0,055	77,76
CSb3.5-10	9,5	1,11	3,77	0,24	0,28	65,21	15,86	4,20	0,016	68,71
CSb3.5-20	8,9	1,14	3,7	0,25	0,33	64,33	9,37	3,70	0,034	64,35
CSb4.0-10	12	1,18	4,24	2,68	3,38	65,12	17,03	4,60	0,058	65,29
CSb4.0-20	9,5	0,99	4,06	0,17	0,19	66,35	13,70	4,40	0,041	61,12
CSc3.5-10	12,5	1,21	3,73	2,86	4,66	70,63	10,13	4,60	0,041	58,74
CSc3.5-20	10,5	1,05	3,61	1,37	1,40	60,69	7,21	3,40	0,039	71,71
CSc4.0-10	9,5	0,97	4,04	0,19	0,22	66,12	17,30	4,20	0,058	65,29
CSc4.0-20	10,5	0,93	3,97	1,00	1,00	65,04	13,41	4,40	0,045	77,88

Nurgel *et al.* (2002) han demostrado que trabajando con jugo de uva pasteurizado e inoculando con una cepa autóctona de *S. cerevisiae*, el consumo inicial de azúcares totales fue alto, pero a los 10 días, la concentración de azúcares finales no alcanzó los niveles del producto de la fermentación de mosto no pasteurizado, presentando un remanente de 1,4 g/L contra 1 g/L del pasteurizado

Tabla 1.3.3. a) Evolución de Azúcares Totales para la fermentación usando *S. cerevisiae*.

Azúcares totales g/100 mL								
	Sc3.5-10	Sc3.5-20	Sc4.0-10	Sc4.0-20	PSc3.5-10	PSc3.5-20	PSc4.0-10	PSc4.0-20
Mosto	17,70	17,70	17,70	17,70	18,52	18,52	18,52	18,52
1º trasiego	0,36	0,74	0,55	1,14	1,96	1,11	2,05	1,13
Vino joven	0,23	0,19	0,60	0,18	1,32	1,12	1,54	1,17

Tabla 1.3.3. b) Evolución de Azúcares Totales para la fermentación usando *S. bayanus*

Azúcares totales g/100 mL								
	Sb3.5-10	Sb3.5-20	Sb4.0-10	Sb4.0-20	PSb3.5-10	PSb3.5-20	PSb4.0-10	PSb4.0-20
Mosto	17,70	17,70	17,70	17,70	18,52	18,52	18,52	18,52
1º trasiego	0,95	0,37	0,34	1,23	0,60	0,33	0,73	1,06
Vino joven	0,51	0,36	0,25	0,24	0,43	0,27	0,52	0,29

En los vinos de naranja la variación de los azúcares reductores para ambas levaduras y en iguales etapas de fermentación que las consideradas para los azúcares totales se puede observar en las Figuras 1.3.2 y 1.3.3.

La cinética de la utilización de los azúcares reductores es análoga a la de los azúcares totales, manifestando *S. bayanus* una mayor velocidad en su consumo durante la fermentación tumultuosa. De hecho es muy escaso el azúcar remanente en los vinos jóvenes

Los resultados presentados en las figuras 1.3.2 y 1.3.3 confirman el comportamiento de *S. cerevisiae* respecto a la menor velocidad en el consumo de los azúcares en la primera etapa del proceso, como así también al azúcar remanente en los vinos jóvenes especialmente en los elaborados a partir de mosto de jugo de naranja pasteurizado.

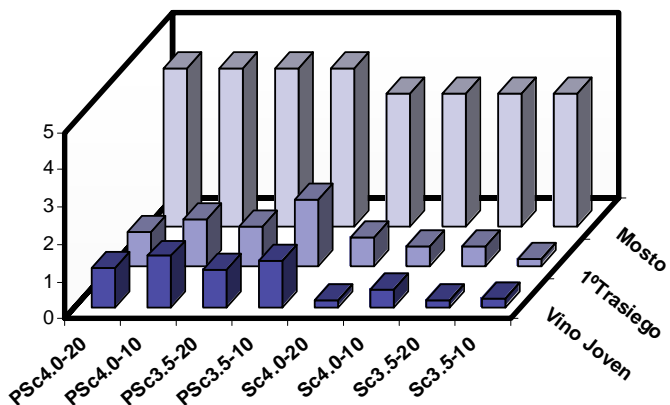


Figura 1.3.2.- Variación de los azúcares reductores en los vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

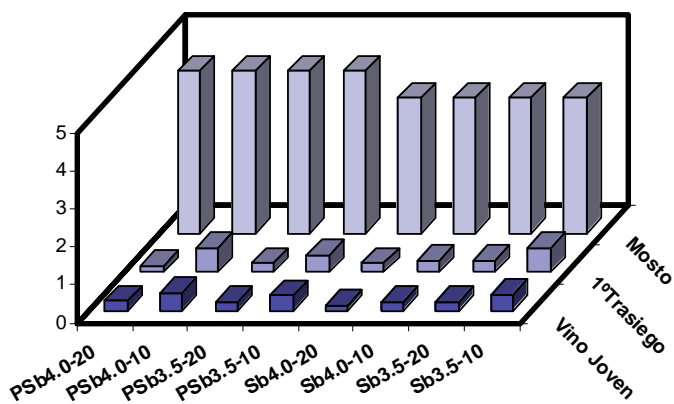


Figura 1.3.3.- Variación de los azúcares reductores en los vinos elaborados con *S. bayanus*.

1.3.5.3.- Contenido de glucosa, sacarosa y fructosa en los vinos jóvenes.

Se observaron diferencias en el contenido de glucosa, sacarosa y fructosa en los vinos jóvenes dependiendo de la levadura usada (Figuras 1.3.4 y 1.3.5).

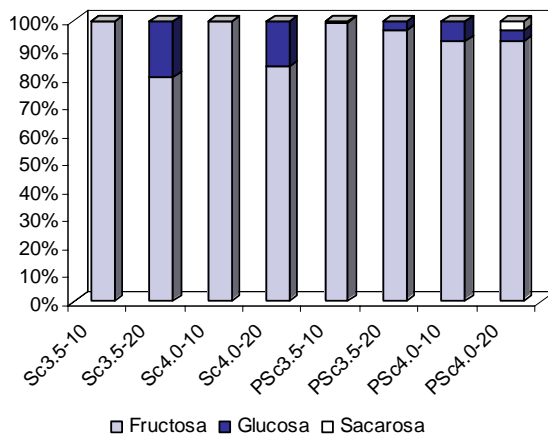


Figura 1.3.4. Porcentaje de glucosa, fructosa y sacarosa de vino joven elaborado con *S. cerevisiae*.

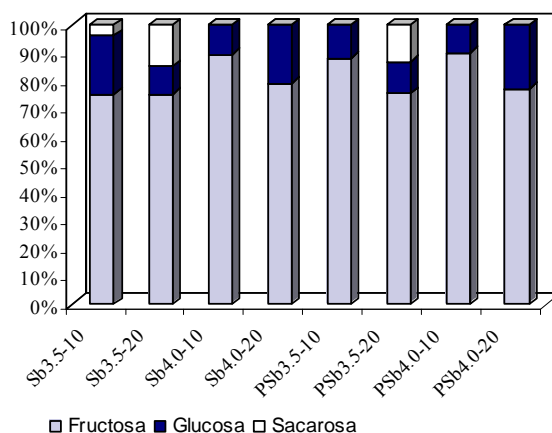


Figura 1.3.5. Porcentaje de glucosa, fructosa y sacarosa de vino joven elaborado con *S. bayanus*.

En el caso de *S. bayanus* la composición de glúcidos en el vino joven está representada mayoritariamente por fructosa, entre 10 y 20 % de glucosa y principalmente en Sb-3,5-20 y PSb-3,5-20 se encontró un porcentaje mayor al 10 % de sacarosa.

En el caso de *S. cerevisiae* el porcentaje de glucosa sin fermentar es menor o nulo salvo en Sc-3,5-20 y Sc-4,0-20 que superó el 10 % del total de glúcidos. Un estudio realizado por Reynolds *et al.* (2001) sobre vinificación en blanco, con distintas cepas de *S. cerevisiae*, reportó valores de fructosa comprendidos entre 3,3 y 5,8 g/L, al cabo de 48 días de fermentación según la cepa usada, mientras que en el mismo período la concentración de glucosa fue tan baja que en algunos casos no fue detectada.

1.3.5.4.- Graduación alcohólica.

Partiendo de la concentración de azúcares totales, que incluye entre otros la glucosa y fructosa propia del jugo más la sacarosa agregada para obtener el mosto, se puede calcular el grado alcohólico probable del vino aplicando la formula:

$$\text{Grado alcohólico probable} = (\text{Azúcares} - 1)/17$$

De la fórmula, 17 corresponde al hecho de que por término medio, las levaduras necesitan 17 g de azúcar para producir 1° de alcohol. Como no todos los azúcares son fermentables, al contenido de azucares totales se le resta 1 que corresponde a los infermentables (Aleixandre, 1999).

En las Figuras 1.3.6 y 1.3.7 el etanol teórico corresponde a la aplicación de esta fórmula para los mostos de jugo natural y pasteurizado, expresando la concentración en g/100 mL. El etanol medido fue siempre menor que el valor teórico, lo cual demuestra que la transformación de azúcares en etanol no es total pudiendo formarse además de biomasa, otras sustancias del metabolismo de las levaduras. Probablemente debido al agregado de sacarosa al inicio de la fermentación, las levaduras hayan desarrollado diferentes mecanismos para resistir esta situación adversa. Para comprender estos mecanismos hay que remitirse al proceso de síntesis de proteínas (Ivorra *et al.*, 1999).

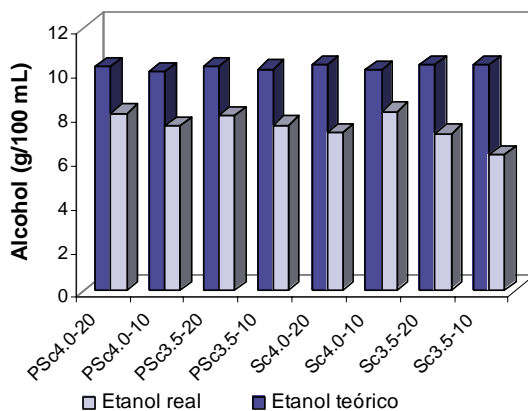


Figura 1.3.6.- Etanol teórico y experimental en vinos jóvenes elaborados con *S. cerevisiae*

Las especies *non-Saccharomyces* presentes en el mosto (especialmente de jugo natural) tales como *Kloeckera* y *Hanseniaspora* pueden dominar los estadios iniciales de la fermentación consumiendo nutrientes tales como N y vitaminas especialmente tiamina produciendo altos niveles de acetato de etilo. Particularmente *Kloeckera sp* es también tolerante a las bajas temperaturas y a la presencia de SO₂ (Smith, 1999).

La producción de metabolitos inhibitorios por parte de mohos, levaduras nativas o bacterias puede tener un efecto significativo en el comportamiento de *Saccharomyces sp* durante la fermentación. Entre las sustancias inhibitorias cabe destacar la producción de ácido acético que altera el producto de la fermentación alcohólica (Rasmussen *et al*, 1995).

Las respuestas involucran aspectos de la percepción por parte de la célula de levadura de la señal de transducción y el control transcripcional y post transcripcional, la presencia de proteína señal en las organelas, la acumulación de protectores y las funciones de reparación. La eficiencia de estos procesos dan a las cepas diferencias de vigor. Cuando modifican su metabolismo tienen fermentaciones anormales con bajo rendimiento en etanol y alta producción de ácido acético (Caridi *et al.*, 1999).

Se pudo observar que *S. bayanus* produjo en todos los casos más etanol que *S. cerevisiae*. El rendimiento en alcohol, definido como % en volumen de alcohol producido dividido por el % de azúcar consumido, varió entre 0,44 y 0,51 para *S. bayanus* y entre 0,35 y 0,47 para *S. cerevisiae*.

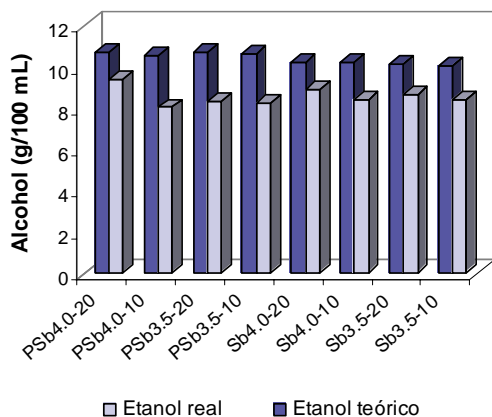


Figura 1.3.7.- Etanol teórico y experimental en vinos jóvenes elaborados con *S. bayanus*.

Estudios de vinificación con distintas cepas de *S. cerevisiae* han reportado diferencias en el contenido de etanol (Nagel and Graber, 1988).

La producción de alcohol etílico, con ambas levaduras, generalmente fue mayor en los mostos obtenidos a partir de jugo de naranja pasteurizado, situación que también encontraron otros autores, pero para mostos de uva (Nagel *et al.*, 2002).

En lo que respecta al pH, ambos cultivos produjeron mayor graduación alcohólica a pH 4,0 que a pH 3,5.

Se ha reportado que el catión Ca^{2+} puede ejercer cierta influencia sobre la tolerancia al etanol por parte de *S. cerevisiae* y *S. bayanus*. Nabais *et al.* (1988) demostraron que durante la fermentación alcohólica de mostos suplementados con igual concentración de Ca^{+2} , *S. bayanus* produjo mayor graduación alcohólica que *S. cerevisiae*, pero aumentando el contenido de este catión, la primera experimentó una menor tolerancia al etanol. La mayor graduación alcohólica obtenida a pH 4,0 podría atribuirse a la obtención del mosto por adición de CaCO_3 .

El papel que juega el ión Ca^{+2} , en este caso puede ser explicado por su acción en el mantenimiento de la barrera de permeabilidad de la membrana citoplasmática bajo condiciones adversas debido a la protección de la estructura fosfolipídica que regula la interacción lípido-proteína. El Ca^{+2} es también uno de los cationes capaces de formar complejos con los fosfomananos de la pared celular de las levaduras (Soares y Seynaeve, 2000).

Es necesario acotar que la presencia de acetaldehído junto con el incremento en la concentración de etanol durante la fermentación aumenta la acción inhibitoria del alcohol sobre las levaduras.

La aireación durante las primeras fases de la fermentación estimula la síntesis de precursores que mantienen la integridad de la MC, efecto que se ve favorecido con la suplementación de N en concentraciones que van desde 250 a 500 mg/L, mitigando de esta manera el efecto adverso del etanol (Jones, 1989).

1.3.5.5.- Nitrógeno amínico

La evolución del nitrógeno amínico partiendo de los mostos de jugo natural y pasteurizado se puede observar en la Figuras 1.3.8 y 1.3.9. Las concentraciones de partida fueron, según Tabla 1.3.2 de 118,2 mg/L y 144,2 mg/L, respectivamente, valores considerados por varios autores como la cantidad mínima necesaria de N asimilable para completar la fermentación de un mosto (Agenbach, 1977; Bely *et al.*, 1990).

En los vinos elaborados con *S. cerevisiae* se verificó un consumo de nitrógeno amínico comprendido entre el 57 y 71 % hasta el primer trasiego mientras que para el mismo periodo *S. bayanus* consumió entre 64 y 77 %. A partir de este momento la tendencia fue a permanecer casi constante. Esto se podría explicar teniendo en cuenta que durante la primera fase, donde aún hay O_2 disponible, los microorganismos usan la única fuente de nitrógeno aprovechable, para crecer aeróbicamente.

Estudios realizados sobre cinética de fermentación y consumo de nitrógeno han demostrado que la fermentación se completa en un tiempo menor cuando la disponibilidad de N asimilable es de aproximadamente 300 mg/L (contenido normal del jugo de uva). Cantidades mayores de N asimilable retrasan la fermentación. Asimismo la producción de biomasa

fue significativamente menor cuando se realizaron fermentaciones con niveles de N de alrededor de 60 mg/L (Beltran *et al.*, 2004).

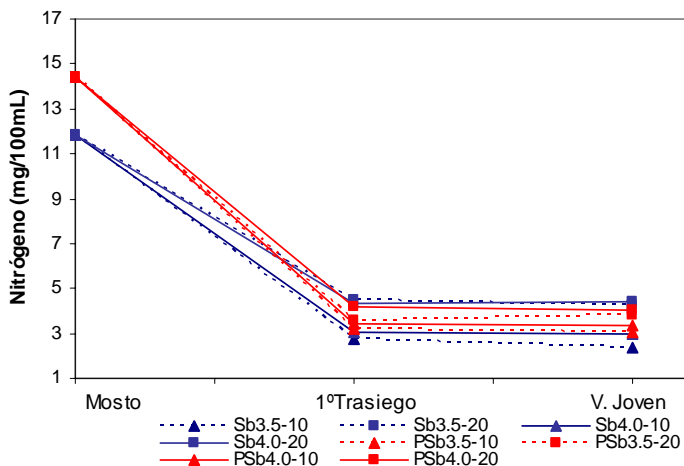


Figura 1.3.8.: Evolución de nitrógeno amínico en vinos elaborado con *S. bayanus*.

Cabe observar que durante la etapa tumultuosa de la fermentación las concentraciones de azúcares reductores y de nitrógeno amínico disminuyeron en igual proporción en los vinos elaborados con ambos cultivos.

Durante la segunda parte de la fermentación el consumo de nitrógeno fue escaso en los vinos elaborados con ambas levaduras, probablemente debido a la presencia de etanol en el medio. El etanol inhibe el sistema de transporte de aminoácidos (D'Amore and Steward, 1987, Ferreras *et al.*, 1989) reduce el número de GAP_s presente en la membrana citoplasmática de las levaduras (Ferreras *et al.*, 1989) y provoca la salida de aminoácidos al exterior de la célula a través de un proceso de excreción (Bidan *et al.*, 1986).

La cantidad de nitrógeno residual en los vinos está determinada por el consumo de componentes nitrogenados durante la primera etapa de fermentación.

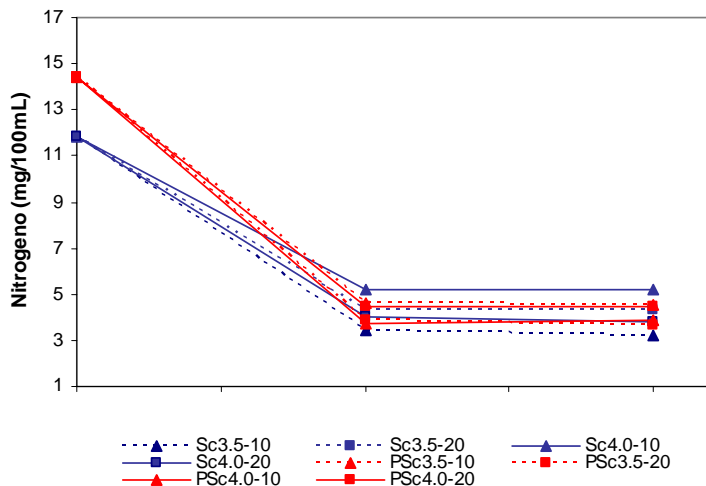


Figura 1.3.9.- Evolución de nitrógeno amínico en vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

Los vinos producidos a partir de mosto de jugo concentrado reconstituido mostraron un comportamiento diferente hasta el primer trasiego. Se registraron valores de nitrógeno amínico similares a los de partida. Aparentemente, no habría habido consumo de estos nutrientes, presumiblemente por la carencia de vitaminas que conforman los cofactores de las enzimas involucradas en la biosíntesis celular (Berk, 1986) debida al tratamiento térmico del jugo a partir del cual se preparó el mosto.

Este comportamiento se pudo haber agravado por la falta de suplementación externa de FN y de vitaminas. Podría considerarse además, el estrés sufrido por las levaduras en un medio pobre y con la presencia de algunas sustancias inhibitorias que impidieron el buen desarrollo de los inóculos, lo que luego se verificó con el recuento de levaduras del producto del primer trasiego sobre mostos de jugo concentrado de naranja. Los aceites esenciales, tienen características antisépticas y están presentes en mayor concentración en los jugos concentrados. Sin embargo es de hacer notar que en el proceso de adaptación en condiciones aeróbicas, realizado en este trabajo (Capítulo II, Primera Parte) este efecto no fue apreciado.

1.3.5.6.- Ácidos orgánicos.

El estudio de los ácidos orgánicos del mosto es una de las variables utilizadas para evaluar las etapas de la fermentación, ya que los mismos pueden sufrir tanto transformaciones químicas, como enzimáticas y de origen microbiano (Ramón *et al*, 1999).

1.3.5.6.1.- Ácido cítrico.

La concentración de ácido cítrico aumentó desde el momento de la inoculación hasta el primer trasiego. (Figuras 1.3.10 y 1.3.11)

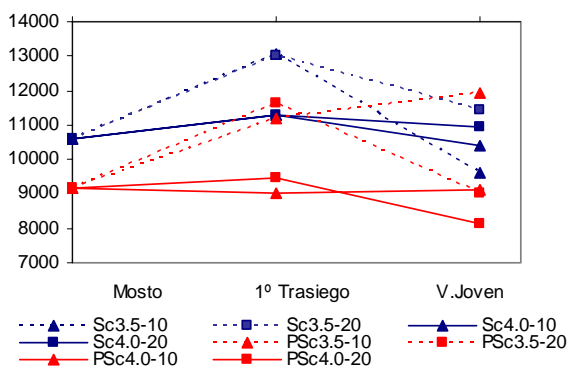


Figura. 1.3.10.- Evolución del ácido cítrico (mg/L) en vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

En los productos de la fermentación con *S. bayanus* y *S. cerevisiae*, se registraron valores máximos cuando el proceso se realizó a pH 3,5 independientemente de la temperatura y de la naturaleza del mosto. Constituyeron una excepción los vinos obtenidos con ambas levaduras cuando la fermentación se llevó a cabo a pH 4,0 y 10°C

Los resultados observados concuerdan con lo reportado por Reynolds *et al.* (2001) respecto a que existen especies de levaduras del genero *Saccharomyces*, entre ellas *S. bayanus* y *S. cerevisiae* que son capaces de producir citratos por su metabolismo durante la fermentación alcohólica.

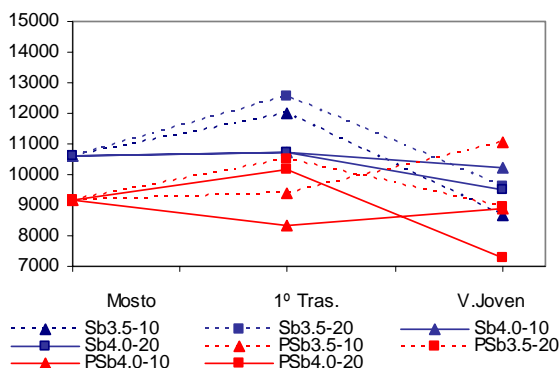


Figura 1.3.11.- Evolución del ácido cítrico (mg/L) en vinos elaborados con *S. bayanus*.

Después del primer trasiego, la mayoría de los vinos experimentaron un descenso en la concentración de este ácido siendo el efecto más marcado cuando se trabajó con mosto de jugo pasteurizado a pH 4,0 y 20°C, independientemente del cultivo. Este comportamiento podría ser atribuido a la presencia de bacterias del ácido láctico que son capaces de utilizar el ácido cítrico como fuente de carbono (Suarez e Iñigo, 1992). Sin embargo hay publicaciones que refieren el fenómeno de asimilación de citrato por parte de algunas especies de levaduras durante la fermentación alcohólica. (Young-Hwan *et al.*, 1997). Probablemente en el caso de vinos de naranja se esté en presencia de un comportamiento similar.

Los vinos jóvenes obtenidos con mosto de jugo de naranja pasteurizado a pH 3,5 y 10°C mostraron un comportamiento contrario a los anteriores. Esto se podría explicar considerando que las bacterias del ácido láctico pudieron inhibirse por el tratamiento térmico del jugo y los menores valores de pH y temperatura de fermentación; condiciones que por otra parte favorecen el desarrollo de las levaduras inoculadas (Amerine y Ough, 1969). El consumo de citrato por levaduras podría estar restringido por el estrés provocado por el entorno.

1.3.5.6.2.- Ácido málico.

En las Figuras 1.3.12 y 1.3.13 se observa que el ácido málico tiende a aumentar su concentración en los primeros 10 días de fermentación cuando las levaduras desarrollan su metabolismo a pH 4,0. Luego se manifiesta un comportamiento aleatorio, aumentando en

algunos casos y disminuyendo en otros. El aumento podría estar relacionado con la síntesis de este ácido por parte de levaduras del género *Saccharomyces* (Antonelli *et al.*, 1999).

Numerosos autores han demostrado que los vinos fermentados con *S. bayanus* registraban mayores concentraciones de ácido málico que los fermentados con *S. cerevisiae* (Reynolds *et al.*, 2001). Esto lo atribuyeron a la producción de ácido málico por parte de la primera y su degradación por *S. cerevisiae*.

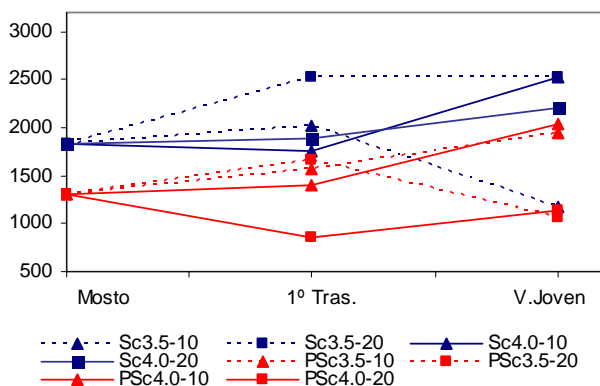


Figura 1.3.12.: Evolución del ácido málico (mg/L) en vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

La hipótesis más difundida sobre la producción de ácido málico es la que postula que dicha formación se debe a la fijación de CO₂ sobre el piruvato, producto final de la glucólisis para dar oxalacetato que es reducido a continuación a ácido málico por las levaduras (Yeramian *et al.*, 2001).

Según datos reportados por Redzepovic *et al.* (2003) trabajando con *S. cerevisiae* y *S. bayanus* en un medio sintético con 0,3 a 0,9 % de ácido málico, pH 3,3 y temperatura de fermentación 20°C, a los 9 días de iniciado el proceso, *S. cerevisiae* degradó un 20 % del ácido málico inicial, por su parte *S. bayanus* lo hizo en sólo 5 %.

Si se comparan estos resultados con los primeros estadios de fermentación de mosto de jugo de naranja se obtienen iguales

comportamientos cuando el proceso se desarrolló a pH 3,5, tanto con mostos de jugo natural como de jugo pasteurizado.

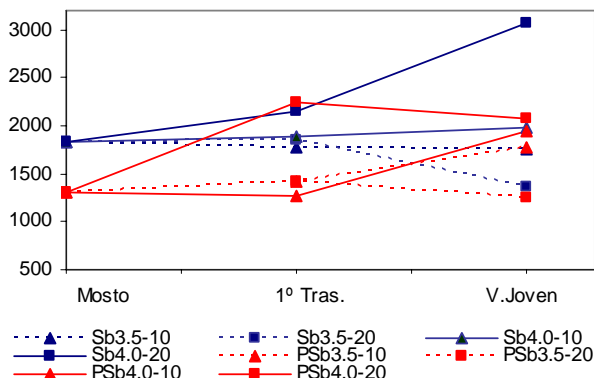


Figura 1.3.13.- Evolución del ácido málico (mg/L) en vinos elaborados con *S. bayanus*.

En algunas levaduras el malato puede ser descarboxilado oxidativamente por enzimas dependientes del NAD sobre piruvato, el cual es descarboxilado a acetaldehído y reducido luego a etanol. Una porción también puede ser transformada a succinato vía fumarato (Reynolds *et al.*, 2001; Taillandier *et al.*, 1998).

1.3.5.6.3.- Ácido quínico.

Las variaciones experimentadas por el ácido quínico se observan en la Figuras 1.3.14 y 1.3.15. No se hacen comentarios al respecto por no disponer de información del metabolismo de este ácido por parte de la microbiota presente en el mosto y de las reacciones químicas y/o enzimáticas que puede experimentar este ácido en las condiciones particulares de vinificación.

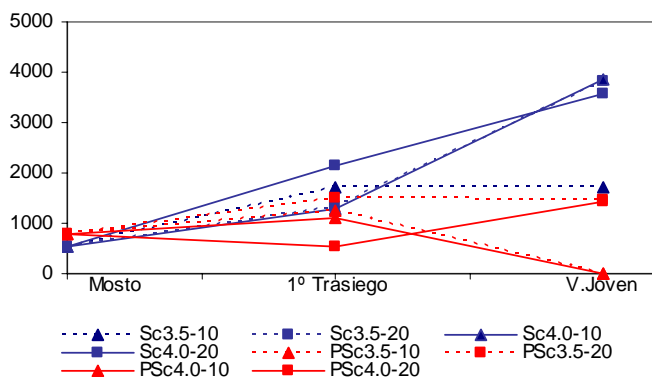


Figura 1.3.14.- Evolución del ácido quínico (mg/L) en vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

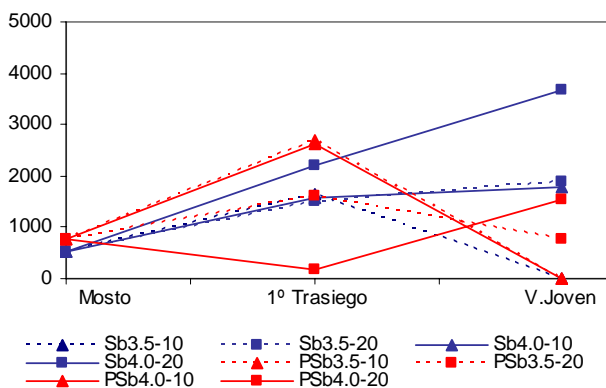


Figura 1.3.15.- Evolución del ácido quínico (mg/L) en vinos elaborados con *S. bayanus*.

1.3.5.7.- Acidez titulable.

En los mostos de pH 4,0 la acidez titulable expresada en % de ácido cítrico experimentó una leve disminución durante la fermentación tumultuosa lo que podría atribuirse al agregado de CaCO_3 . Después de 45 días de proceso, este parámetro aumentó hasta alcanzar valores similares o menores al del mosto de origen (Figuras 1.3.16 y 1.3.17).

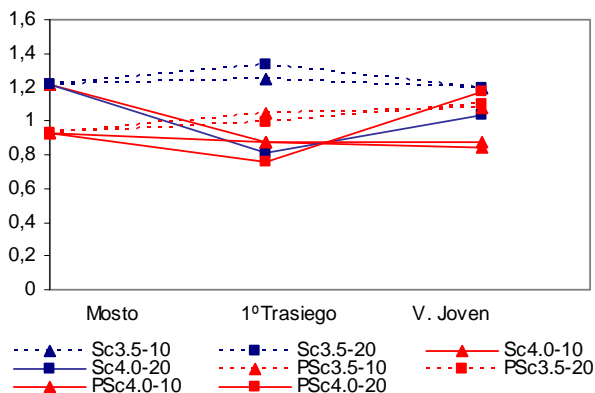


Figura 1.3.16.- Evolución de la acidez titulable (% de ácido cítrico) en vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

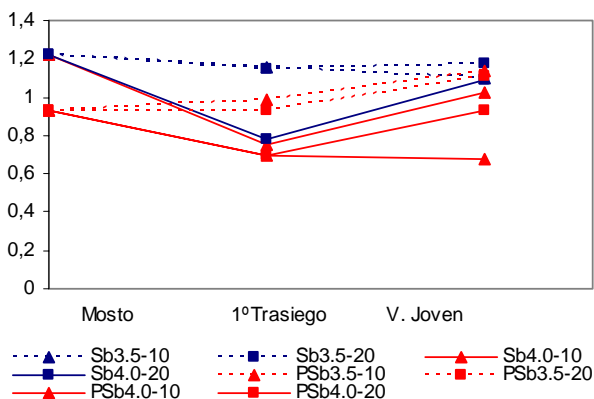


Figura 1.3.17.- Evolución de la acidez titulable (% de ac. cítrico) en vinos elaborados con *S. bayanus*.

Teniendo en cuenta que la acidez titulable es solo una medida de los iones hidrógeno consumidos por titulación con una base valorada hasta el punto final y que la acidez total se define como el contenido de ácidos orgánicos en el vino (Darias *et al.*, 2003), la acidez titulable resultó más baja que la total en todas las etapas de elaboración del vino de naranja.

A pH 3,5 cada levadura se comportó de manera particular. Cuando los mostos se fermentaron por inoculación con *S. bayanus* la

acidez titulable aumentó levemente hasta el primer trasiego, pero cuando se inocularon con *S. cerevisiae*, este cambio fue más marcado, probablemente debido a la producción de ácido durante la primera etapa de fermentación (Obisanya *et al.*, 1987).

Este aumento también podría justificarse considerando el agregado de KHSO_3 y el efecto protector que ejerce el SO_2 sobre las levaduras en condiciones de estrés osmótico (Caridi, 2003).

1.3.5.8.- Ácido ascórbico.

El ácido L-ascórbico (Vitamina C) está presente en los jugos cítricos y es conocida su actividad antioxidante por lo cual es muy importante establecer su presencia en los vinos obtenidos a partir de esta fruta dado que está relacionada con el proceso de pardeamiento enzimático y no enzimático. Es preciso mencionar que su autooxidación, aunque lentamente, se verifica aún en condiciones totalmente anaeróbicas.

El contenido en ácido ascórbico en los vinos de mostos de jugo natural y de jugo pasteurizado presentó un ligero descenso. (Figuras 1.3.18 y 1.3.19) Sin embargo, no queda claro si los valores reportados están subvaluados debido a posibles interferencias negativas en su determinación por el efecto del etanol presente en las muestras, o se debe a la transformación de ácido ascórbico en dehidroascórbico por oxidación, teniendo en cuenta que el método utilizado para dosar vitamina C, sólo determina la forma reducida.

La situación planteada se repite para las dos especies de levaduras, lo cual aumentaría la probabilidad de que el proceso de degradación sea eminentemente químico y/o enzimático (reacciones de pardeamiento) y no biológico, más aún teniendo en cuenta que a mayor temperatura la pérdida de ácido ascórbico se ve incrementada (Figuras 1.3.18 y 1.3.19.).

En las muestras del primer trasiego del producto proveniente de mosto de jugo concentrado reconstituido se registró un aumento en concentración de ácido ascórbico lo que puede estar relacionado con la presencia de especies bacterianas del género *Acetobacter* que intervienen en la síntesis de ácido L-ascórbico a partir de D-glucosa (Bruchmann, 1980).

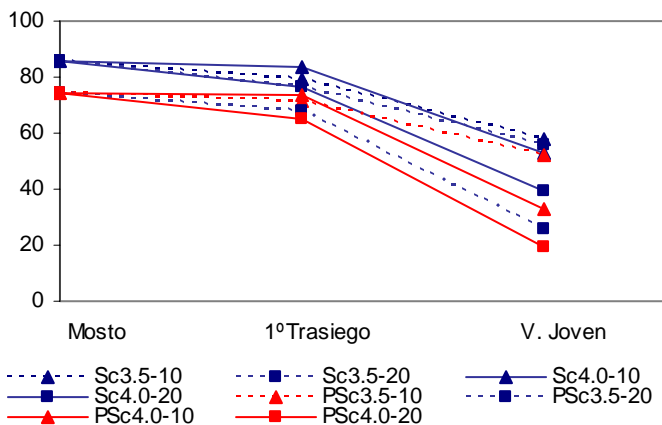


Figura 1.3.18.- Evolución del ácido ascórbico (mg/100 mL) en vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

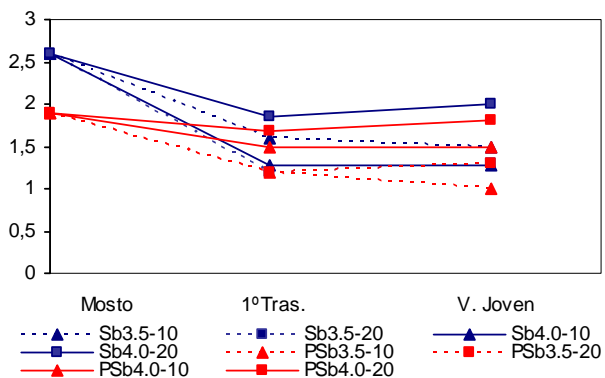


Figura 1.3.19.- Evolución del ácido ascórbico (mg/100 mL) en vinos elaborados con *S. bayanus*.

1.3.5.9.- Carotenoides.

De los carotenos del jugo de naranja, el β -caroteno es el componente principal y el responsable del color del jugo.

Transcurrida la primera etapa y hasta la obtención del vino joven no se observaron variaciones en las concentraciones de los carotenoides (Figuras 1.3.20 y 1.3.21). Con las dos especies de *Saccharomyces* se obtuvieron los mismos resultados

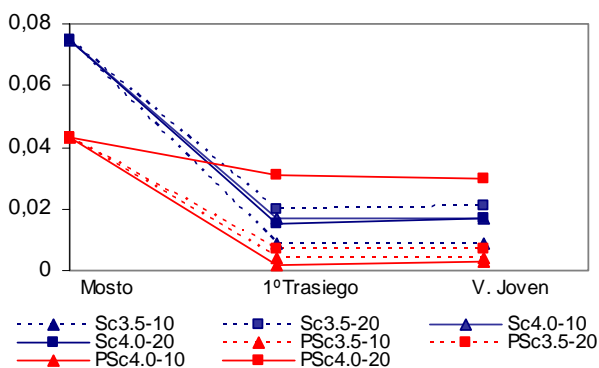


Figura 1.3.20.- Evolución de β -caroteno (mg/100 mL) en vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

Durante las transformaciones experimentadas por el mosto hasta el primer trasiego, dicho componente presentó una ligera disminución. La observación de las características de la borra demuestra un intenso color naranja, con lo cual se puede presumir que la disminución de este analito en la fase líquida deriva del arrastre de los carotenoides hacia la fase sólida (borra). No se considera probable un arrastre de carotenoides junto con la fase orgánica eliminada por los gases de salida.

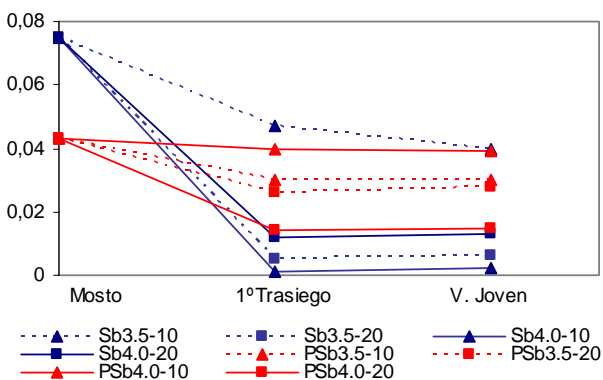


Figura 1.3.21.- Evolución de β caroteno (mg/100 mL) en vinos elaborados con *S. bayanus*.

1.3.5.10.- Aceites esenciales.

Es bien conocido que uno de los atributos de calidad de los jugos cítricos es su aroma. Los compuestos volátiles son especialmente importantes en el flavor del jugo de naranja e incluye alcoholes, aldehidos, ésteres, cetonas y terpenos. Uno de los factores que contribuyen a la popularidad del jugo de naranja es la combinación de la calidad y cantidad de estos compuestos aromáticos (Shaw, 1994).

El aroma de los jugos frescos es modificado por varios tratamientos aplicados durante el procesamiento industrial, entre ellos la clarificación que reduce los sólidos insolubles en aproximadamente un 3 %. Esta reducción en el contenido de pulpa afecta la composición volátil en el jugo debido a la distribución diferente de estos compuestos entre la pulpa y el suero. Los terpenos, considerados los compuestos más abundantes en los aceites de la piel de las naranjas están caracterizados por tener una muy baja polaridad y esta es la razón por la cual están más asociados con la pulpa. Luego la eliminación de la pulpa resulta en una pérdida total de este componente en el jugo. El resto de los componentes aromáticos del jugo se encuentran en el suero (Jordan *et al.*, 2001).

Durante la elaboración del vino de naranja y especialmente en los primeros estadios ocurren dos fenómenos que podrían ser la causa de la modificación de la concentración de los compuestos aromáticos: 1) sedimentación de la pulpa y 2) producción de CO₂. Por esta razón es importante seguir la evolución de estos compuestos durante la fermentación. (Figuras 1.3.22 y 1.3.23).

Las concentraciones de aceites esenciales mostraron moderadas disminuciones hasta el primer trasiego con respecto a los valores iniciales de los mostos preparados con jugo natural y con jugo pasteurizado cuando la fermentación fue catalizada por *S. bayanus*. Sin embargo, esta disminución fue más marcada cuando se vinificó con *S. cerevisiae*. Esto podría estar relacionado con la posibilidad de que los aceites esenciales (fase orgánica) sean arrastrados por los gases de salida durante la fermentación, la que fue más intensa durante las primeras 24 h para *S. cerevisiae*.

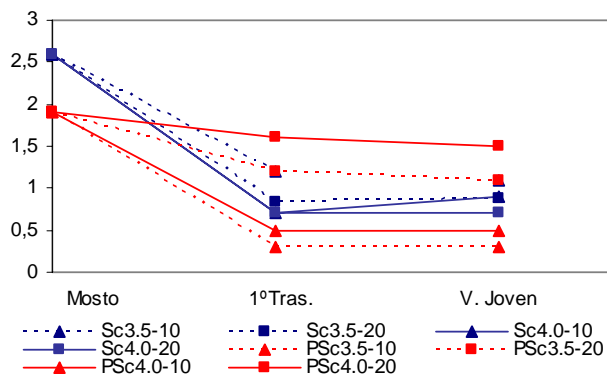


Figura 1.3.22.- Evolución de los aceites esenciales ($\mu\text{L}/100\text{mL}$) en vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

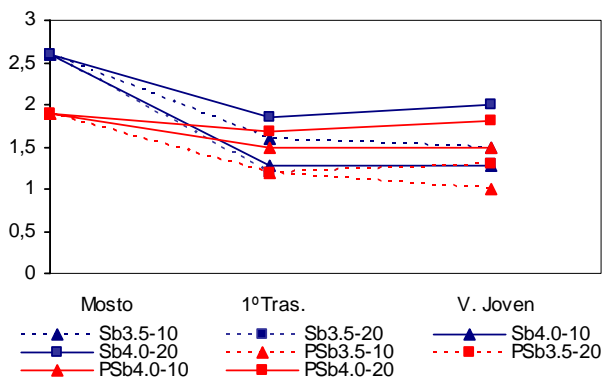


Figura 1.3.23.- Evolución de los aceites esenciales ($\mu\text{L}/100\text{mL}$) en vinos elaborados con *S. bayanus*.

Sin embargo en los vinos provenientes de mosto de jugo concentrado reconstituido los valores registrados hasta el primer trasiego permanecieron casi constantes, esto concuerda con la lentitud del proceso en la primera etapa.

1.3.5.11.- Flavonoides: Hesperidina.

En las frutas cítricas se han hallado cantidades apreciables de

flavonoides. Estos glicósidos son escasamente solubles en agua y se combinan con los azúcares para dar glucósidos de glucosa complejos que son mucho más solubles y fácilmente hidrolizables (Berk, 1986).

La hesperidina es el principal glucósido del jugo de naranja, por este motivo es interesante saber como evoluciona durante el proceso de vinificación de este sustrato. Si bien su solubilidad es algo mayor en solución alcohólica, se observa que en la primera etapa sufrió una ligera disminución, debida probablemente a su hidrólisis durante este periodo de la fermentación (Ough, 1996). (Figuras 1.3.24 y 1.3.25).

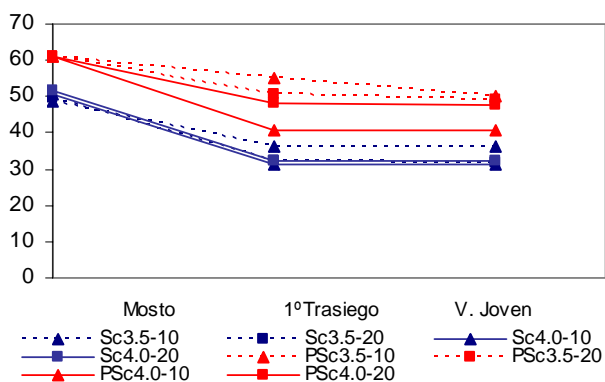


Figura 1.3.24.- Evolución de Hesperidina (mg/100 mL) en vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

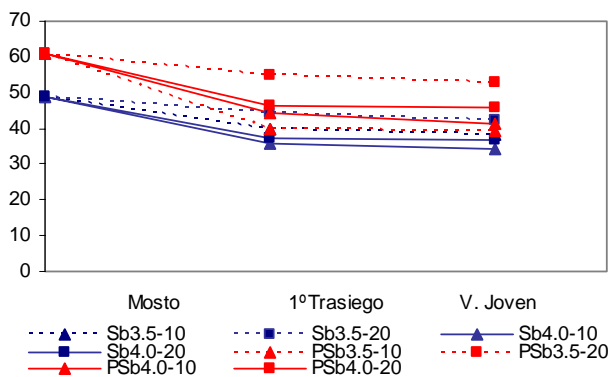


Figura 1.3.25.- Evolución de hesperidina (mg/100 mL) en vinos elaborados con *S. bayanus*.

El aglucón obtenido por hidrólisis total de la hesperidina (hesperitina) es altamente insoluble, por lo que se presume que precipita hacia la borra manteniéndose constante hasta la obtención del vino joven

1.3.5.12.- Control microbiológico.

Con el fin de seguir la fermentación alcohólica y detectar otros microorganismos que podrían ser causantes de alteraciones microbianas (enfermedades) se efectuaron análisis microbiológico para revelar la presencia de ellos antes de que se produzca el deterioro del producto.

Para la observación de las levaduras se hizo una coloración vital con azul de metileno, observándose en el caso de los mostos tanto de jugo natural como de jugo pasteurizado, fermentados por *S. bayanus* la presencia de estos microorganismos en un franco estadio de reproducción, cuyo conteo en muestras de vinos de naranja obtenidos por fermentación a pH tanto 3,5 como 4,0 y a 10°C y 20°C produjo valores entre 2×10^5 y 5×10^5 células/mL para el mosto de jugo natural. En tanto para los productos del mosto de jugo pasteurizado el número de células/mL no superó 2×10^4 .

El comportamiento de *S. cerevisiae* fue más regular en ambos mostos para las dos temperaturas y pH, alcanzando recuentos del orden de 3×10^5 células/mL en todos los casos.

Durante el período de fermentación de los vinos de mosto de jugo natural de naranja no se observó la presencia de bacterias, y las especies de levaduras *non-Saccharomyces* fueron muy escasas lo que demuestra que la concentración de SO₂ utilizada (7,5 g/HL) fue eficiente para el control de microorganismos silvestres. Las muestras de vino fueron evaluadas microbiológicamente mediante cultivos en agar MRS, agar Carr y Pasmore con cicloheximida y agar YGC, para el aislamiento de bacterias del ácido láctico, del ácido acético y levaduras. Estas últimas se evaluaron taxonómicamente mediante kit ID 32 C, encontrándose predominio (78%) de levaduras del género de los cultivos iniciadores.

Las especies de *non-Saccharomyces* interfieren en la cinética de crecimiento y el metabolismo de *Saccharomyces* (Lema *et al.*, 1996). Sin embargo su presencia en un número bajo puede contribuir al flavor de los vinos terminados. Los resultados obtenidos reafirman la excelente cosecha de las dos especies inoculadas para la vinificación.

En el mosto de jugo concentrado, el comportamiento fue totalmente diferente para ambas levaduras y variables físicas estudiadas. El número de *S. cerevisiae* y *S. bayanus* fue escaso y su tamaño y falta de gemación hacen suponer que las levaduras no han salido de la fase *lag* de crecimiento.

Por último las observaciones microscópicas mostraron, en general, un mayor grado de contaminación bacteriana, particularmente cocos en vinos obtenidos a partir de mosto pasteurizado.

Los cocos Gram + fueron reconocidos mediante pruebas bioquímicas, como pertenecientes al género *Leuconostoc*, cuyas características son: células esféricas Gram +, inmóviles no esporógenas, crecimiento en colonias pequeñas sobre medio nutritivo con sacarosa, microaerófilicos o anaerobios facultativos, temperatura óptima de crecimiento 20°C-30°C (en el laboratorio se incubó a 25°C), fermentan glucosa con producción de ácido y gas (zimograma en caldo de peptona con el agregado de 2 % de glucosa), catalasa (-), no hidroliza la arginina, indol (-) y nitrato reductasa (-).

A fin de determinar las especies, se realizaron las siguientes pruebas de caracterización (Bergey's, 1994): formación de pigmento amarillo, fermentación de: L-arabinosa, fructosa, maltosa, melibiosa, salicina, sacarosa, trealosa,(en caldo de peptona con el agregado de los distintos azúcares en concentración del 2 %) formación de dextrán a partir de sacarosa, (caldo con 4 % de sacarosa) hidrólisis de esculina, crecimiento a pH 4,8 crecimiento con 10 % de etanol y crecimiento a 37°C. Por las características observadas se determinó que pertenecen a la especie *L. mesenteroides subsp. dextranicum* según Tabla 1.3.4. Es posible que la turbiedad presente en algunos vinos se deba a la producción de dextrano por esta bacteria.

En los vinos de mosto de jugo concentrado reconstituido la alteración microbiana se manifestó por un recuento elevado de cocos y bacilos y la presencia de una turbidez y consistencia mucilaginosas en las muestras tomadas inmediatamente después del primer trasiego por lo que se decidió no continuar con el proceso hasta la obtención del vino joven realizándose las correspondientes pruebas para detectar las causas de esta alteración.

Realizadas las pruebas de caracterización de las bacterias

encontradas, se determinó que las mismas pertenecían a la familia de las bacterias lácticas, (específicamente lactobacilos heterofermentativos y *Leuconostoc mesenteroides*) y *Acetobacter*.

Tabla 1.3.4.- Características diferenciales de subespecies de *L. mesenteroides*.

Leuconostoc mesenteroides

Características	Subsp. <i>cremoris</i>	Subsp. <i>dextranicum</i>	Subsp. <i>mesenteroides</i>
Pigmento amarillo	(-)	-	-
Ferm. L-arabinosa	-	-	+
Ferm. fructosa	-	+	+
Ferm. Maltosa	D	+	+
Ferm. melibiosa	D	+	+
Ferm. Salicina	-	d	(-)
Ferm. sacarosa	-	+	+
Ferm. trehalosa	-	+	+
Dextran de sacarosa	-	+	+
Hidrol. esculina	-	d	D
Crecim. pH: 4,8	-	-	-
Crecim. 10 % etanol	-	-	-
Crecim. 37°C	-	+	D

A la luz de estos resultados, se considera que el haber adoptado el criterio de disminuir la concentración de SO₂, en los mostos de jugo de naranja pasteurizado y concentrado reconstituido, imposibilitó controlar satisfactoriamente las contaminaciones microbianas de los productos obtenidos.

**CAPITULO 2:
MADURACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
QUÍMICA
Y MICROBIOLÓGICA DEL PRODUCTO
FINAL**

2.1.- INTRODUCCION

Con la finalidad de detectar los cambios químicos y/o biológicos producidos después del embotellado se procede al proceso de maduración de los vinos.

Según Varnam and Sutherland (1997) esta etapa se puede llevar a cabo en toneles durante seis meses para vinos blancos comunes. Sin embargo la maduración continúa tras el embotellado, pudiendo pasar muchos años antes que el vino alcance las mejores condiciones.

La duración del almacenamiento en las cubas suele ser, para los vinos de mesa aproximadamente de tres a seis meses. Es muy probable que durante el almacenamiento del vino hayan tenido lugar una serie de reacciones químicas en las que participen diversos componentes del vino tales como, el alcohol, los ácidos y los aldehídos (Vogt, 1971).

Los ensayos de estabilidad permiten revelar anticipadamente los riesgos de alteraciones microbianas o inestabilidad física (Ough, 1996), durante su transporte y comercialización.

Los ácidos orgánicos juegan un papel primordial en la estabilidad fisicoquímica y microbiológica, como así también en las propiedades sensoriales de los vinos (de Villiers *et al.*, 2003).

La técnica utilizada para determinar la estabilidad se basa en las modificaciones organolépticas (enturbiamientos, formación de velos y/o depósitos, cambios de color) presentados por el producto cuando es sometido a ciertas condiciones de aireación o de temperatura que pueden ser consecuencia de actividad enzimática y/o microbiana o cambios fisicoquímicos. Es necesario confirmar los resultados mediante examen microscópico, para verificar la naturaleza de la alteración producida.

2.2.- MATERIALES Y METODOS

Después del segundo trasiego se procedió al envasado e inmediato almacenamiento a dos temperaturas 10°C y 20°C. A esta etapa se la denominó "maduración o envejecimiento de los vinos de naranja".

El proceso de maduración se realizó directamente en las botellas, atendiendo a que el vino de naranja se puede considerar como un vino blanco, tipo de vino que se envejece en botellas y por un tiempo menor que los tintos (Ough, 1996). De este modo, el proceso oxidativo se ve disminuido para reducir las alteraciones, principalmente del color y del aroma (Aleixandre, 1997).

La maduración se realizó a dos temperaturas (10°C y 20°C), disponiendo las botellas en forma horizontal para permitir que el corcho se moje e hinche a los efectos de que la penetración de O₂ sea casi nula.

2.2.1.- Parámetros fisicoquímicos

Luego de 120 días de maduración se efectuaron todos los ensayos mencionados anteriormente además de los siguientes:

- Acidez Volátil: Método oficial I.N.V.
- Glicerol (Enzymatische BioAnalytik, Roche).
- SO₂ libre y total (Aleixandre y García 1996).
- Na, K, Mg y Ca (Standard Methods sección 3111)
- Acetato de Etilo, Acetaldehído, *n*-Propanol y Metanol: GC. Método adaptado en INTA Concordia. Longitud de columna: 30 m, ϕ interno: 25 mm. Carrier N₂ 43 cm/seg. Horno: 40°C, 5 min. 40-180°C a 30°C/min. Detector FID make up N₂ 30 mL/min.
- Diacetilo: Método de Hill *et al.* (1954), basado en la formación de un compuesto de color púrpura amarronado cuando reacciona el diacetilo con creatina en presencia de α -Naftol en condiciones alcalinas .La cuantificación se efectuó mediante la medida de A₅₃₀ en espectrofotómetro SHIMADZU UV.
- Acido Succínico: Enzymatische BioAnalytik, Roche.

2.2.2.- Ensayos de estabilidad.

Comprenden dos procedimientos: a) comportamiento al aire. b) comportamiento en estufa, en ambos casos según norma de OIV, y c) índice de amarronado.

2.2.2.1. Ensayo de comportamiento al aire.

Se tomaron muestras de 50 mL de cada uno de los vinos a ensayar. Las muestras fueron filtradas a través de papel de filtro grueso (de filtrado rápido) estéril, se colocaron en erlenmeyers estériles de 150 mL obturados con torundas de algodón y dejados a temperatura ambiente y a la luz medida en su máxima intensidad como 6.500 °K, durante 20 días. Se examinaron diariamente para verificar presencia de turbidez, velos o depósitos, y cambios en el color.

Las muestras que presentaron alguna anomalía se observaron al microscopio óptico utilizando aumentos de 400× y 1000×. Los resultados fueron registrados en planillas, una de las cuales se muestra a modo de ejemplo en la Tabla 2.2.1. Al finalizar el período previamente fijado se describieron las alteraciones de cada una de las muestras.

Tabla 2.2.1.- Planilla registro de ensayos de comportamiento al aire y a 30 °C.

Tiempo	Muestra	Temp.	Color	Turbidez	Depósito	Velo	Limpidez	Obs. Microsc.
...días	-	Amb.	*	+/-	+/-	+/-	+/-	**
...días	-	30°C	*	+/-	+/-	+/-	+/-	**
20 días	-	Amb.	*	+/-	+/-	+/-	+/-	**
20 días	-	30°C	*	+/-	+/-	+/-	+/-	**

(*) Registrar si hubo oscurecimiento. (**) Descripción de lo observado, acompañar con esquema.

2.2.2.2. Ensayo de comportamiento en estufa.

Muestras de 100 mL de cada vino de naranja, luego de filtradas a través de papel de filtro grueso estéril, se colocaron en erlenmeyers de 250 mL previamente esterilizados tapados con torundas de algodón se incubaron en estufa a 30°C. A partir de las 72 h de incubación se examinaron diariamente durante 20 días. Los cambios verificados en sus características, fueron registrados en planillas similares a las utilizadas para los ensayos de comportamiento al aire. Se realizaron además

exámenes microscópicos directos luego de centrifugar las muestras a 4000 rpm, 10 min. Con todos los datos obtenidos se realizaron las descripciones de los vinos ensayados.

Los datos de color se siguieron mediante la medida del índice de amarronado (A_{420}). La susceptibilidad al amarronado se determinó mediante métodos de aceleración del proceso basados en el aumento de temperatura y aireación (Palma and Garcia, 2002).

2.2.2.3. Índice de amarronado.

Medida de A_{420} en espectrofotómetro SHIMADZU UV.

2.3.- RESULTADOS Y DISCUSION

2.3.1.- Composición química de los vinos de naranja después de 120 días de almacenamiento a dos temperaturas.

Transcurridos los 120 días previamente programados para la maduración a las dos temperaturas se realizó un muestreo de los vinos para proceder a los ensayos fisicoquímicos.

2.3.1.1.- Glúcidos

Los azúcares reductores directos y totales experimentaron un aumento independientemente de la levadura, igual situación se verificó en la concentración de glucosa, mientras el contenido de fructosa prácticamente no sufrió variaciones relevantes durante esta etapa (Tabla 2.3.1 y 2.3.2.).

Esta variación se podría atribuir al sistema autolítico que se pone en evidencia en las levaduras sometidas a condiciones de estrés, lo cual conduce a la autodigestión de los diferentes componentes celulares. Una de las actividades hidrolíticas importantes está dada por las glucanasas, glicoproteínas capaces de hidrolizar los enlaces β -1,6-glucosídicos de los glucanos que constituyen la pared celular generando, entre otros compuestos, glucosa.

2.3.1.2.- Nitrógeno amínico

El nitrógeno amínico alcanzó valores superiores a los registrados en los vinos jóvenes, hecho que también puede atribuirse al proceso de autólisis, que se da cuando la célula de levadura pierde viabilidad y por lo tanto los sistemas selectivos que controlan la proteólisis endógena, dejan de actuar, de manera que todas las proteínas son susceptibles de degradación, iniciándose una proteólisis generalizada (Martinez *et al.*, 2001).

2.3.1.3.- Carotenoides

La concentración de carotenoides experimentó una disminución para todas las condiciones de trabajo, independientemente de la levadura utilizada. Fennema (2000) reportó que estas sustancias experimentan una autooxidación principalmente en presencia de sulfitos, iones metálicos y solventes orgánicos, por lo cual se puede inferir que los cambios registrados en estas sustancias se deben a reacciones puramente químicas.

Tabla 2.3.1.- Características fisicoquímicas de los vinos madurados elaborados con *S. bayanus*.

Vinos	Az reduct (g/100mL)	Az totales (g/100mL)	Glucosa (g/100mL)	Fructosa (g/100mL)	Nitrogeno (mg/100mL)	Aceite (µl/100mL)	Caroteno (mg/100mL)	Hesperidina (mg/100mL)
Sb3.5-10/10	0,46	0,51	0,019	0,350	3,60	2,90	0,015	4,51
Sb3.5-10/20	0,47	0,50	0,001	0,370	3,60	2,90	0,004	3,92
Sb3.5-20/10	0,25	0,25	0,025	0,090	5,19	4,50	0,002	3,87
Sb3.5-20/20	0,25	0,26	0,041	0,110	5,19	4,50	0,003	4,50
Sb4.0-10/10	0,26	0,26	0,039	0,038	5,05	2,90	0,002	5,88
Sb4.0-10/20	0,24	0,26	0,035	0,106	4,04	2,50	0,002	9,82
Sb4.0-20/10	0,25	0,25	0,048	0,146	5,77	2,80	0,007	14,06
Sb4.0-20/20	0,25	0,25	0,046	0,123	4,33	2,10	0,009	7,24
PSb3.5-10/10	0,43	0,43	0,012	0,240	5,19	4,50	0,010	7,29
PSb3.5-10/20	0,39	0,38	0,02	0,210	4,32	2,40	0,011	5,60
PSb3.5-20/10	0,34	0,37	0,045	0,100	5,33	2,48	0,028	6,00
PSb3.5-20/20	0,31	0,37	0,037	0,087	5,48	2,48	0,029	8,10
PSb4.0-10/10	0,53	0,57	0,045	0,560	4,04	1,65	0,033	13,35
PSb4.0-10/20	0,57	0,57	0,089	0,830	4,04	1,90	0,022	28,18
PSb4.0-20/10	0,11	0,10	0,039	0,120	4,90	1,65	0,017	13,65
PSb4.0-20/20	0,10	0,11	ND	0,090	5,19	1,90	0,018	3,35

2.3.1.4.- Hesperidina

La hesperidina, principal flavonoide de la naranja siguió disminuyendo en la fase líquida de los vinos elaborados a ambas temperaturas, mostos y levaduras usadas, durante el periodo de almacenamiento Sin embargo en todos los casos se encontró como precipitado en las borras.

2.3.1.5.- Aceites esenciales

El contenido de aceites esenciales para los vinos madurados a las dos temperaturas fue superior al de los vinos jóvenes. Entre las causas probables de esta situación se pueden mencionar:

1) La relacionada a la hidrólisis de los glucósidos terpénicos; ya sea ácida favorecida por el pH del vino o enzimática por parte de las levaduras del género *Saccharomyces* las cuales segregan una β -

glucosidasa durante la fermentación alcohólica (Suarez, 1997).

2) Los ácidos grasos insaturados constituyentes de la membrana citoplasmática de las levaduras principalmente de aquellas adaptadas al crecimiento y fermentación a bajas temperaturas (Torija *et al.*, 2002), los cuales probablemente son cuantificados junto con los aceites esenciales ya que el método utilizado se basa en la reactividad de los dobles enlaces

Tabla 2.3.2.- Características fisicoquímicas de los vinos madurados elaborados con *S. cerevisiae*.

Vinos	Az reduct (g/100mL)	Az totales (g/100mL)	Glucosa (g/100mL)	Fructosa (g/100mL)	Nitrogeno (mg/100mL)	Aceite (µl/100mL)	Caroteno (mg/100mL)	Hesperidina (mg/100mL)
Sc3.5-10/10	0,24	0,26	0,007	0,074	3,60	3,700	0,006	4,68
Sc3.5-10/20	0,23	0,25	0,014	0,050	3,60	1,700	0,004	3,66
Sc3.5-20/10	0,20	0,22	0,019	0,040	4,61	2,500	0,028	3,70
Sc3.5-20/20	0,19	0,19	0,000	0,062	4,90	2,900	0,030	4,87
Sc4.0-10/10	0,51	0,56	0,044	0,062	5,19	2,500	0,015	11,12
Sc4.0-10/20	0,50	0,51	0,050	0,596	5,19	2,100	0,017	15,82
Sc4.0-20/10	0,19	0,19	0,067	0,038	5,77	2,500	0,014	3,21
Sc4.0-20/20	0,13	0,13	0,050	0,076	5,19	2,100	0,016	8,18
PSc3.5-10/10	1,13	1,21	0,890	0,007	4,90	1,900	0,002	5,53
PSc3.5-10/20	1,21	1,14	0,024	1,4	4,90	2,890	0,001	4,43
PSc3.5-20/10	1,00	1,08	0,160	0,97	5,48	2,900	0,003	7,10
PSc3.5-20/20	1,08	1,08	0,100	0,71	5,77	2,890	0,003	6,20
PSc4.0-10/10	1,50	1,64	0,036	1,04	5,05	1,900	0,005	15,18
PSc4.0-10/20	1,58	1,62	0,068	1,71	5,05	3,360	0,004	27,71
PSc4.0-20/10	0,05	0,05	0,084	1,17	5,48	1,600	0,026	5,59
PSc4.0-20/20	0,05	0,05	0,140	0,86	5,77	1,900	0,021	15,88

2.3.1.6.- Metales

De los metales analizados, la concentración de Na en los vinos obtenidos a partir de mosto de jugo de naranja natural madurados a las dos temperaturas experimentó un leve incremento alcanzando valores de hasta 20 ppm. El K y el Mg se mantuvieron dentro de valores, entre 1900 y 2100 ppm para el primero y entre 140 y 170 para el segundo.

Es de destacar que estos cationes son algunas de las sustancias que se mantienen sin modificar durante el proceso de vinificación por lo cual muchos estudios toman estos elementos como buenos indicadores

del origen de los vinos (Kallithraka *et al.*, 2001).

En el caso del Ca la situación es diferente debido al agregado de CaCO_3 para el ajuste de pH de los mostos para permitir que la fermentación se llevara a cabo a este valor de pH.

2.3.1.7.- Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos son los principales responsables de la acidez total del vino y contribuyen a las características organolépticas finales, así como a la estabilidad biológica y fisicoquímica posterior.

Las concentraciones de los ácidos cítrico, málico y quínico de los vinos madurados disminuyeron con respecto a los valores registrados en los respectivos vinos jóvenes. Este resultado también es atribuible a reacciones químicas (Tablas 2.3.3 y 2.3.4).

2.3.1.7.1.- Ácido cítrico

Después de 120 días de almacenamiento, el contenido de ácido cítrico de los vinos de naranja fermentados con *S. bayanus* está en el rango aproximado de 5.000-11.000 mg/L mientras que para los vinos elaborados con *S. cerevisiae* el rango está comprendido entre 5.000-9.500 mg/L. En ambos casos los valores obtenidos fueron menores a los encontrados en vinos de kiwi en los que se reportan mínimos de 12.400 mg/L y máximos de 14.600 mg/L (Soufleros *et al.*, 2001).

2.3.1.7.2.- Ácido málico

Asimismo el contenido en ácido málico de los vinos de naranja está por debajo del límite inferior del contenido de este ácido en vinos de kiwi para los cuales se reportan concentraciones de 900 a 2.400 mg/L (Soufleros *et al.*, 2001).

2.3.1.7.3.- Ácido quínico

Resulta llamativo que el ácido quínico no se haya detectado en la mayoría de los vinos de naranjas después de 120 días de almacenamiento a 10°C y 20°C. Hasta el presente no se ha encontrado una explicación para este comportamiento.

2.3.1.7.4.- Acidez titulable

Se pudo observar una disminución en la acidez titulable de los vinos de naranja después de madurados, respecto de los valores obtenidos para los vinos jóvenes, independientemente de la levadura utilizada en la

vinificación. Aunque los valores son superiores a un vino de uva (0,4-0,7 g/100 mL expresado en ácido tartárico), son marcadamente inferiores (aproximadamente 50 %) a otros vinos cítricos como los de kiwi (Soufleros *et al.*, 2001).

Tabla 2.3.3.- Acidez titulable, pH y ácidos orgánicos de vinos madurados. *S. bayanus*.

Vinos	Acidez (%ácCit.Anh).	pH	Ac. Málico (mg/L)	Ac. Cítrico (mg/L)	Ac. Quínico (mg/L)	Vit C (mg/100mL)
Sb3.5-10/10	0,680	3,94	711	9338		65,83
Sb3.5-10/20	0,670	3,97	781	8257		64,81
Sb3.5-20/10	0,730	3,96	730	6991		41,50
Sb3.5-20/20	0,726	4,01	712	8273	574	40,55
Sb4.0-10/10	0,720	3,85		8191	517	59,66
Sb4.0-10/20	0,800	4,02	601	5532		55,55
Sb4.0-20/10	0,730	3,86		8938		45,26
Sb4.0-20/20	0,790	4,02		8058	558	46,29
PSb3.5-10/10	0,870	4,02		11000		45,41
PSb3.5-10/20	0,760	4,01		8970		41,15
PSb3.5-20/10	0,720	3,98		8120	1570	24,69
PSb3.5-20/20	0,720	3,99	1100	7240		21,60
PSb4.0-10/10	0,480	4,28	550	5770		27,27
PSb4.0-10/20	0,470	4,28		6240		25,72
PSb4.0-20/10	0,570	4,07	1480	6370		19,55
PSb4.0-20/20	0,560	4,10		6930	1560	16,46

2.3.1.7.5.- Ácido ascórbico

La concentración de ácido ascórbico en esta etapa es menor que la evaluada en los vinos jóvenes. Las levaduras utilizadas en la vinificación no influyeron en los valores registrados de vitamina C, evidenciándose por lo tanto el predominio de una acción química sobre la acción biológica.

Dentro de las reacciones químicas en la que interviene el ácido ascórbico cabe destacar las de pardeamiento que son influenciadas por el

tiempo y temperatura de almacenamiento (Rodríguez *et al.*, 1991).

Tabla 2.3.4.- Acidez titulable, pH y ácidos orgánicos de vinos madurados. *S. cerevisiae*.

Vinos	Acidez (%ác.Cit.Anh).	pH	Ac. Málico (mg/L)	Ac. Cítrico (mg/L)	Ac. Quínico (mg/L)	Vit C (mg/100mL)
Sc3.5-10/10	0,690	3,93		9538	1990	55,55
Sc3.5-10/20	0,685	3,94	688	6150	552	49,38
Sc3.5-20/10	0,759	3,99	948	8151	631	43,21
Sc3.5-20/20	0,710	3,99	965	8210	569	43,21
Sc4.0-10/10	0,634	3,95	817	8380		46,29
Sc4.0-10/20	0,650	4,13		8304	2846	44,23
Sc4.0-20/10	0,680	4,05		8468		35,26
Sc4.0-20/20	0,650	3,96		7142	1575	31,15
PSc3.5-10/10	0,690	4,04		8680		41,15
PSc3.5-10/20	0,700	4,00	770	9090		41,15
PSc3.5-20/10	0,740	4,02	730	6780		25,75
PSc3.5-20/20	0,750	4,02	1510	8360		24,69
PSc4.0-10/10	0,550	4,17	1100	5760		29,83
PSc4.0-10/20	0,540	4,16		6350		25,72
PSc4.0-20/10	0,610	4,07		6890	1000	19,63
PSc4.0-20/20	0,610	4,10	1390	7290		19,55

2.3.1.7.6.- Etanol

Durante el proceso de maduración el contenido en etanol varió en forma aleatoria, independientemente de la levadura utilizada para la fermentación. La temperatura de maduración tampoco influyó sobre esta característica. Sin embargo se pudo apreciar que los vinos elaborados a partir de mosto de jugo de naranja natural experimentaron una disminución de alcohol etílico durante el almacenamiento a ambas temperaturas (10°C y 20°C), mientras que los elaborados con mosto de jugo pasteurizado muestran un incremento en la concentración de este compuesto en iguales condiciones (Tablas 2.3.5 y 2.3.6).

La disminución se podría explicar por el conjunto de reacciones químicas que ocurren durante la maduración principalmente oxidación y esterificación, mientras que al leve incremento en los vinos de mosto de jugo pasteurizados no se le encontró una explicación efectiva, salvo por

el hecho de que se haya producido una refermentación atendiendo a que estos vinos presentaban mayor turbidez debido a la presencia de levaduras que probablemente aún conservaban algo de vitalidad, sobre todo la *S. bayanus* que es usada en la producción de champaña.

2.3.1.7.7.- Metanol

El metanol presente en los vinos, no procede de la fermentación sino que se produce por acción enzimática sobre las sustancias pécticas. Existe siempre en los vinos de uva en dosis que varía entre 36 y 350 mg/L (Ribéreau *et al.*, 1980). En los vinos de naranja elaborados con los distintos mostos y en todas las condiciones ensayadas, se encontró que la concentración de alcohol metílico está comprendida dentro de valores aceptables y en ningún caso ha superado el límite máximo mencionado (Tabla 2.3.5). No se hallaron diferencias con las levaduras manteniendo las otras dos condiciones de proceso, lo cual era de esperar ya que este analito no es un producto metabólico de las levaduras.

Revilla and Gonzalez (1998) reportaron niveles de metanol para vinos tintos obtenidos a partir de mostos tratados con enzimas pectinolíticas de hasta 90 mg/L. En vinos de kiwi con un procedimiento similar, Soufleros *et al.* (2001) hallaron concentraciones de alcohol metílico desde 485 a 768 mg/L.

Vidrih and Hribar (1999), trabajando con sidra, encontraron valores de metanol desde 28 mg/L hasta 180 mg/L. Se debe considerar que en la obtención de esta bebida hay una fase de maceración muy prolongada que influye sobre la actividad de la pectinesterasa.

Se debe destacar que ha sido práctica habitual encabezar los vinos con este alcohol, lo cual está mundialmente prohibido debido a su toxicidad. En este sentido es importante señalar que más que la concentración de metanol, es necesario controlar la relación metanol/etanol debido a que la causa de la toxicidad es la formación enzimática de formaldehído. En presencia de etanol la enzima alcohol deshidrogenasa cataliza la oxidación de éste, retrasando la formación de formaldehído.

En los vinos de naranja después del almacenamiento, esta relación está comprendida entre 3,4 y 12 partes de metanol por 100 partes de etanol.

Tabla 2.3.5.- Alcoholes y componentes volátiles de los vinos madurados. *S. bayanus*.

Vino	Etanol	Metanol	Glicerol	Diacetilo	Acetaldehído	Ac. Acético	Ac. de Etilo	n-propanol
	g/100mL	mg/L	g/L	(mg/L)	(mg/L)	(g/L)	(mg/L)	(mg/L)
Sb3.5-10/10	8,05	66,42	5,74	0,10	42,08	0,70	29,77	22,18
Sb3.5-10/20	7,16	75,15	3,81	0,10	35,78	0,63	23,16	25,80
Sb3.5-20/10	8,58	65,18	5,50	0,10	43,90	0,52	24,31	17,88
Sb3.5-20/20	8,04	69,07	5,03	0,08	38,24	0,52	27,24	17,37
Sb4.0-10/10	8,43	66,84	5,64	0,12	35,99	0,80	23,80	19,81
Sb4.0-10/20	8,02	77,12	5,75	0,09	43,66	0,59	24,92	40,86
Sb4.0-20/10	9,08	89,34	6,27	0,12	41,61	0,52	19,27	21,42
Sb4.0-20/20	7,94	54,73	6,14	0,10	29,05	0,49	21,63	17,96
PSb3.5-10/10	9,58	53,64	5,53	0,15	41,62	0,63	28,90	28,94
PSb3.5-10/20	8,94	42,72	7,50	0,09	44,46	0,59	28,28	28,89
PSb3.5-20/10	9,06	99,01	6,48	0,19	38,07	0,63	23,30	25,37
PSb3.5-20/20	8,53	93,08	4,37	0,10	32,32	0,59	14,37	27,97
PSb4.0-10/10	9,24	37,27	5,55	0,14	52,61	0,63	28,23	39,71
PSb4.0-10/20	8,91	65,23	5,59	0,10	51,83	0,63	24,05	40,15
PSb4.0-20/10	10,10	66,70	6,12	0,15	39,73	0,80	12,77	28,89
PSb4.0-20/20	10,02	78,90	5,51	0,11	44,49	0,77	23,31	30,67

2.3.1.8.- Productos secundarios de la fermentación alcohólica

Los principales productos secundarios de la fermentación alcohólica son la glicerina, ácido acético, sustancias acetoínicas y ácido succínico. Estudios microbiológicos tradicionales sobre el efecto de distintos parámetros en la síntesis de metabolitos están representados por la variación de un parámetro en el tiempo.

2.3.1.8.1.- Glicerol

Hay varios factores que influyen sobre la producción de glicerol por *S. cerevisiae*, tales como la cepa, el nivel de inóculo, la aireación, la temperatura, el contenido de azúcar y de SO₂ (Gardner *et al.*, 1993).

La degradación de fosfodihidroxiacetona produce alrededor de 2 a 3% de glicerol por fermentación del azúcar (Kocková, 1990).

Teniendo en cuenta que tanto el mosto de jugo natural de naranja como el de jugo pasteurizado fueron corregidos para alcanzar 20 °Brix la

concentración de glicerina esperada de acuerdo a lo expresado anteriormente es de 4 a 6 g/L. Como se puede observar en la Tablas 2.3.5 y 2.3.6, los niveles alcanzados se encuentran comprendidos entre 3,8 y 6,3 g/L para los vinos obtenidos con *S. bayanus* y entre 4 y 5,8 g/L para los elaborados con *S. cerevisiae*. En ambos casos, se detectaron excepciones, como es el de los vinos PSb-3,5-10-20 y PSb-3,5-20-10.

La influencia de la temperatura de incubación sobre la producción de glicerol, si bien manifiesta algunas excepciones, está de acuerdo a lo que se reporta en trabajos realizados en vinificación con *S. cerevisiae* (Gardner *et al.*, 1993) en el cual se obtienen los mayores niveles de glicerina a 20°C en condiciones anaerobias (Tabla 2.3.6).

Tabla 2.3.6.- Alcoholes y componentes volátiles de los vinos madurados. *S. cerevisiae*.

Vino	Etanol (g/100mL)	Metanol (mg/L)	Glicerol (g/L)	Diacetilo (mg/L)	Acetaldehido (mg/L)	Ac. Acético (g/L)	Ac. De Etilo (mg/L)	n-propanol (mg/L)
Sc3.5-10/10	5,99	23,13	4,93	0,09	27,23	0,63	8,97	11,31
Sc3.5-10/20	6,21	67,20	3,99	0,10	44,66	0,59	28,07	26,67
Sc3.5-20/10	7,03	78,62	5,01	0,10	50,96	0,73	27,90	20,61
Sc3.5-20/20	6,90	81,71	5,78	0,12	55,14	0,59	35,27	28,83
Sc4.0-10/10	8,10	76,49	5,53	0,10	34,75	0,42	34,14	21,48
Sc4.0-10/20	6,80	51,09	5,46	0,10	33,47	0,35	33,69	19,11
Sc4.0-20/10	7,03	66,84	4,79	0,10	45,45	0,42	20,91	16,74
Sc4.0-20/20	7,01	84,44	4,78	0,10	35,58	0,49	21,22	17,66
PSc3.5-10/10	7,89	54,50	4,71	0,12	41,02	0,42	25,19	17,18
PSc3.5-10/20	6,57	57,38	4,96	0,12	32,86	0,70	25,05	14,20
PSc3.5-20/10	8,63	68,40	7,52	0,10	45,38	0,42	17,10	16,92
PSc3.5-20/20	8,80	78,34	4,54	0,10	49,80	0,49	18,14	17,93
PSc4.0-10/10	7,60	26,40	5,02	0,10	28,12	0,42	23,68	12,97
PSc4.0-10/20	7,60	50,95	4,81	0,12	46,26	0,42	24,65	18,98
PSc4.0-20/10	9,64	59,60	5,53	0,18	53,98	0,42	20,95	17,71
PSc4.0-20/20	8,30	48,25	4,98	0,11	35,05	0,35	15,59	14,55

La diferencia en la producción de glicerol no fue muy marcada en las dos levaduras ensayadas. Ribéreau *et al.* (1980) reportaron que por cada 100 g de etanol deben producirse entre 6 y 10 g de glicerol. En los vinos de naranja, en todas las condiciones estudiadas, el promedio de

esta relación fue de 6,5 cuando se usó *S. bayanus* y de 7 cuando se usó *S. cerevisiae*.

El glicerol es un metabolito que actúa como factor osmoregulador cuando la presión osmótica del medio es muy alta (Meikle *et al.*, 1991). Su producción se ve incrementada por efecto del SO₂. Las cepas de levaduras juegan un papel muy importante en la producción de glicerol y otros componentes del flavor (Lubbers *et al.*, 2001).

La formación de glicerol por *S. cerevisiae* está fuertemente influenciada por la limitación en nitrógeno cuando esta levadura crece en condiciones de anaerobiosis. (Lidén *et al.*, 1995). Se debe recordar que los mostos de naranjas poseen relativamente bajos tenores de nitrógeno asimilable y que además no han sido adicionados con una fuente externa.

El contenido en glicerol de distintos vinos es muy variable. En USA se han reportado rangos tan amplios como 1,9 a 14,7 g/L con una media de 6,5 g/L. Reynolds *et al.*, (2001b) encontró valores entre 4,8 y 5,4 g/L para distintas cepas de *S. cerevisiae*, y según Noble and Bursick (1984) aún esas pequeñas diferencias afectan la percepción en el dulzor de los vinos.

2.3.1.8.2.- Sustancias acetoínicas

Las sustancias acetoínicas están siempre presentes en el vino, participan en las características organolépticas, y a determinadas concentraciones perjudican su bouquet y aroma. La acetoína puede formarse a partir del ácido pirúvico por algunas especies de levaduras, mientras que el diacetilo lo forman particularmente bacterias heterolácticas. (Suarez e Iñigo, 1992).

La concentración de 2,3-butanodiol y acetoína es muy importante por ser ambos, metabolitos de la fermentación alcohólica por levaduras vínicas y pueden afectar el bouquet y cuerpo de los vinos (Romano *et al.*, 2003). En este trabajo no han sido cuantificados.

Sin embargo, atendiendo a la probable existencia de diacetilo en jugos de naranja alterados, principalmente por la contaminación con bacterias del ácido láctico, que pudieron subsistir durante la fermentación, fueron cuantificadas en los vinos elaborados con mostos de jugo de naranja.

Es de hacer notar que si bien a partir de acetoína por reducción se

forma 2,3-butanodiol; por oxidación se produce diacetilo. Luego todos los compuestos cetónicos siempre se encuentran en los vinos (Aleixandre, 1999).

No obstante las cantidades de diacetilo encontradas en los vinos de naranja fueron extremadamente bajas ($< 0,2$ mg/L), por lo tanto es factible aseverar que no hubo alteración bacteriana, sino que el mismo proviene sólo de la bioquímica de la fermentación alcohólica.

2.3.1.8.3.- Acetaldehído

El acetaldehído se forma en la vía EMP pero inmediatamente se reduce a etanol por la enzima alcohol-deshidrogenasa en medio moderadamente ácido, por el contrario en medio ligeramente alcalino se invierte la reacción (Bruchmann, 1980).

Su formación transcurre bien por descarboxilación del ácido pirúvico e incorporación de CoA, o de forma simultánea a la formación de ácido fórmico, también a partir de ácido pirúvico y CoA; siendo el primer mecanismo el más unánimemente aceptado (Suárez, 2002).

En los vinos de naranja cuyo procesamiento se llevó a cabo a pH ácido (3,5 y 4,0) la concentración de acetaldehído fue baja, su proporción con respecto al etanol está comprendida entre 0,036 y 0,045 g de acetaldehído por cada 100 g de etanol para los vinos fermentados con *S. bayanus* y entre 0,04 y 0,08 cuando en los vinos elaborados con *S. cerevisiae*. En este último caso el intervalo es más amplio porque la graduación alcohólica obtenida con esta levadura es inferior.

La relación encontrada es del mismo orden de magnitud que la hallada por Antonelli *et al.* (1999) en la cual también se encontraron mayores valores para vinos obtenidos con *S. cerevisiae*.

En vinos de uva a 5 °Bé, se ha reportado un contenido de acetaldehído de 45 mg/L mientras para sidras obtenidas de jugo de manzana y pulpa de manzanas el valor fue de alrededor de 20 mg/L (Polychroniadou *et al.*, 2003). En los vinos de naranja los contenidos fluctúan entre estos valores dependiendo de los mostos y condiciones de elaboración, alcanzando en algunos casos, concentraciones superiores a 45 mg/L.

2.3.1.8.4.- Ácido succínico

En la etapa posterior a la maduración también se determinó la concentración de ácido succínico por ser un metabolito importante de la fermentación alcohólica por levaduras. Siempre está presente en los vinos y le transmite a estos el típico sabor entre salado y amargo que caracteriza a las bebidas fermentadas. Procede de la carboxilación del ácido pirúvico y posteriores reacciones redox (Mesas y Alegre, 1999; Suárez e Iñigo, 1992).

El ácido succínico es producido por las levaduras durante la fermentación alcohólica, ya sea a partir del malato por vía fumarato o a partir del 2-oxoglutarato por la intervención de la enzima 2-oxoglutarato deshidrogenasa (Reynolds *et al.*, 2001). En vinos de uva se han reportado valores de 0,5 g/L, en tanto en vinos de kiwi se reportan tenores comprendidos entre 0,80-0,85 g/L (Soufleros *et al.*, 2001).

En los vinos de naranja elaborados con *S. bayanus* el rango de concentración determinada fue de 0,13 a 0,23 g/L, mientras que en los vinos provenientes de la fermentación por *S. cerevisiae* el rango fue de 0,14 a 0,18 g/L.

2.3.1.8.5.- Ácido acético

El ácido acético siempre acompaña a la fermentación alcohólica siendo este ácido y su principal éster, el acetato de etilo, elementos negativos en la apreciación sensorial de cualquier vino especialmente cuando éste último supera la concentración de 160 mg/L. Se ha encontrado que algunas levaduras fermentativas tales como, *Kloeckera spp.*, *Hanseniaspora spp.*, *Candida spp.* y otras de metabolismo aeróbico tales como *Hansenula spp.* y *Pichia spp.* intervienen en la formación de esto compuestos.

La producción de ácido acético por *Saccharomyces* suele variar entre 100 y 200 mg/L, dependiendo de la cepa, la temperatura de fermentación y la composición del mosto (Boulton *et al.*, 1996).

La presencia del ácido acético también puede deberse a la acción bacteriana. Durante la fermentación se forma acetato de etilo y otros esteres volátiles.

Los niveles de ácido acético encontrados en todos los vinos de naranja después de 120 días de almacenamiento son los informados en las Tablas 2.3.5 y 2.3.6 en las cuales se puede observar que los valores

están por debajo del límite comúnmente aceptado para un vino blanco (2 g/L CAA Art. 1104, 1999). La CEE establece un límite de 0,8 g/L.

En general los vinos de naranja elaborados con *S. cerevisiae* arrojaron valores de ácido acético inferiores a los elaborados con *S. bayanus* independientemente de los demás factores o parámetros considerados (pH, mosto, temperatura). Muchos estudios han reportado grandes diferencias entre levaduras en términos de su producción de ácido acético durante la vinificación (Moreno *et al.*, 1991). Obisanya *et al.* (1987) encontraron para vinos de kiwi valores de acidez volátil, expresada como ácido acético, comprendida entre 1,1 y 1,4 g/L.

2.3.1.8.6.- Acetato de etilo

La producción de éster durante la fermentación alcohólica está estrechamente relacionada con la especie de levadura involucrada. Es conocido que la concentración de ésteres depende del balance entre su síntesis y su hidrólisis llevada a cabo por la alcohol acetil transferasa y la éster hidrolasa respectivamente (Inove *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 1998; Plata *et al.*, 2000; Mallouchos *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que cuando en la fermentación predomina *S. cerevisiae*, los niveles de acetato de etilo producido son inferiores a los reportados cuando actúan *non Saccharomyces* tales como *Pichia anomala* y *Hanseniaspora guilliermondii*.

En cultivos mixtos, *S. cerevisiae* contribuye en bajar el contenido de acetato de etilo y lograr una mejora del bouquet del vino (Rojas *et al.*, 2003). Además cabe considerar que durante el almacenamiento en botellas también se produce una disminución de este compuesto (Rojas *et al.*, 2003). Cuando el contenido de acetato de etilo excede los 200 mg/L aparecen características organolépticas originales típicas de una fermentación acética (Rodríguez *et al.*, 1991).

Si bien la elaboración del vino de naranja se realiza mediante inoculación con dos levaduras del género *Saccharomyces*, sobre mosto previamente sulfitado, se debe tener en cuenta que del jugo de naranja se han aislado varias especies de levaduras de los géneros *Candida*, *Kloeckera*, *Criptococcus*, *Trichosporun* y *Rhodotorula* por lo cual es posible la contribución de las mismas al desarrollo de distintos metabolitos. Algunos estudios han demostrado que levaduras *non-Saccharomyces spp.* sobreviven durante la fermentación, ya sea natural o

inoculada de jugo de uva por largos períodos antes de inactivarse por el aumento en la concentración de etanol (Ciani, 1997). Zohre and Erten (2002) estudiaron la influencia de *K. apiculata* y *C. pulcherrima* sobre la fermentación vínica y observaron que aún en vinificaciones realizadas por inoculación con levaduras vínicas, las *non-Saccharomyces* sobreviven más de lo esperado produciendo altos niveles de acetato de etilo.

Ougt (1996) reporta valores medios correspondientes al análisis de 800 muestras de vino de 56,4 mg/L de este analito. En los vinos de naranja elaborados con las dos levaduras y en todas las condiciones estudiadas está muy por debajo de esta cantidad (Tablas 2.3.5 y 2.3.6).

En sidras tanto de jugo como de pulpa de manzanas no se detectó su presencia a 5 °Bé, pero para la misma graduación en vino de uva arrojó valores de 75 mg/L. (Polychroniadou *et al.*, 2003).

2.3.1.8.7.- Alcoholes superiores

Los alcoholes superiores pueden tener su origen en la fruta, pero la mayoría se forma predominantemente durante la fermentación por la actividad metabólica de la levadura.

El metabolismo de los compuestos nitrogenados y del azufre, rinden otros metabolitos volátiles y no volátiles, los cuales colectivamente contribuyen al aroma y sabor de los vinos. Estos incluyen: alcoholes superiores, ésteres, ácidos orgánicos, aldehídos y cetonas, SH₂ y SO₂.

Las concentraciones relativas de estos compuestos dependen de la cepa de levadura empleada y de las condiciones de fermentación, especialmente la temperatura. La fermentación de los vinos blancos se conduce generalmente a 10°C - 18°C (por 7 - 14 días) y la de los vinos rojos a 20°C - 30°C (alrededor de 7 días) (Enciclopedia de Microbiología de Alimentos, Academic Press, 1999).

Vidrih and Hribar (1999) reportaron que cuando mayor es la conversión de azúcar durante la fermentación en sidra, se producen mayor cantidad de alcoholes superiores. Estos ayudan a la clarificación del producto final.

Ubeda *et al.* (2000) estudiaron el comportamiento de distintas cepas de *Saccharomyces* para la elaboración de vinos blancos por dos

metodologías: inoculación directa e inoculación con pie de cuba. Los resultados que ellos hallaron para *Saccharomyces bayanus* y *Saccharomyces cerevisiae*, con pie de cuba en lo que se refiere a metabolitos volátiles tales como acetaldehído, acetato de etilo, metanol y *n*-propanol son similares a los encontrados en los vinos de naranja elaborados con la misma metodología usando *S. cerevisiae* y *S. bayanus*.

El *n*-propanol se puede formar vía anabólica a partir de sacáridos, o por vía catabólica en el proceso de conversión de aminoácidos exógenos. La síntesis y proporción de esta sustancia es el resultado de muchos factores tales como cantidad y calidad de compuestos nitrogenados en el medio, temperatura y características de las cepas de levaduras (Kocková, 1990). En *S. cerevisiae* es un producto derivado del metabolismo del aminoácido treonina (Vidrih y Hribar, 1999). Estos autores reportan para sidra, valores entre 13 y 18 mg/L, valores similares a los encontrados en vinos de naranja elaborados con *S. cerevisiae* (10-20 mg/L), pero inferiores a los elaborados con *S. bayanus* (20-40 mg/L).

Otros autores que analizan metabolitos volátiles en vinos de uva y en sidra a partir de jugo de manzana y a partir de pulpa de manzana, encontraron, que a 5 °Bé (9 °Brix) los valores fueron de 38 mg/L para vino y 30 mg/L para sidra de jugo de manzana, mientras que para la sidra de pulpa de manzana fue de casi 20 mg/L.

Es de hacer notar que la fermentación se llevó a cabo a 30°C sin ajuste de pH en ninguno de los ensayos (Polychroniadou *et al.*, 2003). Soufleros *et al.* (2001) reportan para vinos de kiwi contenidos entre 14 y 53 mg/L de *n*-propanol.

2.3.1.8.8.- SO₂ libre y combinado

Las dosis de SO₂ libre recomendadas para los vinos comunes secos es de 20 a 30 mg/L y las dosis en botella para los mismos vinos es de 30mg/L (Menegazzo, 1978; Kolb, 2002). Para vinos blancos dulces, se recomienda 60-100 mg/L y 50-60 mg/L respectivamente. En cuanto al SO₂ Total, para vinos denominados de CALIDAD, las cantidades máximas que puede tener un vino blanco seco es 200 mg/L (Aleixandre, 1999).

Los niveles de SO₂ libre y combinado determinados en los vinos de naranja se muestran en las Figuras 2.3.1 y 2.3.2, respectivamente.

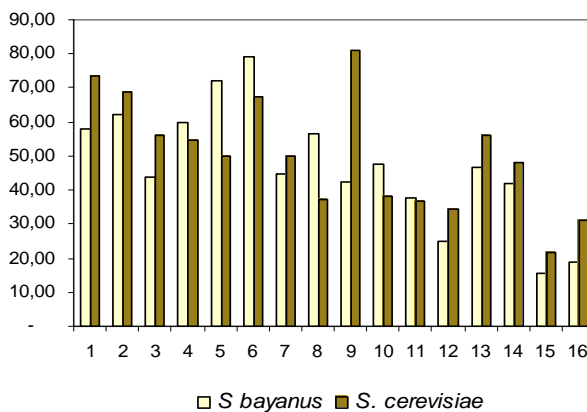


Figura 2.3.1.- SO₂ Total (mg/L) en vinos de naranja almacenados durante 120 días.

Referencias:

- | | |
|--------------------------|------------------------------|
| 1 Sb3.5-10/1 Sc3.5-10/10 | 9 PSb3.5-10/10 PSc3.5-10/10 |
| 2 Sb3.5-10/2 Sc3.5-10/20 | 10 PSb3.5-10/20 PSc3.5-10/20 |
| 3 Sb3.5-20/1 Sc3.5-20/10 | 11 PSb3.5-20/10 PSc3.5-20/10 |
| 4 Sb3.5-20/2 Sc3.5-20/20 | 12 PSb3.5-20/20 PSc3.5-20/20 |
| 5 Sb4.0-10/1 Sc4.0-10/10 | 13 PSb4.0-10/10 PSc4.0-10/10 |
| 6 Sb4.0-10/2 Sc4.0-10/20 | 14 PSb4.0-10/20 PSc4.0-10/20 |
| 7 Sb4.0-20/1 Sc4.0-20/10 | 15 PSb4.0-20/10 PSc4.0-20/10 |
| 8 Sb4.0-20/2 Sc4.0-20/20 | 16 PSb4.0-20/20 PSc4.0-20/20 |

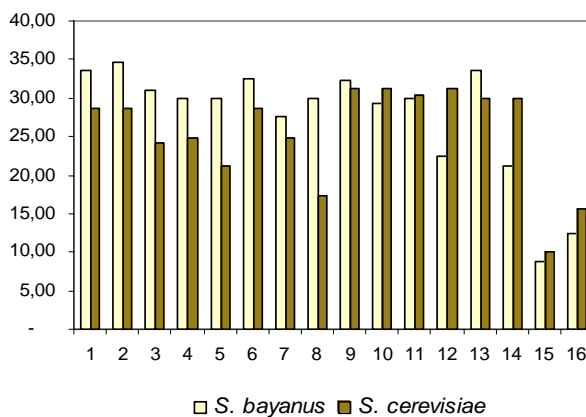


Figura 2.3.2.- SO₂ Libre (mg/L) en vinos de naranja almacenados durante 120 días.

En las mismas se puede observar que, salvo en los PSb -4,0-20 y PSc-4,0-20 madurados a 10°C y 20°C, el resto de los vinos tiene una concentración de SO₂ libre que está comprendida en los límites previamente establecidos. En cuanto al SO₂ total ninguno de los vinos de naranja supera los 80 mg/L.

Por otra parte es de destacar que cuando los vinos se elaboraron con *S. bayanus* los niveles de SO₂ libre fueron superiores que en aquellos vinos fermentados con *S. cerevisiae* en las mismas condiciones, particularmente en los obtenidos a partir de mostos de jugo de naranja natural.

Si se tiene en cuenta que los vinos de naranja obtenidos con *S. cerevisiae* tienen una graduación alcohólica menor, se podría inferir que esta levadura es más sensible a la acción antiséptica del SO₂.

Es importante destacar que el SO₂ no sólo proviene del agregado sino que también las levaduras pueden formarlo para reducirlo a SH₂ a fin de sintetizar los aminoácidos cisteína, serina y metionina, particularmente cuando la fermentación se efectúa en un medio con bajas concentraciones de nitrógeno como es el caso del mosto de naranja. La necesidad de las levaduras de sintetizar aminoácidos azufrados las obliga a reducir los iones SO₄²⁻ a H₂S pasando por los iones SO₃²⁻ (Alexandre, 1999).

2.3.2.- Estabilidad de los vinos de naranja

La disminución de vida útil de los vinos se considera un hecho concerniente principalmente a problemas causados por distintas bacterias y levaduras, pero en los vinos jóvenes está directamente relacionado con su resistencia a la oxidación (Escudero *et al.*, 2002).

Es de gran interés industrial la determinación del fenómeno de empardeamiento de vinos almacenados. Es sabido que las condiciones ambientales bajo las cuales se conserva un vino blanco embotellado juega un papel muy importante en su estabilidad frente a fenómenos degradativos. En este aspecto se destaca el conocido con el nombre de pardeamiento. Este proceso que se traduce visualmente en una evolución del color hacia los tonos pardos y cambio en el aroma del mismo se ve acelerado por las condiciones ambientales de conservación, tales como temperatura, humedad e iluminación (Castro *et al.*, 1999).

2.3.2.1.- Ensayo de comportamiento al aire

De los vinos elaborados con mosto de jugo natural, sólo la muestra correspondiente al Sb-3.5-20-20 se observó con aspecto velado a los 20 días de permanencia en contacto con el aire. La observación microscópica demostró la presencia de levaduras, por lo cual se realizó la prueba de tinción vital con el fin de determinar el estadio celular, comprobándose que las mismas se encontraban en estado de germinación. Estas levaduras podrían provocar refermentaciones en el vino si hubiera azúcares residuales (Vogt, 1971).

Las muestras correspondientes a los vinos Sb-3.5-10-10, Sb-3.5-20-10 y Sb-4.0-20-10, aparecieron veladas los primeros 10 días de exposición al aire, sin embargo a medida que transcurrió el tiempo acercándose a los 20 días aparecieron límpidas y con un leve depósito, el cual se analizó microscópicamente, observándose en los dos primeros, cristales en forma de aguja (se presume de hesperidina), células de levaduras en gemación y agregados amorfos de coloración amarilla (probablemente de carotenoides). En la Figura 2.3.3 se muestra un ejemplo de observación microscópica de sedimento de un vino de naranja madurado a 10 °C.

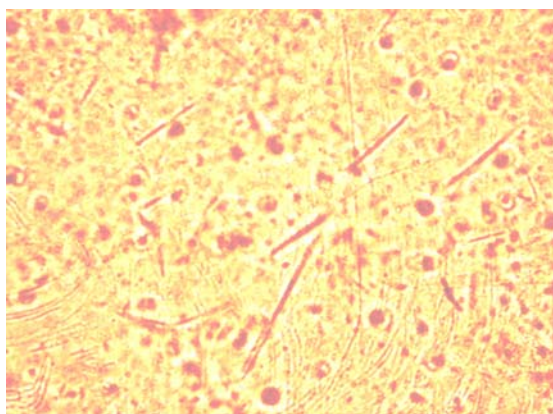


Figura 2.3.3.- Microfotografía de sedimento del vino de naranja Sb-3.5-10-10.

En el vino Sb-4.0-20-10 se observaron además cristales cuya morfología hace suponer que se trata de CaCO_3 , que fuera usado para el ajuste de pH.

Las muestras de los vinos Sc-4.0-10-10, Sc-4.0-10-20, Sc-4-20-

10 Sc-4.0-20-20, y las correspondientes a la misma levadura, con la misma combinación de temperaturas de fermentación y de maduración pero a pH 3,5, no presentaron velo a lo largo del ensayo.

Finalizado el mismo se observaron finas películas en el fondo de los erlenmeyers, las cuales analizadas al microscopio indicaban abundancia de cristales, y en menor medida sustancias amorfas; las pocas levaduras que aparecían eran de muy pequeño tamaño y con brotación escasa.

En cuanto a los vinos elaborados con mosto de jugo de naranja pasteurizado, las muestras correspondientes a los vinos PSb-3.5-10-10, PSb-3.5-20-10, PSb-3.5-10-20 y PSb-3.5-20-20, mostraron un aspecto velado, finalizado el período de permanencia al aire, registrándose mediante la prueba de tinción vital un número considerable de levaduras en franca reproducción y cuyo tamaño medio fue de $6.0 \times 4.0 \mu\text{m}$ (Fig. 2.3.4).

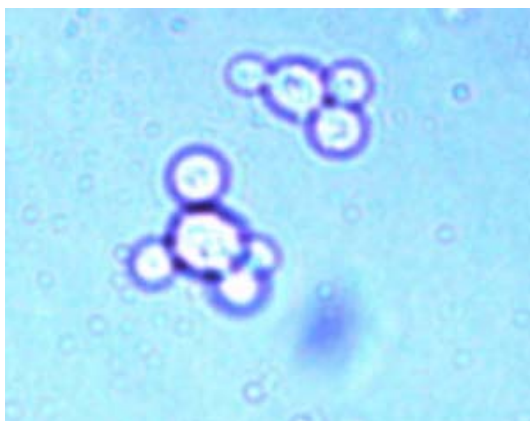


Figura 2.3.4.- Microfotografía *S. bayanus*, proveniente de vinos elaborados con mostos de jugo de naranja pasteurizado (1000×)

Es de hacer notar que estos vinos al momento del muestreo presentaban un gran burbujeo, lo cual indicaría un proceso de refermentación. Al igual que ocurriera con los vinos preparados con mosto de jugo natural de naranjas, algunos de los que se elaboraron con mosto de jugo pasteurizado, presentaron lo que se denomina velo en los primeros días de exposición al aire, comprobándose que a los 20 días ellos se presentaban completamente límpidos y con un depósito más o

menos abundante, tal es el caso de las muestras de los vinos PSc-4.0-10-10, PSc-4.0-10-20, PSc-4.0-20-10, PSc-4.0-20-20, PSc-3.5-10-10, PSc- 3.5-10-20.

Del análisis microscópicos de los depósitos se deduce que éstos se formaron principalmente de cristales de hesperidina, como de ciertas sustancias amorfas que podrían deberse a la autólisis de las levaduras, ya que la tinción vital demostró muy pocas levaduras en crecimiento, pero sí muchas células cuyas vacuolas abarcaban casi todo el protoplasma (Fig. 2.3.5).

Durante la autólisis se producen importantes cambios químicos y morfológicos en las células debidos a la participación de diversos enzimas. Una de las consecuencias de esta actividad enzimática, es la formación de poros en la pared celular de un tamaño suficiente para que puedan pasar al ambiente extracelular un gran número de compuestos y enzimas (Martínez *et al.*, 2001).

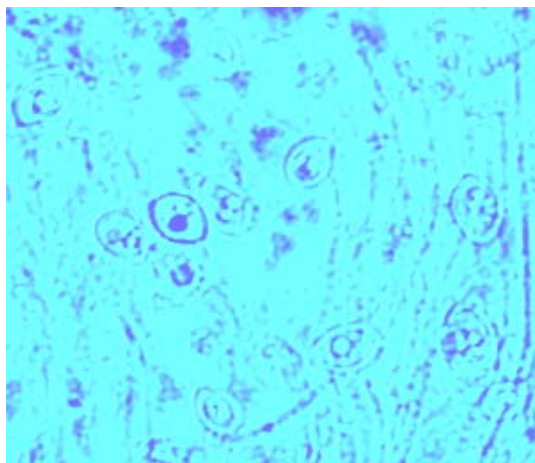


Figura 2.3.5. –Microfotografía de células de levaduras observadas en sedimentos de vinos de naranja (1000×).

En el caso de los vinos fermentados a pH 4.0 en los depósitos aparecieron cristales de CaCO_3 (Fig. 2.3.6.).

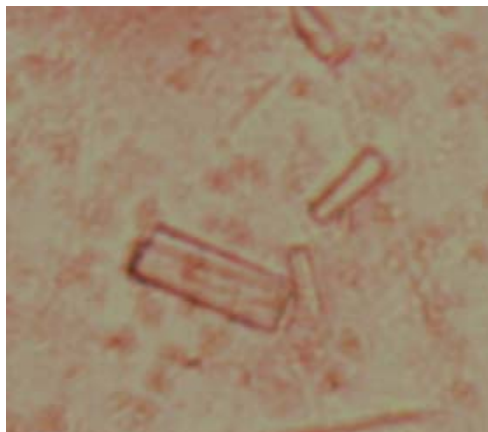


Figura 2.3.6.- Microfotografía de vinos de naranja a partir de mostos de pH: 4,0.

Los vinos de naranja expuestos al aire durante 20 días presentaron un ligero oscurecimiento independiente de las condiciones de fermentación y maduración.

Los resultados anteriores demuestran que es factible una clarificación espontánea del vino de naranja durante el periodo de maduración. Este fenómeno natural evitaría tener que llevar a cabo algún otro procedimiento de clarificación inducida, ya sea mediante el agregado de agentes clarificantes, o bien mediante filtración. Sin embargo, la clarificación espontánea del vino de naranja embotellado presenta el inconveniente de la formación de un sedimento en la botella, con la consiguiente pérdida en el aspecto del producto. Esta circunstancia origina dos alternativas: a) recurrir a la clarificación inducida previo al embotellado, o b) aprovechar el fenómeno de clarificación espontánea en botella para incluirlo como etapa en la elaboración de una bebida espumante por fermentación secundaria. Ambas alternativas serán motivo de estudios posteriores.

2.3.2.2.- Ensayo de comportamiento en estufa.

En este ensayo todos los vinos de naranja exhibieron idéntico aspecto, al los que se observaron en el ensayo anterior. Es decir, aquellos que presentaron un aspecto velado hacia el final del período de permanencia al aire a temperatura ambiente, se comportaron de igual forma cuando se incubaron aeróbicamente a 30°C y los que se describieron como límpidos, con la presencia o no de depósito, también

mostraron las mismas características al permanecer a mayor temperatura aún en períodos más cortos.

2.3.2.3.- Índice de amarronado.

La diferencia más notoria se vio en el color, ya que los vinos que permanecieron 20 días a 30°C sufrieron un oscurecimiento más marcado que los que lo hicieron durante el mismo período, pero a temperatura ambiente (no superior a 20°C y en algunos días muy por debajo de este valor). Esto se percibió en forma visual y se corroboró por la medida de índice de amarronado que arrojó valores medios de $A_{420} = 0,400$ para vinos de mosto de jugo pasteurizado y $A_{420} = 0,350$ para vinos de mosto de jugo natural (Fig. 2.3.7).

De acuerdo a Selli *et al.* (2002), estos índices se ven afectados no sólo por el tiempo de almacenamiento sino por el color del envase que permite la transmisión de luz de baja longitud de onda por ende de alta energía que favorecen reacciones químicas de oscurecimiento, tal como la oxidación del ácido ascórbico. Es de hacer notar que el ensayo se hizo en aerobiosis lo cual potencia estas reacciones.

Teniendo en cuenta los resultados de ambos ensayos se podría concluir que la inestabilidad de los vinos fue de carácter predominantemente fisicoquímico debido a los componentes de los mostos y sustancias que se formaron durante la fermentación alcohólica, que en algunos casos precipitaron y otros experimentaron oxidaciones, procesos que se aceleraron e intensificaron con el aumento de temperatura.

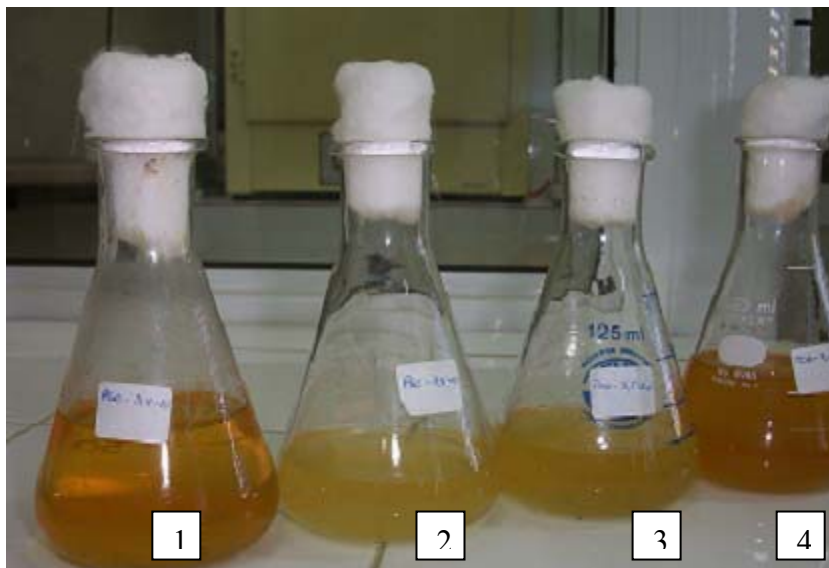


Figura 2.3.7.- Diferencias en el color de los vinos de naranja según la temperatura de ensayo de estabilidad. 1) 30 °C PSc 3,5-20 ,2) Temp. amb. PSc 3,5-20, 3) Temp. amb. Sc 3,5-20 4) 30 °C Sc3,5-20.

En cuanto a las alteraciones microbiológicas, sólo se detectaron aquellas debidas a la presencia de levaduras, que en esta etapa del proceso si no se eliminan ellas y los componentes derivados de las mismas, constituirán un serio problema en etapas posteriores, por lo cual se hace necesario prever un buen sistema de clarificación y filtración como parte del proceso de fabricación de vinos de naranja. Lo ideal es hacer un encolado, seguido del filtrado para asegurar la limpidez y estabilidad (Aleixandre, 1999).

**CAPITULO 3:
DISEÑO EXPERIMENTAL DE
LAS COMBINACIONES
DE VARIABLES**

3.1.- INTRODUCCION

Una de las técnicas más eficientes para el análisis de los procesos es la aplicación de un diseño estadístico experimental. Esta metodología tiene la particularidad de determinar la influencia e importancia de los parámetros estudiados y las interacciones entre estos con un mínimo de ensayos. Esto último contrasta con la metodología clásica, que consiste en hacer variar cada factor manteniendo los demás constantes, lo cual conduce por una parte a un número considerable de experiencias y por otra a ignorar la interacción que pudiera existir entre los factores considerados (Dreyer *et al.*, 2000).

A los efectos de analizar el comportamiento de las dos levaduras usadas en la vinificación de mosto de jugo de naranja, frente a las variables del proceso, temperatura de fermentación (10°C y 20°C), pH (3,5 y 4,0), temperatura de maduración (10°C y 20°C) y tipo de mosto (jugo natural y jugo pasteurizado) se aplicó un diseño experimental estadístico del tipo factorial equilibrado 2^k , resultando 16 ensayos para cada inóculo.

Este diseño permite estudiar la influencia de las variables de proceso de vinificación a los dos niveles mencionados, sobre el comportamiento de *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, determinar los efectos simples de cada variable y sus interacciones. a los fines de obtener un vino de naranja con una graduación alcohólica relativamente baja (no mayor de 8 g/100 mL) y una concentración de azúcares remanentes que lo tornen menos secos y con características sávido-aromáticas agradables.

3.2.- MATERIALES Y METODOS

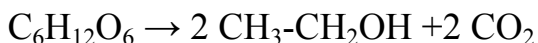
Para los experimentos se aplicó un Diseño Estadístico Experimental (factorial completo del tipo 2^k) (Saderra i Jorba, 1993) considerando dos temperaturas de trabajo (18°C-20°C de un ambiente en subsuelo y 10°C de una cámara fría) (Vogt, 1972), dos pHs 3,3-3,4 (el propio del jugo de naranja) y 4,0 (obtenido por ajuste con solución alcalina), los dos cultivos microbianos y dos temperaturas de maduración (10°C y 20°C). Este diseño originó 16 ensayos por cada mosto. Las respuestas estudiadas fueron, producción de etanol, glicerol, acetaldehído, acetato de etilo y el consumo de glúcidos.

Los datos experimentales se analizaron con el paquete estadístico Statgraphics Plus versión 3.0.

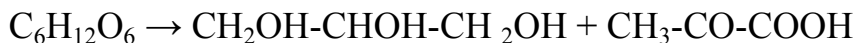
3.3.- RESULTADOS Y DISCUSION

Para la aplicación del diseño factorial se usaron como respuesta, la producción de etanol, glicerol, acetaldehído, acetato de etilo y el consumo de glúcidos.

Según la ecuación de Gay- Lussac la fermentación alcohólica procede así:



Sin embargo, no todas las moléculas de glucosa son transformadas de esa manera ya que la fermentación gliceropirúvica degrada un cierto número de ellas como indica la ecuación de Neüberg:



El ácido pirúvico es descarboxilado a acetaldehído el cual puede no experimentar la reducción a etanol siendo el origen de diferentes productos secundarios tal como el acetato de etilo.

Por esta razón para analizar el comportamiento de los cultivos se seleccionaron como respuesta el consumo de azúcar y la producción de los metabolitos mencionados, a través del diseño experimental.

En las Tablas 3.3.1 y 3.3.2 se muestran las Matrices de diseño del modelo y las respuestas de los 16 ensayos con cada una de las levaduras. Para cada respuesta se realizó el ensayo de ANOVA con un nivel de confianza del 95 %.

Las levaduras utilizan los azúcares fermentescibles metabolizándolos por la ruta glicolítica EMP, hasta piruvato. Bajo condiciones anaeróbicas las levaduras descarboxilan el piruvato en una reacción catalizada por piruvato-descarboxilasa con producción de acetaldehído y CO₂. La etapa final de la fermentación alcohólica es catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa, e involucra la reducción

por la coenzima NADH resultando la reducción de acetaldehído a etanol.

Tabla 3.3.1: Matriz de diseño para vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

Ensayos Vinos	T° C Ferm.	pH	T° C Mad.	Mosto	Etanol (g/100mL)	Glicerol (g/L)	Acetaldehído (mg/L)	Ac. de Etilo (mg/L)	Az.Tot. (g/100mL)
PSc-4-10-10	-1	1	-1	1	7,60	5,02	28,12	23,68	1,640
Sc-4-10-20	-1	1	1	-1	6,80	5,46	33,47	33,69	0,510
PSc-3,5-20-20	1	-1	1	1	8,80	4,54	49,80	18,14	1,080
Sc-4-20-10	1	1	-1	-1	7,03	4,79	45,45	20,91	0,190
Sc-4-10-10	-1	1	-1	-1	8,10	5,53	34,75	34,14	0,560
PSc-4-10-20	-1	1	1	1	7,60	4,81	46,26	24,65	1,620
PSc-4-20-20	1	1	1	1	8,30	4,98	35,05	15,59	0,046
PSc-3,5-20-10	1	-1	-1	1	8,63	7,52	45,38	17,10	1,080
PSc-3,5-10-20	-1	-1	1	1	6,57	4,96	32,86	25,05	1,140
Sc-4-20-20	1	1	1	-1	7,01	4,78	35,58	21,22	0,130
Sc-3,5-20-20	1	-1	1	-1	6,90	5,78	55,14	35,27	0,189
Sc-3,5-10-10	-1	-1	-1	-1	5,99	4,93	27,23	8,97	0,260
Sc-3,5-10-20	-1	-1	1	-1	6,21	3,99	44,66	28,07	0,250
PSc-4-20-10	1	1	-1	1	9,64	5,53	53,98	20,95	0,046
Sc-3,5-20-10	1	-1	-1	-1	7,03	5,01	50,96	27,90	0,218
PSc-3,5-10-10	-1	-1	-1	1	7,89	4,71	41,02	25,19	1,210

Tabla 3.3.2.: Matriz de diseño para vinos elaborados con *S. bayanus*.

Ensayos Vinos	T° C Ferm.	pH	T° C Mad.	Mosto	Etanol (g/100ml)	Glicerol (g/l)	Acetaldehído (mg/l)	Ac. de Etilo (mg/l)	Az.Tot. (g/100ml)
PSb-4-10-10	-1	1	-1	1	9,24	5,55	52,61	28,23	0,570
Sb-4-10-20	-1	1	1	-1	8,02	5,75	43,66	24,92	0,260
PSb-3,5-20-20	1	-1	1	1	8,53	4,37	32,32	14,37	0,370
Sb-4-20-10	1	1	-1	-1	9,08	6,27	41,61	19,27	0,250
Sb-4-10-10	-1	1	-1	-1	8,43	5,64	35,99	23,80	0,260
PSb-4-10-20	-1	1	1	1	8,91	5,59	51,83	24,05	0,570
PSb-4-20-20	1	1	1	1	10,02	5,51	44,49	23,31	0,110
PSb-3,5-20-10	1	-1	-1	1	9,06	6,48	38,07	23,30	0,370
PSb-3,5-10-20	-1	-1	1	1	8,94	7,50	44,46	28,28	0,380
Sb-4-20-20	1	1	1	-1	7,94	6,14	29,05	21,63	0,250
Sb-3,5-20-20	1	-1	1	-1	8,04	5,03	38,24	27,24	0,260
Sb-3,5-10-10	-1	-1	-1	-1	8,05	5,74	42,08	29,77	0,510
Sb-3,5-10-20	-1	-1	1	-1	7,16	3,81	35,78	23,16	0,500
PSb-4-20-10	1	1	-1	1	10,10	6,12	39,73	12,77	0,100
Sb-3,5-20-10	1	-1	-1	-1	8,58	5,50	43,90	24,31	0,240
PSb-3,5-10-10	-1	-1	-1	1	9,58	5,53	41,62	28,90	0,420

Todas estas reacciones dependen de efectores externos tales como, pH, temperatura, a_w , E_h , nutrientes etc. y de efectores internos que están gobernados por la dotación genética del microorganismo. En este estudio, se consideraron sólo dos de los efectores externos.

En el diagrama de Pareto (Figura 3.3.1) se muestra el efecto de las variables y sus interacciones cuando los ensayos de fermentación se llevaron a cabo usando como inóculo *S. cerevisiae*. En este caso la respuesta considerada fue la **concentración residual de azúcares totales**.

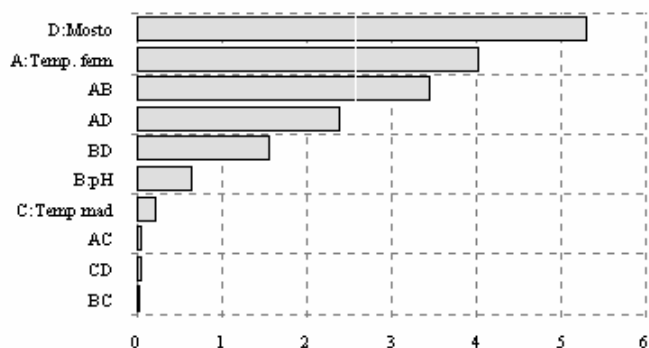


Figura 3.3.1.: Diagrama de Pareto de la respuesta azúcares totales para vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

Se observa que los efectos más importantes se deben al mosto y a la temperatura de fermentación, siendo los que manifestaron, según el ANOVA significancia estadística ($\alpha=0,05$). El coeficiente R^2 para esta respuesta fue de 99,99 %.

Es pertinente aclarar que el signo que presenta el coeficiente de la temperatura de fermentación es negativo, lo que estaría indicando que para obtener un vino más dulce se debe trabajar a los niveles más bajos de esta variable.

Las interacciones: temperatura de fermentación/pH y temperatura de fermentación/mosto también tienen coeficientes negativos y son estadísticamente significativos (Figuras 3.3.2 y 3.3.3).

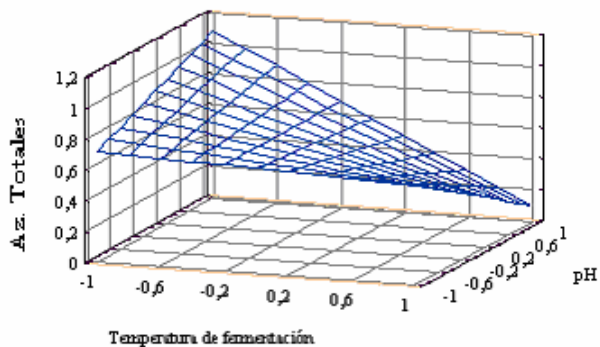


Figura 3.3.2. Interacción Temperatura de fermentación /pH para vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

Por lo que se deduce que para obtener vinos más dulces estas variables deben ser consideradas en su conjunto, siendo las combinaciones más favorables, menor temperatura de fermentación/mayor pH y menor temperatura de fermentación utilizando mosto de jugo pasteurizado.

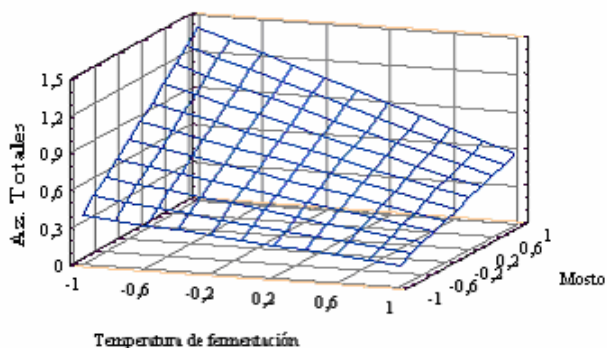


Figura 3.3.3.- Interacción Temperatura de fermentación/Mosto para vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

Cuando el proceso fermentativo se desarrolló usando como inóculo *S. bayanus*, la variable que más influyó sobre la concentración

residual de azúcares totales fue también la temperatura de fermentación, y a diferencia de *S. cerevisiae*, el pH contribuyó sobre esta respuesta (Figura 3.3.4).

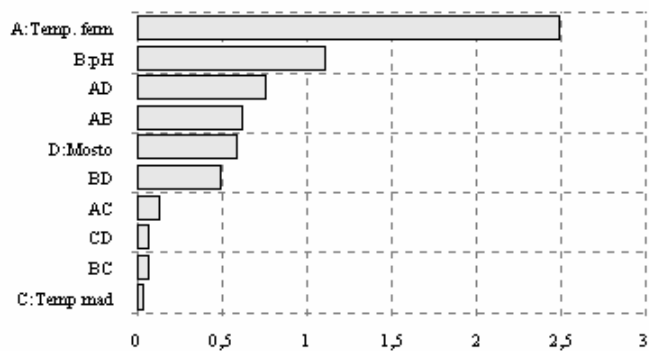


Figura 3.3.4.- Diagrama de Pareto de la respuesta azúcares totales para vinos elaborados con *S. bayanus*.

Del análisis de los resultados se podría deducir que los efectos de las variables y sus interacciones si bien son en su mayoría de igual signo para ambas levaduras, en el caso de *S. bayanus* los valores absolutos son más pequeños lo que estaría indicando que la influencia sobre la concentración residual de azúcares totales es mucho más atenuada (Figura 3.3.5).

El análisis de ANOVA arrojó valores probabilísticos, $P < 0,05$ para todos los efectos.

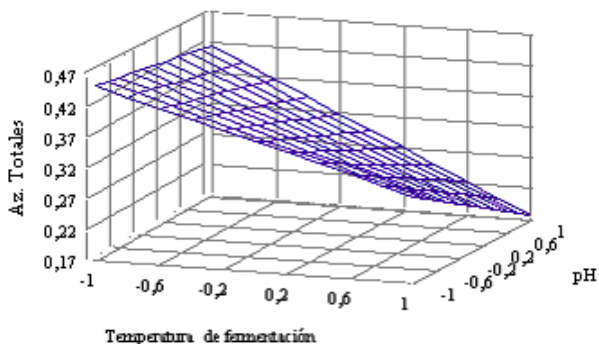


Figura 3.3.5.- Interacción Temperatura de fermentación/pH para vinos elaborados con *S. bayanus*.

Cuando la respuesta considerada es el **alcohol etílico** el diagrama de Pareto muestra que cuando se trabajó con *S. cerevisiae* la mayor influencia se debió a las variables, tipo de mosto, temperatura de fermentación y su interacción (Figura 3.3.6).

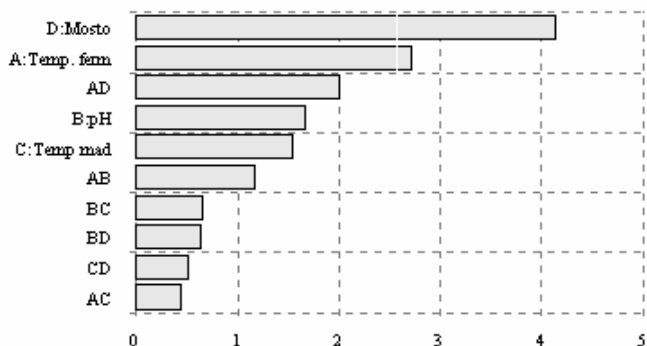


Figura 3.3.6.: Diagrama de Pareto de la respuesta etanol para vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

El signo de los coeficientes para las variables principales y la

interacción de mayor valor absoluto es positivo por lo cual para obtener una mayor concentración de etanol es más favorable trabajar con mosto de jugo pasteurizado y llevar a cabo la fermentación a 20°C (Figura 3.3.7 y 3.3.8).

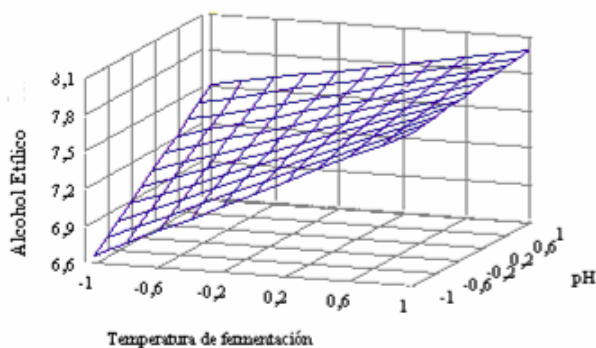


Figura 3.3.7.- Interacción Temperatura de fermentación/pH para vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

Si se considera la interacción temperatura de fermentación/pH (Figura 3.3.8) para mantener el tipo de mosto y el nivel de temperatura de fermentación anteriormente señalada, se deberá trabajar a pH: 3,5.

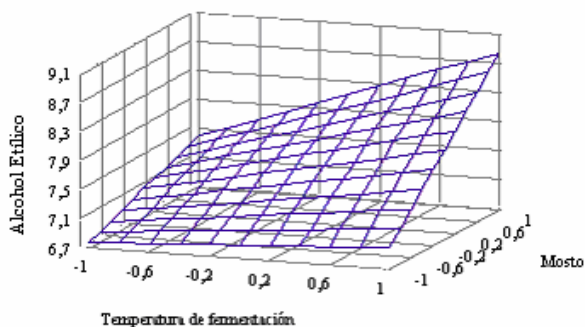


Figura 3.3.8.- Interacción Temperatura de fermentación/Mosto para vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

El ensayo estadístico indicó que ninguna de las variables estudiadas y sus interacciones afectaron significativamente ($\alpha=0,05$) esta respuesta. El coeficiente R^2 fue de 91,74 %.

Cuando la fermentación se realizó usando como inóculo *S. bayanus* y la respuesta considerada para el diseño experimental fue la concentración de alcohol etílico, las variables principales son las que mas influyeron sobre la misma (Figura 3.3.9).

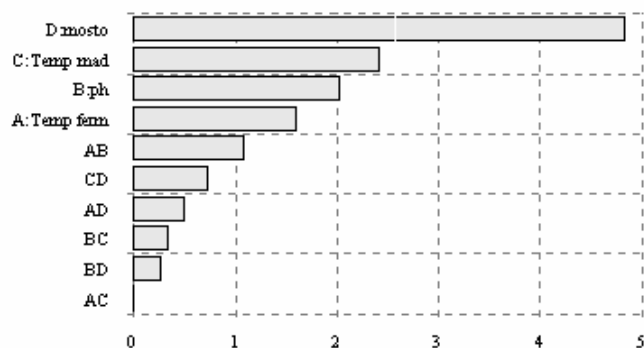


Figura 3.3.9.- Diagrama de Pareto de la respuesta etanol para vinos elaborados con *S. bayanus*.

El coeficiente de mayor valor absoluto correspondió al tipo de mosto y el signo fue positivo al igual que el pH y la temperatura de fermentación, esto indicaría que para obtener mayor concentración alcohólica se debe utilizar mosto de jugo pasteurizado, temperatura de fermentación de 20°C y pH 4,0.

Las interacciones fueron las que menos contribuyeron a la optimización de la respuesta, sin embargo la correspondiente a temperatura de fermentación/pH alcanzó un valor absoluto similar a la correspondiente a *S. cerevisiae* pero de signo positivo (Figura 3.3.10).

Estadísticamente ningún efecto resultó significativo ya que el probabilístico P siempre fue $> 0,05$. R^2 en este caso fue de 99,02 %.

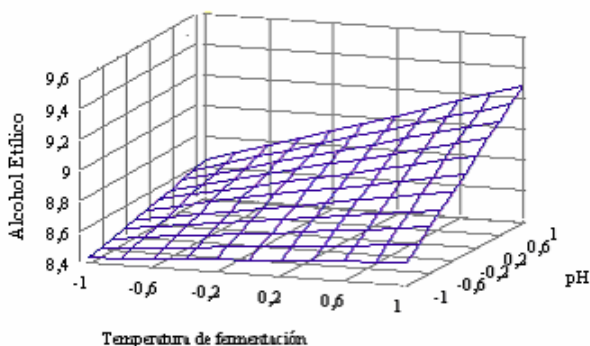


Figura 3.3.10. Interacción Temperatura de fermentación/pH para vinos elaborados con *S. bayanus*.

El análisis precedente evidenció que la menor temperatura de fermentación, afectó a la cinética de consumo de azúcar y por ende de la producción de alcohol, hecho que está en un todo de acuerdo teniendo en cuenta la ecuación de Arrhenius ($k = A \times e^{-E_a/RT}$) que relaciona la velocidad de reacción con la temperatura.

El efecto del pH sobre ambas levaduras demostró que *S. cerevisiae* (autóctona) puede completar mejor la fermentación al pH natural del jugo.

Por otra parte la interacción de los factores ejerció mayor influencia sobre la levadura autóctona que sobre la comercial.

Después del etanol y el CO_2 uno de los productos cuantitativamente más importantes de la fermentación alcohólica es el glicerol. Niveles variables (generalmente en el rango de 2 a 10 g/L) de glicerol son formados en el vino dependiendo de la especie de levadura y de las condiciones de fermentación, por ejemplo aumenta con la temperatura de fermentación (Ough, 1996).

Si la respuesta considerada es la concentración final de **glicerol** el diagrama de Pareto muestra que para *S. cerevisiae*, la interacción temperatura de fermentación/pH fue la que ejerció mayor influencia (Figura 3.3.11).

Esta interacción fue negativa, lo que significa que para fermentar

a 10°C el mosto debería tener un pH 4 para obtener la concentración adecuada de glicerol y mantener una relación equilibrada con el etanol, lo que se puede observar en la Figura 3.3.12

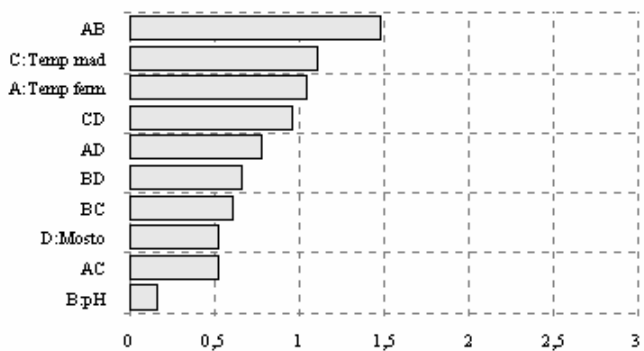


Figura 3.3.11.- Diagrama de Pareto de la respuesta glicerol para vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

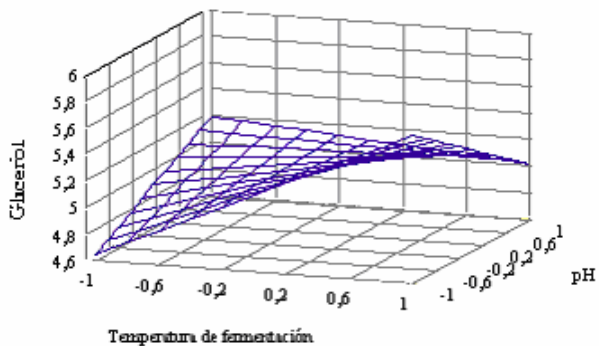


Figura 3.3.12.- Interacción Temperatura de fermentación/pH para vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

Otras de las interacciones es temperatura de maduración/pH, Figura 3.3.13.

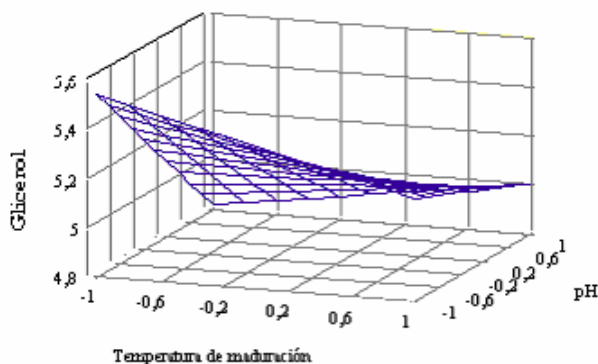


Figura 3.3.13. Interacción Temperatura de maduración/pH para vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

El valor mayor de la respuesta se obtuvo fermentando a pH 4 y madurando a 20°C.

El análisis estadístico no señaló significancia para ningún efecto y el valor de R^2 fue de 85,43 %.

En el caso de la fermentación con *S. bayanus* la formación de glicerol se vio afectada principalmente por las interacciones pH/mosto, temperatura de fermentación/mosto, y temperatura de fermentación/temperatura de maduración, (Figura 3.3.14).

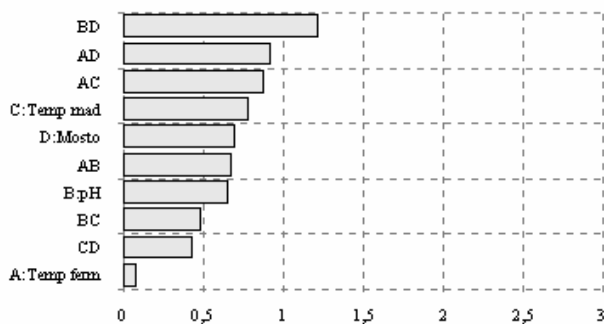


Figura 3.3.14.: Diagrama de Pareto de la respuesta Glicerol para vinos elaborados con *S. bayanus*.

Como se observa el valor absoluto de las interacciones es relativamente pequeño y el signo de los coeficientes es negativo (Figura 3.3.15) y estadísticamente no son significativas.

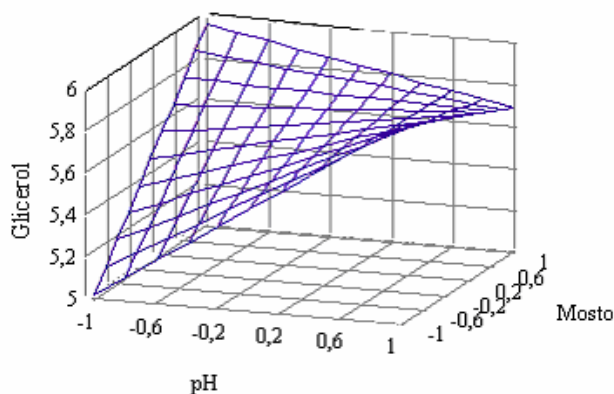


Figura 3.3.15. Interacción pH/Mosto para vinos elaborados con *S. bayanus*.

Para lograr una mayor concentración de glicerol se debería vinificar mosto de jugo pasteurizado a 10°C ajustando el pH a 3,5 y almacenar para su maduración a 20°C (Figura 3.3.16).

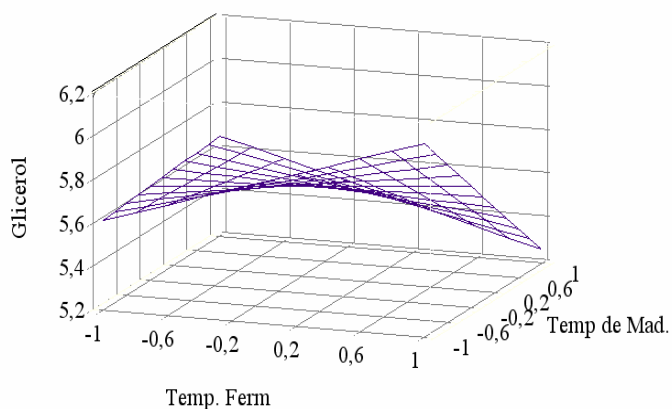


Figura 3.3.16. Interacción Temperatura de fermentación/Temperatura de maduración para vinos elaborados con *S. bayanus*.

El valor de R^2 que explica la variabilidad de este parámetro para el modelo de diseño seleccionado fue de 84,26 %.

En ambos cultivos se manifestó el efecto de la temperatura de fermentación sobre la producción de glicerol y nuevamente fue *S. cerevisiae* la más susceptible a los cambios en las variables del proceso.

El acetaldehído se forma durante la fermentación alcohólica por descarboxilación del piruvato que constituye el eslabón final de la glicólisis, gracias a la actividad de la enzima piruvato descarboxilasa. La oxidación de alcoholes o la descarboxilación de otros cetoácidos también pueden conducir a la formación de aldehídos

La acumulación de **acetaldehído** durante la fermentación con *S. cerevisiae* se vio afectada principalmente por la temperatura de fermentación. El aumento de esta variable elevó la concentración de este metabolito intermedio (Figura 3.3.17).

Las interacciones consideradas de mayor relevancia son las representadas en las Figuras 3.3.18, 3.3.19, 3.3.20 y 3.3.21.

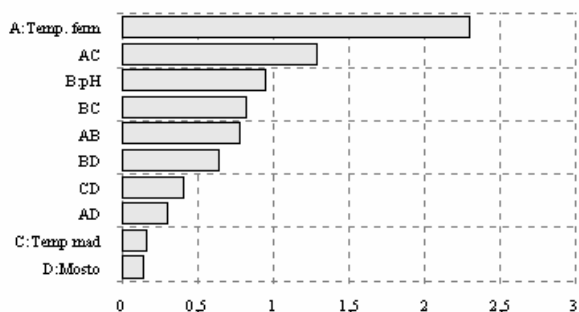


Figura 3.3.17.: Diagrama de Pareto de la respuesta Acetaldehído para vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

Cabe señalar que todas tienen coeficiente negativo y que estadísticamente no resultaron significativas.

Considerando que la concentración de acetaldehído debe mantenerse relativamente baja para no afectar las propiedades sávido aromáticas del vino, y en función de que el aumento de temperatura de fermentación eleva los niveles de este metabolito se hace necesario

trabajar a baja temperatura y pH 4 (Figura 3.3.18).

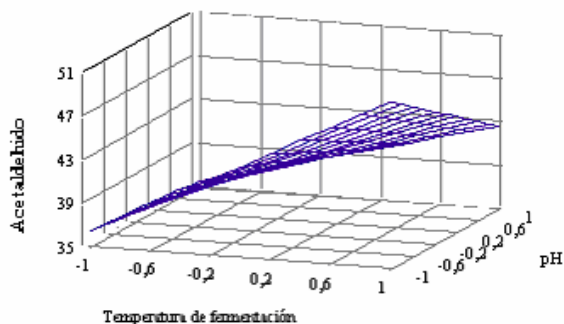


Figura 3.3.18. Interacción Temperatura de fermentación/pH para vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

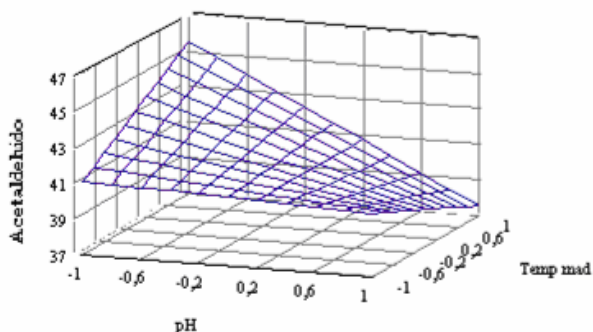


Figura 3.3.19. Interacción pH/Temperatura de maduración para vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

No obstante, dado que la interacción entre la temperatura de maduración y la de fermentación tienen coeficiente negativo, de fijarse las condiciones anteriores, se debería madurar a 20°C, pero en este caso el pH elegido debería ser 3,5.

Los valores del probabilístico P del ensayo de ANOVA en ningún

caso dieron valores menores a 0,05. El coeficiente R^2 es igual a 84,72 %.

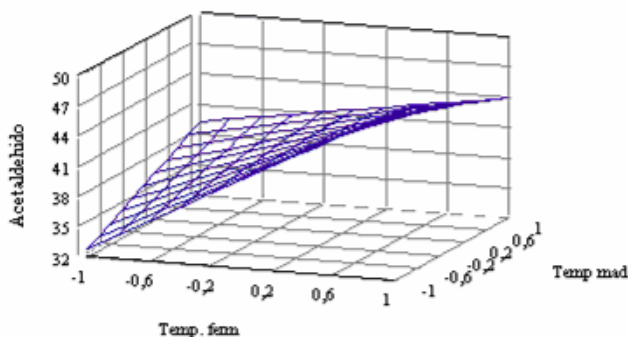


Figura 3.3.20. Interacción Temperatura de fermentación/Temperatura de maduración para vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

Analizando los vinos de naranja obtenidos mediante fermentación con *S. bayanus* se observó que las variables del proceso, influyeron sobre la concentración final de acetaldehído de manera diferente a como lo hicieron cuando se usó *S. cerevisiae*.

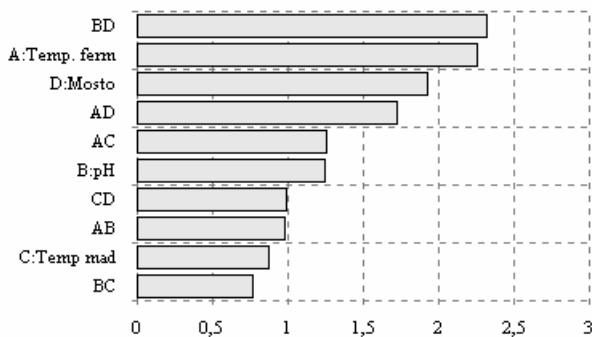


Figura 3.3.21.: Diagrama de Pareto de la respuesta Acetaldehído para vinos elaborados con *S. bayanus*.

En este caso la mayor influencia sobre la concentración de acetaldehído se debió a la interacción, de coeficiente positivo, de las variables pH/tipo de mosto (Figura 3.3.22).

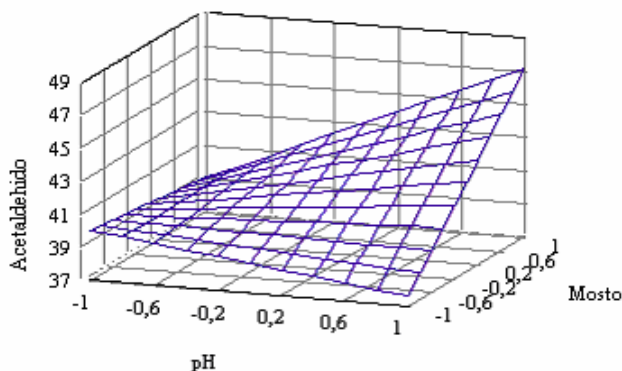


Figura 3.3.22. Interacción pH/Mosto para vinos elaborados con *S. bayanus*.

Sin embargo el efecto de la temperatura de fermentación manifestó, en valor absoluto, una influencia similar a cuando se usó *S. cerevisiae* pero de signo negativo

Teniendo en cuenta la contribución de las variables y sus interacciones para esta levadura, las menores concentraciones de acetaldehído se lograrían usando un mosto de jugo natural, pH 4,0, temperatura de fermentación 20°C y una maduración a 10°C (Figuras 3.3.23 y 3.3.24).

El modelo para las variables y sus respectivos niveles seleccionados explica el 86,84 % de la variabilidad del acetaldehído de los vinos de naranja cuando el inóculo fue de *S. bayanus*. Estadísticamente ningún efecto tiene significancia.

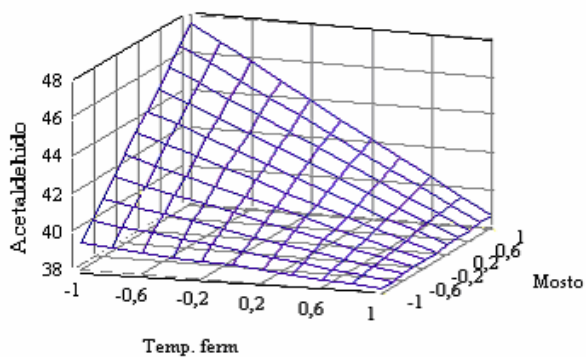


Figura 3.3.23. Interacción Temperatura de fermentación/Mosto para vinos elaborados con *S. bayanus*.

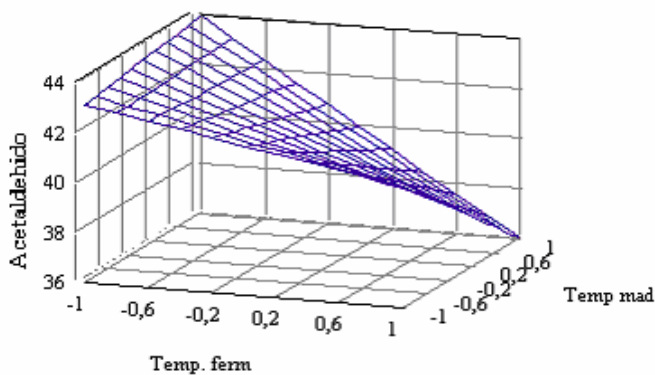


Figura 3.3.24. Interacción Temperatura de fermentación/Temperatura de maduración para vinos elaborados con *S. bayanus*.

La mayoría de los ésteres volátiles se forman durante la fermentación, sin embargo los ácidos orgánicos no volátiles se forman lentamente con el tiempo. Alcanzar el equilibrio requiere de un tiempo más o menos largo de maduración (Ough, 1996).

De los ésteres formados durante la vinificación el acetato de etilo es el que juega un rol mínimo comparado con otros ésteres de ácidos

grasos, sobre el aroma afrutado de los vinos (Suárez, 1997).

El éster acético (acetato de etilo), se presenta en los vinos no alterados en cantidades muy pequeñas, mientras que en los vinos picados se presentan en grandes cantidades (Vogt, 1971).

El ácido acético y posteriormente el acetato de etilo, son producidos mayoritariamente por levaduras apiculadas que están presentes en los vinos de fermentación espontánea. En los vinos obtenidos con cultivos puros de levadura, su contenido es menor, sobre todo cuando se trabaja con jugos de naranja pasteurizado.

El **acetato de etilo** es el principal éster producido en los vinos pero su influencia sobre la calidad de los mismos es desfavorable ya que es el mayor indicador de la acescencia del producto.

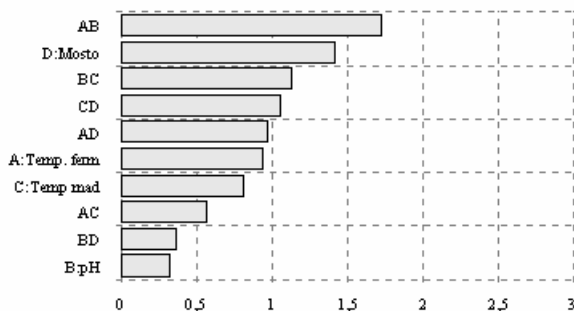


Figura 3.3.25.: Diagrama de Pareto de la respuesta Acetato de Etilo para vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

En el caso de los vinos obtenidos con *S. cerevisiae* se pudo observar que dentro de las variables principales la única que intervino en mayor valor fue el tipo de mosto (Figura 3.3.25).

Los factores que más influyeron sobre su producción fueron los efectos combinados de temperatura de fermentación/pH, pH/temperatura de maduración, temperatura de maduración/mosto; todas con coeficientes negativos tal como se puede observar en las Figuras 3.3.26, 3.3.27, y 3.3.28.

Para minimizar la producción de este metabolito las condiciones de trabajo deberían ser por ejemplo:

- Baja temperatura de fermentación, menor nivel de pH (Figura 3.3.26).

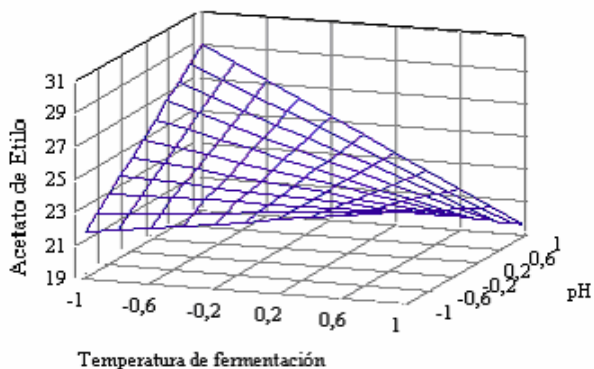


Figura 3.3.26. Interacción Temperatura de fermentación/pH para vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

- Baja temperatura de fermentación, mosto de jugo natural (Figura 3.3.27).

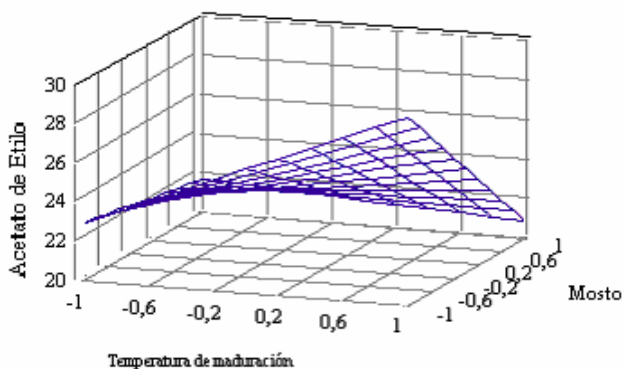


Figura 3.3.27. Interacción Temperatura de maduración/Mosto para vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

- Bajo nivel de pH, menor temperatura de maduración (Figura 3.3.28)

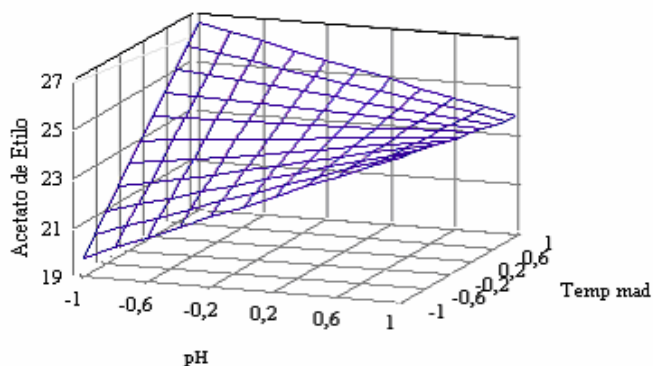


Figura 3.3.28. Interacción pH/Temperatura de maduración para vinos elaborados con *S. cerevisiae*.

Los valores del probabilístico P se ubicaron por encima de 0,05 para todas las variables y sus interacciones lo cual indica que no influyen significativamente con un 95 % de confianza sobre la variabilidad de la respuesta. El modelo explica el 96,72 % de la variabilidad.

Usando *S. bayanus* para la elaboración de vino cítricos se observaron diferencias respecto a la producción de acetato de etilo en las distintas condiciones ensayadas tal como se muestra en el diagrama de Pareto (Figura 3.3.29).

Las variables de más influencia fueron la temperatura de fermentación y el pH, seguidas de las interacciones temperatura de fermentación/mosto, pH/temperatura de maduración y temperatura de maduración/temperatura de fermentación (Figura 3.3.30 y 3.3.31).

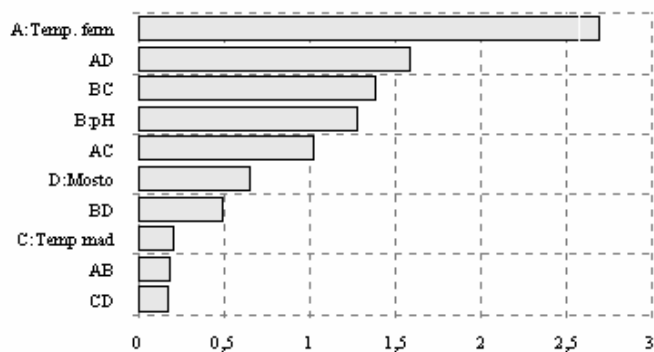


Figura 3.3.29: Diagrama de Pareto de la respuesta Acetato de Etilo para vinos elaborados con *S. bayanus*.

Analizando los resultados del diseño podría deducirse que para que la producción de acetato de etilo sea mínima, cuando se inocula con *S. bayanus*, las condiciones de trabajo deberían ser: mosto pasteurizado, pH 4,0, temperatura de fermentación 20°C y temperatura de maduración 10°C.

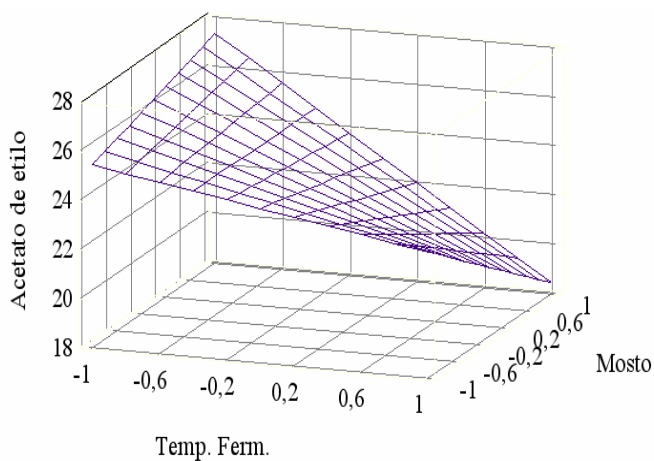


Figura 3.3.30. Interacción Temperatura de fermentación/Mosto para vinos elaborados con *S. bayanus*.

Tampoco en este caso se verificaron diferencias significativas para el análisis de ANOVA ($\alpha=0,05$) y el R^2 fue de 75,24 %.

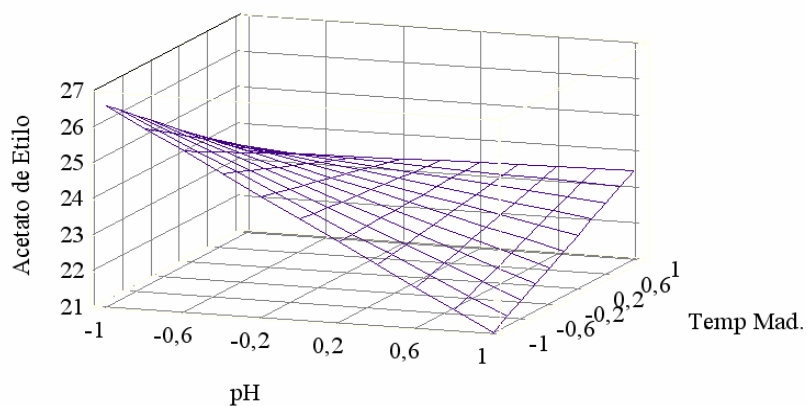


Figura 3.3.31. Interacción pH/Temperatura de maduración para vinos elaborados con *S. bayanus*.

IV CONCLUSIONES

Los resultados experimentales obtenidos en el presente trabajo, relacionados a los objetivos planteados al inicio del mismo, permiten alcanzar las siguientes conclusiones generales:

- 1) El estudio ecológico de la población microbiana de los jugos de las diferentes variedades de naranjas mostró una amplia gama de microorganismos en cantidades crecientes tanto en número como en diversidad, con el avance de la temporada de cosecha.
- 2) La flora epifítica de la cáscara de naranja posee relativamente pocos géneros de levaduras. La mayoría de las levaduras aisladas a partir de jugo fresco fueron clasificadas como pertenecientes a los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Kloeckera*, *Trichosporum* y *Rhodotorula*.
- 3) Los resultados obtenidos en los ensayos tecnológicos muestran que *a priori* ninguna de las levaduras aisladas del jugo fresco podría ser utilizada en forma de cultivo puro en la elaboración de vino de naranja.
- 4) En el jugo fermentado, tanto sin como con el agregado de sacarosa, se observó una evolución en la flora levaduriforme con el tiempo de fermentación, con predominancia de *Kloeckera* al inicio, de *Candida* en la etapa tumultuosa y de *S. cerevisiae* al final de la fermentación.
- 5) *S. cerevisiae* aislada de jugo fermentado posee buenas propiedades vnicas utilizándose en la elaboración del vino de naranja.
- 6) Tanto la levadura comercial (*S. bayanus*) como la autóctona (*S. cerevisiae*) se adaptaron para crecer adecuadamente en los mostos preparados a partir de los jugos de naranja natural, pasteurizado y concentrado reconstituido.
- 7) La levadura autóctona *S. cerevisiae* requiere las vitaminas ensayadas (Pantotenato de Calcio,

Piridoxina, Tiamina y Biotina) para crecer adecuadamente en condiciones aeróbicas en sistema batch. En cambio, no es auxótrofa para Niacina, Ácido Fólico, PABA e Inositol.

- 8) De los dos sistemas de cultivo utilizados (batch y fed batch) para obtener biomasa de *S. cerevisiae*, el que mostró mejores rendimientos fue el de fed batch, lo cual prueba que esta levadura presenta efecto Crabtree (+).
- 9) La levadura autóctona manifestó poseer adecuadas cualidades higiénicas para su utilización en un producto alimenticio.
- 10) El avance de la fermentación alcohólica, hasta el primer trasiego de los vinos de naranja, demostró diferencias en las cinéticas de fermentación de ambas levaduras, en los distintos mostos y a diferentes pHs y temperaturas.
- 11) Se verificó que en la escala de trabajo usada en estas vinificaciones (damajuanas de 30 L), no se produce un incremento de temperatura que origine ralentización o parada de la fermentación.
- 12) Ambas levaduras presentan diferencias en cuanto a la evolución de algunos parámetros fisicoquímicos considerados de interés en la vinificación, ya sea por sus características nutricionales y/o sensoriales, a saber:
 - a) *S. bayanus*, en todas las condiciones de trabajo consume casi la totalidad de los azúcares en el primer período, en cambio *S. cerevisiae* mostró mayor lentitud.
 - b) Los vinos obtenidos con *S. bayanus* dan mayor graduación alcohólica, especialmente cuando se trabaja a pH 4.
 - c) El Nitrógeno amínico de los mostos de jugo natural y pasteurizado se consume casi completamente por ambas levaduras durante la primera etapa de vinificación. No sucede lo mismo con el mosto de jugo

concentrado reconstituido.

- d) El contenido de ácido cítrico experimenta una tendencia a aumentar desde el momento de la inoculación (con cada levadura) hasta el primer trasiego, especialmente a pH 3,5, independientemente de los otros efectores externos. A partir de este momento y hasta la obtención del vino joven se observa un descenso en su concentración, fundamentalmente a pH 4 y 20°C.
 - e) La evolución en el contenido de ácidos málico y quínico es completamente aleatoria para ambas levaduras en las distintas condiciones de vinificación.
 - f) La acidez titulable (expresada en % de ácido cítrico anhidro) sigue la tendencia de la concentración de este ácido en la vinificación con ambas levaduras. Sin embargo, y como era de esperar, se distingue una disminución en la primera etapa a pH 4.
 - g) La concentración de ácido ascórbico presenta un ligero descenso durante las distintas etapas de vinificación con las dos levaduras utilizadas tanto sobre mosto de jugo natural como pasteurizado. En el mosto de jugo concentrado reconstituido, después del primer trasiego, se registra un aumento en la concentración de ácido ascórbico.
 - h) La concentración de carotenoides y de hesperidina, en todas las condiciones de vinificación, experimenta una disminución en la primera etapa, manteniéndose luego constante. Igual comportamiento se registra en los aceites esenciales, con la excepción de los vinos obtenidos con mosto de jugo concentrado reconstituido.
- 13) Las evaluaciones microbiológicas de los diferentes vinos, demuestran que:
- a) *S. bayanus* alcanza mayor recuento que *S. cerevisiae*, especialmente en los vinos elaborados con mosto de

- jugo natural en las diferentes condiciones de pH y temperatura.
- b) No se detectan contaminaciones bacterianas y las levaduras *non-Saccharomyces* son escasas.
 - c) El recuento de *Saccharomyces* en los vinos obtenidos de mosto de jugo concentrado reconstituido es escaso aún después del primer trasiego concordando con la parada de fermentación. Además, se observa la presencia de *Leuconostoc mesenteroides* y *Acetobacter sp.*
- 14) Los ensayos de estabilidad muestran que la misma está influenciada predominantemente por factores fisicoquímicos.
- 15) Los ensayos de maduración durante 120 días, a 10°C y 20°C, permiten concluir que la mayoría de los vinos de naranja, tanto de mosto de jugo natural como pasteurizado, y elaborados tanto con *S. cerevisiae* como *S. bayanus*, presentan un balance equilibrado de los componentes después del almacenamiento.
- 16) De la aplicación del diseño estadístico experimental se concluye que para obtener un vino de naranja con las características predeterminadas en este trabajo, es decir con una graduación alcohólica relativamente baja y una concentración de azúcares remanentes que lo tornen menos seco, se debe utilizar mosto de jugo de naranja pasteurizado ajustado a pH 4. Si se inocula con *S. cerevisiae* se debe llevar a cabo la fermentación a 1 °C con posterior almacenamiento a 20°C. En cambio, si se inocula con *S. bayanus* tanto la temperatura de fermentación como de maduración deberán ser 20°C.

A partir de los resultados obtenidos, y como continuación del trabajo iniciado, es necesario realizar otros ensayos, tales como la fermentación espontánea para seguir, en cada una de las etapas del proceso, la microbiota presente e identificarla usando

métodos de la Biología Molecular y la caracterización de los vinos de naranja usando esta metodología. Además, dentro de los análisis fisicoquímicos de los vinos se deberían incluir la composición de volátiles, tan importantes en las características aromáticas de los mismos.

V BIBLIOGRAFIA

- Agenbach, W.A. (1977) A study of must nitrogen content in relation to incomplete fermentations, yeast production and fermentation activity. In: Proceedings of South African Society of Enology and Viticulture. Stellenbosch: South African Society of Enology and Viticulture, Cape Town. pp: 66-68
- Alexandre Benavent, J.L. (1997). La Cultura del Vino. Cata y Degustación. Servicio de publicaciones. Universidad Politécnica de Valencia.
- Alexandre Benavent, J.L. (1999). Vinos y Bebidas Alcohólicas. Servicio de publicaciones. Universidad Politécnica de Valencia.
- Alexandre Benavent, J.L. y Garcia Esparza, M.J. (1996). Prácticas de Procesos de Elaboración y Conservación de Alimentos. Servicio de publicaciones. Universidad Politécnica de Valencia.
- Alexandre, H. and Carpentier, C. (1998). Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentations in grape must. J. Microb. Biotech. 20: 20-27.
- Amerine, M.A. and Berg, H.W. (1980). The composition of grape and wine: In: The Technology of winemaking 4th. AVI Pub. Co. Westport, CT., pp. 77-139.
- Amerine, M.A. y Ought, C.S. (1969) Análisis de Vinos y Mostos Ed. Acribia. Zaragoza. España.
- Ansanay, V.; Deguin, S.; Camarasa, C.; Schaffer, V.; Grivet, J.; Blondin, B.; Salmon, J. and Barre, P. (1996). Malolatic Fermentation by Engineered *Saccharomyces cerevisiae* as compare with engineered *Sechizosaccharomyces pombe*. Yeast 12: 215-225.
- Antonelli, A.; Castellari, L.; Zambonelli, C. and Carnacini, A. (1999). Yeast Influence on Volatile Composition of Wines. J. Agric. Food Chem. 47:1139-1144.
- AOAC (1984). Official Methods of Analysis. 11th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C.
- AOAC (1989). Official Methods of Analysis. 11th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C.
- Argiriou, T.; Kaliafas, A.; Psarianos, K.; Kanellaki, M.; Voliotis, S. and Koutinas, A.A. (1996). Psychrotolerant *Saccharomyces cerevisiae* Strain after an Adaptation Treatment for Low Temperature Wine Making. Proc. Bioch. 31, 7: 639-643.

- Arici, O. and Yucel, U. (1994). A study on the production of orange wine. *Gida* 19, 2: 113-117.
- Attfield, P.V. (1997). Stress Tolerance. The key effective strain of industrial baker's yeast. *Nature Biotech.* 15: 1351-1357.
- Baranowski, K. and Radler, F. (1984). The glucose-dependent transport of L-Malate in *Zygosaccharomyces baillii*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 50: 329-340.
- Barford, J.P. (1989). A General Model for Aerobic Yeast. Growth: Continuous Culture. *Biotech. Bioeng.* 35: 921-927.
- Barford, J.P. (1990). Yeast Growth: Batch Growth. *Biotech. Bioeng.* 35: 907-920.
- Barnett, J.A.; Payne, R.W. and Yarrow, D. (2000) *Yeast: Characteristics and Identification*, Cambridge University Press. Cambridge.
- Basak, S. and Ramaswamy, H.S. (1996). Ultra high pressure treatment of orange juice: a kinetic study on inactivation of pectin methyl esterase. *Food Res. Int.* 29, 7: 601-607.
- Bataillon, M.; Rico, A. and Sablayrolles, J.M. (1996). Early thiamine assimilation by yeast under enological conditions: Impact on alcoholic fermentation kinetics. *J. Ferm. Bioeng.* 82: 145-150.
- Bauer, F.F. and Pretorius, I.S. (2000). Yeast Stress response and fermentation Efficiency: How to Survive the Making of wine. A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21: 27-51.
- Belin, J.M. (1972). Recherches Sur la répartition des levures a la surface de la Grappe de raisin. *Vitis* 11: 135-145.
- Beltran, G.; Novo, M.; Rozès, N.; Mas, A. and Guillamón, J.M. (2004). Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations *FEMS Yeast Res.* 4: 625-632.
- Bely, M.; Sablayrolles, J.M. and Barre, P. (1990). Description of Alcoholic fermentation Kinetics: Its Variability and significance. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 319-324.
- Benítez, T.; Del Castillo, L.; Aguilera, A.; Conde, J. and Cerdá-Olmedo, E. (1983). Selection of wine yeast for growth and fermentation in the presence of ethanol and sucrose. *Appl. Envir. Microb.* 45,5: 1429-1436.

- Berk, Z. (1986). Introducción a la bioquímica de los alimentos. Ed. El Manual Moderno. México.
- Bidan, P.; Feuillat, M. et Moulin J.P. (1986). Les vins mousseux Rapport Francais 65 eme Assemblée Généralé de l'Office International de la Vigne et du Vin, 663-664, 563-626.
- Bidard, F.; Bony, M.; Blondin, B., Dequin, S. and Barre, P. (1995). The *Saccharomyces cerevisiae* FLO 1 flocculation gene encodes a cell surface protein. Yeast 11: 809-822.
- Bisson, L.F. (1996). Yeast and biochemistry of ethanol formation. In: Principles and Practices of Winemaking. Boulton, R.B.; Singleton, V.L.; Bisson, L.F. and Kunkee, R.E. (Eds). Chapman and Hall. pp. 140-172.
- Bisson, L.F. (1999). Stuck and Sluggish fermentations. Am. J. Enol. Vitic. 50: 107-119.
- Blackwell, K.J. and Tobin, J.M. (1997). Manganese uptake and toxicity in magnesium supplemented and unsupplemented *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microb. Biotech. 47: 180-184.
- Blumenkrantz, N. and Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. Anal. Biochem. 54: 484-489.
- Boddy, L. and Wimpenny, J.W.T. (1992). Ecological Concepts in Food Microbiology. J. Appl. Bact. 73: 23S-38S (Suplement).
- Bony, M.; Thines-Sempux, D.; Barre, P. and Blondin, B. (1997). Localization and cell surface anchoring of the *S. cerevisiae* flocculation protein Flo 1 p. J. Bact. 179: 4929-4936.
- Boulton, R.B.; Singleton, V.L. and Kunkee, R.E. (1996) Yeasts and Biochemistry of Ethanol Fementation. In: Principles and practices of wine making. Gaithersburg. Maryland. Aspen. Publishing, pp: 173-178-179.
- Braddock, R. (1999). Handbook of Citrus By-Products and Processing Technology. John Wiley & Sons, Inc. New Cork.
- Braverman, J.B.S. (1952). Los Agrios y sus derivados. Composición y tecnología química. Ediciones Aguilar S.A. Madrid.
- Brechot, P.; Chauvet, J.; Dupuy, P.; Croson, M. et Rabatu, A. (1971). Acide oleanoique facteur de aroissance anaerobic de la levure du vin. C. R.

Acad. Sci. 272: 890-93.

- Brock, T.D. and Madigan, M.T. (1991). Microbiología. Prentice Hall - Hispanoamericana S.A. Barcelona.
- Brown, C.M.; Campbell, I. and Priest, F.G. (1989). Introducción a la Biotecnología. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Bruchmann, E.E. (1980). Bioquímica Técnica. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- C.A.A. Código Alimentario Argentino (1999). Editorial De la Canal y Asociados. Buenos Aires, Argentina.
- Campbell, I. and Duffus, J.H. (1988). Yeast. A Practical Approach. I.R.L. Press Limited. Oxford, England.
- Caridi, A. (2003). Effect of protectants on the fermentation performance of wine yeast subjected to osmotic stress. Food Tech. Biotech. 41, 2: 145-148.
- Caridi, A.; Crucitti, P. and Ramondino, D. (1999). Winemaking of must at high osmotic strength by thermotolerant yeasts. Biotech. Lett. 21: 617-620.
- Cartwright, R.B. and Juroszek, J.R. (1986). Ethanol dissipates the proton-motive force across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microb. 132: 369-377.
- Casas, A.; Mallent, D. and Montoro, R. (1976) Evaluación Rápida del Contenido en Carotenoides Totales del Zumo de Naranja. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos 16, 4: 503-508.
- Casey, G.P. and Ingleden, W.M. (1985). Reevaluation of alcohol synthesis and tolerance in brewer's yeast. Am. Brew. Soc. Chem. 43: 75-83.
- Castro, R.; Barroso, C.G. y Sánchez-Pazo, J.A. (1999). Empleo de cámara climática para el estudio del pardeamiento de vinos conservados en vidrios de distintos colores. Jornadas Científicas'99 Grupo de Investigaciones Enológicas. Zaragoza, España.
- Charoenchai, C.; Fleet, G.H. and Todd, B.E.N. (1997). Screening of *non Saccharomyces* wine yeast for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. Aust. J. Grape wine Res. 3: 2-8.
- Charoenchai, C.; Fleet, G. and Henschke, P. (1998). Effects of Temperature, pH and Sugar concentration on the growth rates and cell Biomass of wine yeasts. Am. J. Enol. Vitic. 49, 3: 283-288.

- Ciani, M. (1997). Role, enological properties and potential biotechnological of *non- Saccharomyces* wine yeast. In: Recent Res. Devel. in Microbiology. Eds. S. G. Pandalai 1: 317-331 Research Signpost Trivandrum
- Ciani, M. and Ferraro, L. (1998). Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wine. J. Appl. Bact. 85: 247-254.
- Ciani, M. and Picciotti, G. (1995). The Growth Kinetics and Fermentation Behaviour of Some *non- Saccharomyces* Yeast Associated with Wine-making. Biotech. Lett. 17, 11: 1247-1250.
- Cocolin, L.; Hersey, A. and Mills, D.A. (2001). Direct identification of Indigenous yeast in commercial wine fermentation. Am. Jm. Enol. Vitic. 52: 49-53.
- Costa, M. I. and Moradas-Ferreira, P., (2001). *Saccharomyces cerevisiae* flocculation: identification of specific cell wall protein. Proc. Congr. Eur. Brew Conv. 24: 283-290.
- Crueger, W. and Crueger, A. (1993). Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.
- Darias-Martín, J.; Socas-Hernández, A.; Dias Romero, C. and Dias-Dias, E. (2003). Comparative study of method for determination of titrable acidity in wine. J. Food. Comp. Anal. 16: 555-562.
- D'Amore, T. and Steward, G.G. (1987). Ethanol Tolerance of Yeast. Enz. Microb. Tech. 9: 322-330.
- D'Haucourt, O. and Smart, K.A. (1999). Measurement of brewing yeast flocculation. J. Am. Soc. Brew. 57: 123-128.
- Davenport, R.R. (1974). Microecology of Yeast and Yeast like organisms associate with and English Vineyard. Vitis 13: 123-130.
- Davis, C.R.; Wibowo, D.J.; Lee, T. H. and Fleet, G.H. (1985). Growth and Metabolism of Lactic Acid Bacteria during and after Malolactic Fermentation of Wines at Different pH. Appl. Envir. Microb. 51: 539-545.
- de Villiers, A.; Lynen, F.; Crouch, A. and Sandra, P. (2003). A Robust Capillary Electrophoresis Method for the Determination of Organic Acids in Wines. Eur. Food Res. Tech. 217: 535-540.

- Deak, T. and Beuchat, L.R. (1993). Comparison of the SIM, API 20C, and ID 32C Systems for Identification of Yeasts Isolated from Juice Concentrates and Beverages. *J. Food Prot.* 56,7: 585-592.
- Deak, T. and Beuchat, L.R. (1996). *Handbook of Food Spoilage Yeast*. CRC Press, Boca. Raton, USA.
- Degré, R. (1983). Selection and Commercial Cultivation of Wine Yeast. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. Fleet, G. H. (Ed). Harwood Academic Publishers, Switzerland, pp 421-447.
- Degré, R.; Thomas, D.Y.; Ash, J.; Mailhiot, K.; Morin, A. and Dubord, C. (1989). Wine yeast strain identification. *Am. J. Enol. Vitic.* 40: 309-315.
- Dizy, M.; Bisson, L.F. (1999). Proteolytic Activity of yeast strain during grape juice fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 51: 155-167.
- Dombeck, K.M. and Ingram, L.O. (1986). Magnesium and its role in apparent toxicity of ethanol in yeast fermentation. *Appl. Envir. Microb.* 52: 975-981.
- Doneche, B.J. (1993). Botrytized Wine in *Wine Microbiology and Biotechnology*. Fleet, G.H. (Ed). Harwood Academic Publishers.
- Doores, S. (1987). The Microbiology of Apple and Apple Products. *CRC Critical Reviews. Food Science and Nutrition* 19,2: 133-149.
- Dreyer, A.; Coello, N. y Montiel, E. (2000). Utilización de la Metodología de Superficie de Respuesta de la Optimización de un Medio de Cultivo para la Producción de L-Lisina por *Corynebacterium glutamicum*. *Agronomía Tropical* 50:167-188.
- Drysdale, G.S. and Fleet, G.H. (1989). The effect of acetic acid bacteria on the growth and metabolism of yeast during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bact.* 67: 471-481.
- Dubois, C. and Manginot, C. (1996). Effect of variety, year and grape maturity on the kinetics of alcoholic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 47: 363-368.
- Edwards, C.G.; Wang, X.D. and Bohlscheid, J.C. (2003). Impact of Biotin and Pantotenic Acid on Fermentation Induced by *Saccharomyces*. A.S.E.V. 54th Annual Meeting. Reno, Nevada.
- Ejiofor, A.O.; Solomon, B.O.; Posten, C. and Deckwer, W.D. (1994). Análisis of

the respiro-fermentative growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose in a fed batch fermentation strategy for accurate parameter estimation. *Appl. Microb. Biotech.* 41: 664-669.

- Epifanio, S.; Garijo, P.; López, R.; Santamaría, P.; Gutiérrez, A.R. y Palacios, A. (2001). Factor killer en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* procedentes de vinificaciones espontáneas (1994-2000) en DOC Rioja. Consideraciones sobre su influencia en la fermentación. VI Jornadas Científicas 2001, Grupo de Investigación Enológica. Valencia, 5-7 junio 2001. Ponencia.
- Erten, H. (2002). Relation between elevated temperatures and fermentation behaviours of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated which winemaking in mixed cultures. *World J. Microb. Biotech.* 18: 373-378.
- Ertola, R.; Yantorno, O. y Mignone, C. (1994). *Microbiología Industrial*. Secretaría General de la OEA. Washington, D.C.
- Escudero, A.; Asencio, E.; Cacho, J. and Ferreira, V. (2002). Sensory and Chemical Changes of Young White Wines Stored Under Oxygen. An Assessment of the Role Played by Aldehydes and Some Other Important Odorant. *J. Food Chem.* 77: 325-331.
- Esteve-Zarzoso, B.; Manzanares, P.; Ramón, D. and Querol, A. (1998). The role of *non Saccharomyces* yeast in industrial winemaking. *Int. Microb.* 1: 143-148.
- Fennema, O.R. (2000). *Química de los Alimentos*, 2º edición. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
- Fernández, M.T., Ubeda, J.F. y Briones, A.J. (1999). Estudio de las actividades enzimáticas con interés enológico en levaduras no *Saccharomyces*. Jornadas Científicas 99. Grupos de Investigación Enológica. Ponencia. Zaragoza, 17-19 de mayo de 1999.
- Ferreras, J.M.; Iglesias, R. and Girbeés, T. (1989). Effect of the Chronic Etanol Action on the activity of general aminoacids permease from *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Biochim. Biophys. Acta* 979: 357-377.
- Fiechter, A. and Seghezzi, W. (1992). Growth and energy metabolism in aerobic fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*: Simulation and model verification. *Biotech. Bioeng.* 60: 474-482.

- Fish, R. and Block, D.E. (2003). Effect of Temperature on Yeast Growth and Performance in Normal and Problem Wine Fermentations. ASEV 54 th Meeting Reno, Nevada.
- Fleet, G.H. (1992). Spoilage Yeast. Crit. Rev. Biotech. 12: 1-44.
- Fleet, G.H. (1999). Microorganisms in Food ecosystems. Int. J. Food Microb. 50: 101-117.
- Fleet, G.H.(2001). *Schizosaccharomyces*. In: Encyclopedia of Food Microbiology. Robinson, R.K.; Batt, C.A. and Patel, P.D. (Eds). Academic Press, London 3: 1984-1989.
- Fleet, G.H. (2002). Wine. In: Food Microbiology Fundamentals and Frontiers, 2° Ed. Doyle, M. P.; Beuchat, L.R. and Montville, T.J. (Eds). ASM Press, Washington, D.C. pp. 747-752.
- Fleet, G.H. (2003). Yeast Interactions and Wine Flavor. Int. J. Food Microb. 86: 11-22.
- Fleet, G.H. and Heard, G.M. (1993). Yeasts – Growth during fermentation in Wine Microbiology and Biotechnology Ed., Fleet, G.H.) Harwood Academic Pubs. Australia, pp. 27-54.
- Fleet, G.H.; Prakichaiwattana, C.; Beh, A.L. and Heard, G. (2002). The yeast Ecology of Wine Grape. In: Wine Microbiology and Biotechnology Ed., Fleet, G.H.) Harwood Academic Pubs. Australia,.
- Florenzano, G.; Balloni, W. e Materassi, R. (1997). Contributo alla ecologia dei lieviti *Schizosaccharomyces* sulle uve. Vitis 16: 38-44.
- Fukuda, K.; Yamamoto, N.; Kiyokawa, Y.; Yanaquichi, G.; Wuakai, Y.; Kitamoto, K.; Inove, Y. and Kimura, A. (1998). Balance of Activities of alcohol Acetyltransferase and sterase in *Saccharomyces cerevisiae* is important for production of Isoamyl acetate. Appl. Envir. Microb. 64: 4076-4078.
- Gancedo, C. and Serrano, R. (1989). Energy-yielding metabolism. In: The Yeast (2nd ed.), vol. 3: Metabolism and Physiology of Yeast. Rose, A.H. and Harrison, J.S. (Eds.). Academic Press, New York, pp 205-259.
- Gao, C. and Fleet, G.H.; (1988). The Effect of Temperature and pH on the Ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. J. Appl. Bact. 65: 405-410.

- Gardner, N.; Rodriguez, N. and Champagne, C.P. (1993). Combined effects of sulfite, temperature and agitation time on production of glycerol in grape juice by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Envir. Microb.* 59,7: 2022-2028.
- Garraway, M.O. and Evans, R.C. (1984). *Fungal Nutrition and Physiology*. Wiley Interscience publication USA.
- Garsoux, G.; Haubursin, S.; Bilbault, S. and Dufour, J.P. (1993). Yeast flocculation: Biochemycal Characterization of yeast cell wall components. *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* 24: 275-282.
- Gerbaux, V. et Meurgues, O. (1995). Influence du sulfitage et du débourage des mouts sur lélaboration et la qualité des vins de Chardonnay. *Rev. des Enologues, France*, 78: 15-18.
- Giannessi, P. e Matta, M. (1978). Azoto Amminico in Trattato di Scienza e Technica Enologica. *Analisi e Controllo dei mosti e dei Vini (AEB Brescia, ed.)*. 1: 87-88.
- Goto, S.; Yamazaki, M.; Yamakawa, Y. and Yokotsuka, I. (1978). Decomposition of L-malic acid in grape must by wine and wild yeasts. *Hakko Kogaku Kaishi* 56: 133-135.
- Groenewald, M. and Viljoen-Bloom, M. (2001). Factors involved in the regulation of the *Schizosaccharomyces pombe* malic enzyme gene. *Curr. Genet.* 39: 222-230.
- Gump, B. and Pruett, D. (1993). *Beer and wine production, analysis characterization and technological advances*. ACS. Washington, DC, pp 192-194.
- Hansen, E.H.; Niccen, P.; Summer, P.; Nielsen, J.C. and Arneborg, N. (2001). The Effect of oxygen on the survival of *non Saccharomyces* yeast during mixed culture fermentation of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microb.* 91: 541-547.
- Harrigan W.F. y Mac Cance, M.E. (1979). *Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos*. Editorial Academia. León. España.
- Heard, G.M. and Fleet, G.H. (1986). Evaluation of Selective Media for Enumeration of Yeast During Wine Fermentation. *J. Appl. Bact.* 60: 477-481.

- Heard, G.M. and Fleet, G.H. (1988). Effects of temperature and pH on the growth of Yeast during the fermentation of grapejuice. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 23-28.
- Hendrickson, R. and Kesterston, J.W. (1965). By- Products of Florida Citrus. Composition, Technology and Utilization. Agricultural Experimental Stations. Bulletin 698. Florida, USA.
- Henick-Kling, T. and Edinger, W.D. (1996). Survey of available nitrogen for yeast growth in New York grape must. *Vitic. Enol. Sci.* 51: 169-174.
- Henick-Kling, T. and Park, Y.A. (1996). Considerations for the use of yeast and bacterial starter culture: SO₂ and timing of inoculation. *Am. J. Enol. Vitic.* 45: 464-469.
- Henschke, P.A. and Jiranek, V. (1993). Metabolism of Nitrogen compounds. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. Fleet, G.H. (Ed.). Harwood Academic Pubs. Australia, pp 27-54.
- Hernawan, T. and Fleet, G.H.; (1995). Chemical and cytological changes during the Autolysis of yeast. *J. Int. Microb.* 14: 440-450.
- Herraiz, T. y Cabezudo, M.D. (1989). Perspectivas del Uso del SO₂ en vinificación. *Rev. Agroq. Tecnol. Aliment.* 29, 3: 297-302.
- Hill, S Wenzel F.W. and Barreto A.(1954). A Colorimetric method for detection of spoilage in citrus juices. *Food Technol.* 8: 168-171
- Holt, J.C.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.H.; Staley, S.T. and Williams, S.T. (1994). *Bergey's Manual of determinative Bacteriology.. 9th Edition*
- Iavadekar, V.S.; Sivaraman, H.; Sainkar, S.R. and Khan, M.I. (2000). A mannose binding protein from the cell surface of flocculent *S. cerevisiae* (N.C.I.M. 3528): its role in flocculation. *Yeast.* 16: 99-110.
- ICMSF (1990). Internacional Comisión on Microbiological Specification for Food. *Ecología microbiana de los alimentos, Vol. II.* Acribia S.A. Zaragoza.
- Inchaurrondo, V.A.; Flores, M.V and Voget, C.E. (1998). Growth and galactosidase synthesis in aerobic chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis*. *J. Ind. Microb. Biotech.* 20: 291-298.
- Ingledeu, W.M. (1996). Nutrients, yeast hulls and proline in wine fermentation. *Die Wein.- Wissenschaft* 51,3: 141-46.

- Inove, Y.; Trevanichi, S.; Fukuda, K.; Izawa, S.; Wakai, Y. and Kimura, A. (1997). Roles of sterase and Alcohol- acetil transferase on production of Isoamyl Acetate in *Hansenula mrakii*. J. Agric. Food Chem. 45: 644-649.
- INV. Instituto Nacional de Vitivinicultura. República Argentina (1994). Prácticas Enológicas Lícitas y Resoluciones Reglamentarias.
- Ivorra, C.; Pérez-Ortín, J.E. and Del Olmo, M. (1999). An Inverse Correlation between stress resistance and stuck fermentations in Wine Yeast. A molecular Study. Biotech. Bioeng. 64: 698-708.
- Jarvis, B. (1996). Cider, Perry, Fruit Wine and Other Alcoholic Fruit Beverages. In: Fruit Processing. Arthey, D. and Ashurt, P. (Eds). Academic Press. London, pp: 97-103.
- Jenings, D.H. (1995). The Physiology of Fungal Nutrition. Cambridge University Press. Cambridge.
- Jin, J.L. and Speers, A. (2000). Effect of Environmental condition on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Am. Soc. Brew. Chem. 58: 108-116.
- Jin, Y.L.; Riteey, L.L.; Speer, A. and Dophi, P. (2001). Effect of cell-surface hydrophobicity, charge and zimolectin density on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Am. Soc. Brew Chem. 59: 1-9.
- Jones, R.P. (1989). Biological principles for the effects of ethanol. Enz. Microb. Biotech. 11: 130-53.
- Jordan, M.J.; Tillman, T.N.; Mucci, B. and Laencina, J. (2001). Using HS-SPME to determine the effects of reducing insoluble solids on aromatic composition of orange juice. Lebensm.-Wiss. U. Technol. 34: 244-250.
- Kallithraka, S.; Arvanitoyannis, I.S.; Kefalas, P.; El-Zajouli, A.; Soufleros, E. and Psarra, E. (2001). Instrumental and Sensory Analysis of Greek Wines; Implementation of Principal Component Analysis (P.C.A.) for Classification according to Geographical Origin. Food Chem. 73: 501-514.
- Kamada, K. and Morata, M. (1984). On the mechanism of brewer's yeast flocculation. Agric. Biol. Chem. 48: 2423-2433.
- Kimball, D. (1991). Citrus Processing. Quality Control and Technology. Ed. Van Nostrand Reinhold. New York.

- Kocková-Kratochvilová, A. (1990). Yeasts and Yeast-like Organisms. VCH Publishers (UK) Ltd. Wellington Court, Cambridge CB1 (Great Britain)
- Kolb, E. (2002). Vinos de Frutas. Elaboración Artesanal e Industrial. Editorial Acribia.S.A. Zaragoza. España.
- Kreger van Rij, M-J.W. (1984). The Yeast. A taxonomic study. Elsevier. Amsterdam.
- Kudo, M. and Vagnoli, P. (1998). Imbalance of potassium and hydrogen ion concentrations as a cause of stuck enological fermentations. Am. J. Enol. Vitic., 49: 295-301
- Lafon-Lafourcade, S. e Peynaud, E. (1974). Sur l'action antibacteriene de l'anhydride sulfureux sous forme libre et sous forme combinée. Connaiss. Vigne Vin. 8: 187-203.
- Lafon-Lafourcade, S. and Ribereau-Gayon, P. (1984). Developments in the microbiology of wine production. Prog. Ind. Microb. 19: 1-45.
- Lee, B.H. (1996). Fundamentos de Biotecnología de los Alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
- Lema, C.; Garcia- Jares, C.; Orrriols, I. and Angulo, L. (1996). Contribution of *Sacharomyces* and *non-Saccharomyces* populations to the aroma. Am. J. Enol. Vitic. 47: 206-216.
- Liden, G.; Person, A.; Gustasson, L. and Niklasson, C. (1995). Energetics and product formation by *Saccharomyces cerevisiae* grown in anaerobic chemostats under nitrogen limitation. J. Appl. Microb. Biotech. 43: 1034-1038.
- Lopez-Gaviño, S.; García-Martín, R.; Calderón-Fernandez, F.; Suárez-Lepe, J. A.; Palacios-Garcías, A.; Navascués A. y Lopez-Cordón, E. (2001). Implantación de Levaduras Seleccionadas durante la Fermentación. VI Jornadas Científicas. Valencia, España.
- Loureiro, V. and Querol, A. (1999). The prevalence and control of spoilage yeast in Food and Beverage. Trends Food Sci. Tech. 10,11: 356-365.
- Lubbers, C.; Verret, S. and Voilley, A. (2001). The Effect of Glycerol on the Perceived Aroma of a Model Wine and a White Wine. Lebensm. Wiss. U. Technol. 34: 262-265.
- Luh, B. S. and Wang, Z. (1984). Kiwifruit. Adv. Food Res. 29: 279-307.

- Mallouchos, A.; Komaitis, M.; Koutinas, H. and Kanellaki, M. (2003). Wine fermentations by immobilized and free cells at different temperatures. Effect of immobilization and temperature on volatile by-products. *Food.Chem.* 80: 109-113.
- Mamede, M.E.O.; Cardello, H.M.A.B. and Pastore, G.M. (2005). Evaluation of an aroma similar to that of sparkling wine: sensory and gas chromatography analyses of fermented grape must. *Food Chem.* 89: 63-68.
- Manginot, C. and Sablayrolles, J.M. (1997). Use of constant rate alcoholic fermentation to compare the effectiveness of different nitrogen sources added during the stationary phase. *Enz. Microb. Tech.* 20: 373-80.
- Manginot, C.; Roustan, J.L. and Sablayrolles, J.M. (1998). Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of stationary phase. *Enz. Microb. Tech.* 23: 511-17.
- Mannazzo, I.; Clementi, F. and Ciani, M. (2002). Strategies and Criteria for the Isolation and Selection of autochthonous Strains. In: Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeast Research Symposium, Kerala, India. Ciani, M. (Ed), pp 19-33.
- Martinez Rodríguez, A.G.; Carrascosa, A.V. y Polo, M.C. (2001). Evaluación del Proceso Autolítico de las Levaduras Usando Técnicas Químicas y de Microscopía. I.F.I.-Madrid. Ponencia.
- Martini, A. (1993). Origin and Domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* J. *Wine Res.* 4: 165-176.
- Martini, A.; Ciani, M. and Scorzetti, G. (1996). Direct Enumeration and Isolation of Wine Yeast from Grape Surfaces. *Am. J. Enol. Vitic.* 47: 435-440.
- Martini, A. (2003). Biotechnology of Natural and Winery-associated Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Microb.* 6: 207-209.
- Meikle, A.J; Chudek, J.A; Reed, R.H. and Gadd, G.M. (1991). Natural abundance C-13 nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of acyclic polyol and trehalose accumulation by several yeast species in response to salt stress. *FEMS Microb. Lett.* 82: 163-167.
- Menegazzo Gómez, J.M (1978). En: *Novos Enfoques en Microbiología Enológica*. Carrau, J.L.e Callegari Basso, R.M. (Eds.). Universidade de

Caixas do Sul, Brasil.pp 49-

- Mesas, J.M. y Alegre, M.T. (1999). El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 2,4: 174-183.
- Meurguest, O. (1996). La valorisation des arômes du Chardonnay en Bourgogne par les techniques de vinification. Les arômes du vin, caractérisation et genèse. E. Lallemand, (Toulouse) pp. 43-45.
- Mills, D.A.; Johannsen, E.A. and Cocolin. L. (2002). Yeast diversity and persistence in Botrytis Affected wine fermentation. *Appl. Envir. Microb.* 68: 4884-4893.
- Monk, P.R. (1982). Effect of nitrogen and vitamin supplements on yeast and rate of fermentation of wine Riesling grape juice. *Food Tech. in Australia* 34: 328-332.
- Monk, P.R. (1986). Rehydration and Propagation of Active dry wine Yeast. *Australian Wine Ind. J.* 1, 1: 3- 5.
- Morata, A.; Calderón, F.; Gonzalez, M.C.; Varela, F.; Colomo, B.; Uthurry, C. y Suarez Lepe, J.A. (2001). Primeros Criterios de Selección de Levaduras Para la Vinificación en Tinto. VI Jornadas Científicas. Valencia, España.
- Moreno, J.J.; Millan, C.; Ortega, J.M. and Medina, M. (1991). Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *J. Ind. Microb.* 7: 181-190.
- Morris, J.R.; Main, G. and Threfall, R. (1996). Fermentation: Problems, solutions and preventions. *Vitic. Enol. Sci.* (Fraund Verlag, Mainz) 51,3: 210 – 213.
- Mortimer, R.K. (2000). *Kloeckera apiculata* controls the rates of Natural fermentation. *Rev. Vitic. Enol.* 53: 61-68.
- Mortimer, R. and Polsinelli, M. (1999). On the origins of Wine Yeasts. *Res. Microb.* 150: 199-204.
- Nabais, R.C. and Sa-Correia, C.A. (1988). Influence of calcium ion and ethanol tolerance of *Saccharomyces bayanus* on alcoholic fermentation by yeast. *Appl. Envir. Microb.* 54: 2439-2446.
- Nagel, C.W. and Graber, W.R. (1988). Effect of must oxidation on quality of White wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 1-4.
- Nagel, C.W.; Anderson, J.D. and Weller, K.M. (2002). A comparison of the

fermentation patterns of six commercial wine yeast. *Vitis* 27: 173-182.

Nigam, P. (1999). Specific Aspects of Oenology. Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press. London.

Noble, A.C. and Bursick, G.F. (1984). The contribution of glycerol to perceived viscosity and sweetness in white wine. *J. Enol. Vitic.* 35: 110-112.

Nurgel, C.; Erten, H., Canbas, A.; Cabarôglu, T. and Selli, S. (2002). Influence of *Saccharomyces cerevisiae* strain on fermentation flavor compounds of White wine made from c.v. Emir grown in Central Anatoli, Turkey. *J. Ind. Microb. Biotech.* 29: 28-33.

Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. (O.I.V.) France.

Obisanya, M.O.; Aina, J.O.; Oguntimein, G.B. (1987). Production of Wine from Mango (*Magnifera indica* L.) using *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces* Species Isolated from Palm Wine. *J. Appl. Bact.* 63: 191-196.

Osothsilp, C. (1987). Genetic and biochemical studies of malic acid metabolisms in *Schizosaccharomyces pombe*. Ph.D. Thesis, University of Guelph, Ontario. Canadá.

Ough, C.S.; Huang, D. (1991). Amino uptake by four commercial yeasts at two different temperatures of growth and fermentation: Effect on urea excretion and readaptation. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 26-40.

Ough, C.S. (1996). Tratado Básico de Enología. Editorial Acribia. Zaragoza. España.

Palma, M. and García Barroso, C. (2002). Application of a new analytical method to determine the susceptibility of wine to browning. *Eur. Food Res. Tech.* 214: 441-443.

Pao, S.; Craig, L.D. (2000). Transfer of Natural and Artificially Inoculated Microorganisms from Orange Fruit to Fresh Juices During Extraction. Academic Press. London

Parish, M.E. and Higgins, D.P. (1989). Yeast and Molds Isolated from spoilage citrus products and by-products. *J. Food Protect.* 52: 261-263.

Pérez-Coello, M.S.; Briones-Pérez; A.J.; Ubeda Iranzo, J.F. and Martin-Alvarez, P.J. (1999). Characteristics of wine fermented with different *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from the La Mancha region.

- Food Microb. 16: 563-573.
- Perry, J.H. (1978). Manual del Ingeniero Químico. Editorial Hispano Americana, México. Tomo 1, p. 738.
- Petrik, M.; Käppeli, O. and Fiechter, A. (1983). An expanded concept for the glucose effect in the yeast *Saccharomyces uvarum*: involvement of short and long-term regulation. J. Gen. Microb. 129: 43-49.
- Pina, C.; Santos, C.; Cout, J.A.; Hogg, T. (2003). Ethanol Tolerance of Five non-*Saccharomyces* Wine Yeast in Comparison with a Strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Influence of Different Culture Conditions. Food Microb. 21: 439-447.
- Pitt, J.L. and Hocking, A.D. (1987). Fungi and Food Spoilage. Academic and Professional London Press. Australia.
- Plata, M.C.; Milán, M.C.; Valero, E.; Mauricio, J.C. y Ortega, J.M. (2000). Enzimas implicadas en la biosíntesis de acetatos con diferentes levaduras enológicas. Jornadas científicas '99. Grupos de Investigación Enológicas. Zaragoza. Ponencia.
- Polychroniadou, E.; Kanellaki, M.; Iconomopoulou, M.; Koutinas, A.A.; Marchant, R. and Banat, I.M. (2003). Grape and apple wine volatile fermentation products and possible relation to spoilage. Biores. Tech. 87: 337-339.
- Rainieri, S.; Zambonelli, C.; Giudici, P.; Castellari, L. (1998a). Characterisation of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* hybrids. Biotech. Lett. 20: 543-547.
- Rainieri, S.; Zambonelli, C.; Tini, V.; Castellari, I. and Giudici, P. (1998b). The enological traits of thermotolerant *Saccharomyces* strain. Am. J. Enol. Vitic. 49: 319-324.
- Ramón-Portugal, F.; Seiller, J.; Taillandier, P.; Favarel, J.L.; Nepveu, F.; Strehaiano, P. (1999). Kinetics of Production and Consumption of Organic Acids during Alcoholic Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Food Tech. Biotech. 37: 235-240.
- Rasmussen, J.E.; Schultz, E.; Snyder, R.E.; Jones, R.S. and Smith, C.R. (1995). Acetic acid as a causative agent in producing stuck fermentations. Am. J. Enol. Vitic. 46, 2: 278-80.
- Raspor, P.; Cus, F.; Jemec, K.P.; Zagore, T.; Cadez, N. and Nemanic, J. (2002).

- Yeast population dynamics in spontaneous and inoculated alcoholic fermentations of Zametovka must. *Food Tech. Biotech.* 40: 95-102.
- Redzepovic, S.; Orlic, S.; Majdak, A.; Kozina, B.; Volschenk, H. and Viljoen-Bloom, M.J. (2003). Differential malic degradation by selected strains of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation. *Int. J. Food Microb.* 83: 49-61.
- Reed, G. and Chan, S.L. (1979). Evaluating commercial active dry wine yeast by fermentation activity. *Am. J. Enol. Vitic.* 29: 165-168.
- Reed, G. and Peppler, H.J. (1973). *Yeast Technology*. The AVI Pub. Co. Westport, CN.
- Regodón, J.A.; Pérez, F.; Valdéz, M.E.; De Miguel, C. and Ramírez, M. (1997). A Simple and Effective Procedure for Selection of Wine Yeast Strain. *Food Microb.* 14: 247-254.
- Revilla, I. and González San José, M.L. (1998). Methanol release during fermentation of red grapes treated with pectolytic enzymes. *Food Chem.* 63, 3: 307-312.
- Reynolds, A.G.; Edwards, C.G.; Cliff, M.A.; Thorngate III and Marr, J.C. (2001a). Evaluation of Yeast strains during fermentation of Riesling and Chenin blanc musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 52, 4: 336-34.
- Reynolds, A.; Cliff, M.; Girard, B. and Kopp, G. (2001b). Influence of Fermentation Temperature on Composition and Sensory Properties of Semillon and Shiraz Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 52, 3: 235-240.
- Ribéreau – Gayón, J, Peynaud, E.; Sudraud, P. y Ribéreau – Gayón, P. (1980). *Tratado de Enología. Ciencia y Tecnología del Vino*. Editorial Hemisferio Sur S.A. Argentina.
- Rieger, M.; Käppeli, O. and Fiechter, A. (1983). The role of limited respiration in the incomplete oxidation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microb.* 129: 653-661.
- Rodríguez Mozaz, S.; García Sotro, J.; Garrido Segovia, C. and Ancin Azpilicueta, C. (1999). Influence of Decantation of Viura Musts on the Cation Content. Evolution during Wine Fermentation and Stabilization. *Food Res. Int.* 32: 683-689.
- Rodríguez, M.; Sadler, G.C.; Sims, C.A. and Braddock, R.J. (1991). Chemical Changes during Storage of an Alcoholic Orange Juice Beverage. *J. Food*

Sci. 56, 2: 475-493.

- Rodriguez, S.B. and Thorton, R.J. (1990). Factors influencing the utilization of L-malate by yeasts FEMS Microb. Lett. 72: 17-22.
- Rojas, V.; Gil, J.V.; Piñaga, F. and Manzanares, P. (2003). Acetate Ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. Int. J. Food Microb. 86: 181-188.
- Romano, P.; Granchi, L.; Caruso, M.; Borra, G.; Palla, G.; Fiore, C.; Ganucci, D.; Caligiani, A. and Brandolini, V. (2003). The Species-Specific Ratios of 2,3-butanediol and Acetoin Isomers as a Tool to Evaluate Wine Yeast Performance. Int. J. Food Microb. 86: 163-168.
- Romano, P. and Suzzi, G. (1993). Potential use for *Zigosaccharomyces* species in winemaking J. Wine Res. 4: 89-94.
- Rosse, A.H. and Harrison, J.S. (1987).. Yeast and the Environment. Academic Press. Harcourt Brace Jovanovich, Publicaciones. Vol. 2, cap. 5.
- Rosini, G.; Federici, F. and Martini, A. (1982). Yeasts Flora of Grape berries during repening. Microb. Ecol. 8, 83-89.
- Sabate, J.; Cano, J.; Esteve-Zarzoso, B. and Guillamon, J.M. (2002). Isolation and Identification of Yeasts associated with Vineyard and Winery by RFLP Análisis of ribosomal genes. Microb. Res. 157: 1-8.
- Saderra, i Jorba, Ll (1993). El Secreto de la Calidad Japonesa. El Diseño de Experimentos Clásico, Taguchi y Shainin. Editorial Marcombo. Barcelona.
- Salmon, J.M. (1987). L-Malic permeation in resting cells of anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta 901: 30-34.
- Sancho, T.; Giménez- Jurado, G.; Malfeito- Ferreira, C. and Loureiro, V. (2000). Zymological indicators a new concept applied to the detection of potential spoilage yeast species associated with fruti pulps and concentrate. Food Microb. 17: 613-624.
- Schultz, M. and Gafner, J. (1993). Sluggish alcoholic fermentation in relation to alterations of glucose-fructose ratio. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebenom. 15: 73-78.
- Selli, S.; Canbas, A. and Ünal, Ü. (2002). Effect of Bottle Color and Storage Conditions on Browning of Orange Wine. Nahrung/Food 46,2: 64-67.

- Selli, S.; Cabaroglu, T. and Canbas, A. (2003). Flavour components of orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Int. J. Food Sci. Tech.* 38, 5: 587-593.
- Shaw, P.E. (1994). Fruit juice. In: Kira-Othmer *Encyclopedia of Chemical Technology*, 4th ed. New York Wiley, pp: 1082-1097.
- Simón, B.; Fajardo, M.C.; Luna, N.e Hidalgo, P. (2001). Efecto de Distintos Parámetros Químicos en la Manifestación del Carácter Floculante de Levaduras Vínicas. VI Jornadas Científicas. Valencia, España.
- Smith, C.R. (1999). Vinovation, Inc. New Tools for an Ancient Craft Sebastopol, C.A. 95473.
- Smith, G. (1963). *Introducción a la Microbiología Industrial*. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Soares, E.V. and Seynaeve, J. (2000). Induction of Flocculation of Brewer's yeast Strain of *Saccharomyces cerevisiae* by Changing the Calcium Concentration and pH of Culture Medium. *Biotech. Lett.* 22: 1827-1832.
- Soden, A.; Francis, I.L.; Oakey, A. and Henschke, P.A. (2000). Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6: 21-30.
- Soufleros, E.H.; Pissa, I.; Petridis, D.; Lygerakis, K.; Mermelas, K.; Boukouvalas, G. and Tsimitakis, E. (2001). Instrumental análisis of volatile and other compounds of Greek Kiwi wine; sensory evaluation and optimisation of its composition. *Food Chem.* 75: 487-500.
- Stanier, R.Y.; Adelberg, E.A. and Ingraham, J.L. (1976). *Introduction to Microbial World*. Prentice – Hall, Englewood Cliffs, N.J.
- Stanley, G.A. and Douglas, N.G. (1993). Inhibition and stimulation of yeast growth by acetaldehyde. *Biotech. Lett.* 15: 1199-1204.
- Storey, R. and Treeby, M.T. (2000). Seasonal changes in nutrients concentrations of Navel orange fruit. *Sci. Hortic.* 84: 67-82.
- Stratford, M. (1992). Yeast flocculation: A new perspective. *Adv. Microb. Physiol.* 33: 2-71.
- Straver, M.H. and Kijne, J.W. (1996). A rapid and selective assay for measuring cell surface hidrophobicity of brewer's yeast cells. *Yeast* 12: 207-213.

- Suárez Lepe, J.A. (1997). Levaduras Vínicas. Funcionalidad y uso en bodegas. Editorial Mundi-Prensa. Madrid.
- Suárez Lepe, J.A. e Iñigo Leal, B. (1992). Microbiología Enológica. Fundamentos de Vinificación, 2º ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, pp. 133-159.
- Suárez-Lepe, J.A. (2002). Impacto de levaduras y bacterias en los aromas vínicos fermentativos I Encuentro Internacional de Ciencias Sensoriales y de la percepción. Ponencias C.S. 2002. J Sant Sadurni d'Anoia y Barcelona, España.
- Subden, R.E.; Krizus, A.; Osothsilp, C.; Viljoen, M. and Van Vauren, H.J.J. (1998). Mutational análisis of malate pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. Food Res. Int. 31: 37-42.
- Taillandier, P.; Gilis, M. and Strehaiano, P. (1998). Malate utilisation by *Schizosaccharomyces*: interactions with *Saccharomyces*. J. Biotech. 40: 199-205.
- Taillandier, P. and Strehaiano, P. (1991). The role of L-malic acid in the metabolism of *Schizosaccharomyces pombe*: sustrato consumption and cell growth. Appl. Microb. Biotech. 35: 541-543.
- Temperli, A.; Kunsch, V.; Mayer, K. und Bush, I. (1965). Reinigung and Eigenschaften der Malatdehydrogenase (decarbozilierent) aus Hefe. Biochim. Biophys. Acta 110: 630-632.
- Teunissen, A.; Holub, E.; Vander Hucht, J.; Van den Bergh, J.A. and Steensma, H.I. (1993). Sequence of the open reading frame of the FLO 1 gene from *S. cerevisiae*. Yeast 9: 423-427.
- Ting, S.V. and Rouseff, R.L. (1986). Citrus Fruits and their Products. Analysis and Technology.
- Torija Martinez, M J.; Beltran, G.; Novo, M.; Poblet, M.; Guillamón, J.M.; Mas, A. and Rozès, N. (2003). Effect of fermentation temperature and *Saccharomyces species* on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. Int. J. Food Microb. 85: 127-136.
- Torija, M.J. Rozès, N.; Poblet, M.; Guillamón, J.M. and Mas, A. (2003). Effect of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. Int. J. Food Microb. 80: 47-53.
- Tortia, C.; Gerbi, V. e Gandini, A. (1993). Impiego di *Saccharomyces cerevisiae*

maloalcolici in vinificazione. *Vignevine* 7-8, 15-20.

- Ubeda Iranzo, J.F.; González Magaña, F. and González Viñas, M.A. (2000). Evaluation of the formation of volatiles and sensory characteristics in the industrial production of white wines using different commercial strains of the genus *Saccharomyces*. *Food Cont.* 11: 143-147.
- Ubeda, J.F. and Briones, A.I. (2000). Microbiological quality control of filtered and non filtered wines. *Food Cont.* 10: 41-45.
- van der Westhuizen, T.; Augustyn, O.; Khan, W. and Pretorius, I.S., (2000b). Seasonal variation of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Vineyards of the Western Cape in South Africa. *South Afr. J. Enol. Vitic.* 21: 10-15.
- van Urk, H.; Leopold Voll, W.S.; Alexander Scheffers, W. and Van Dijken, J.P. (1989a) Transient-State Analysis of Metabolic Fluxes in Crabtree-Positive and Crabtree-Negative Yeasts. *Appl. Envir. Microb.* 56, 1: 281-287.
- van Urk, H.; Postma, E; Alexandre Scheffers, W. and Van Dijken, J.P. (1989b). Glucose Transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeast. *J. Gen. Microb.* 135: 2399-2406.
- Varela, F.; Uthurry, C.; Calderón, F.; González, M.C.; Colomo, B. y Suárez Lepe, J.A. (2001). Efecto de activadores de fermentación sobre la cinética fermentativa y producción de volátiles secundarios de distintas cepas de levadura. VI Jornadas Científicas 2001. Grupos de Investigación Enológica. Microbiología. Valencia, España.
- Varnam, A.H. y Sutherland, J.P. (1997). *Bebidas. Tecnología, Química y Microbiología*. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Vaughan-Martini and Martini, A. (1995). Facts, Myths and Legends on the prime Industrial Microorganisms. *J. Ind. Microb.* 14: 514-522.
- Velazquez, E.; Cruz-Sánchez, J.M.; Rivas- Palá, T.; Zurdo- Piñeiro, J.L.; Mateos, P.F.; Monte, E.; Martínez- Molina, E. and Chordi, A. (2001). Yeast Ident-Food Prole Food, a new system for the identification of food yeast based on physiological and biochemical biochemical test. *Food Microb.* 18: 637-646.
- Verstrepen, K.; Derdelinckx, G.; Verachtert, H.; Delvaux, F.R. (2003). Yeast Flocculation: GAT brewers should know. *Appl. Microb. Biotech.* 61:

197-205.

- Vidrih, R. and Hribar, J. (1999). Synthesis of Higher Alcohols During Cider Processing. *Food Chem.* 67: 287-294.
- Viljoen, M.; Van der Merwe, M.; Subden, R.E. and Van Vuren, A.J. (1998). Mutation of Gly-444 inactivates the *Schizosaccharomyces pombe* malic enzyme. *FEMS Microb. Lett.* 167: 157-162.
- Vogt, E. (1971). *La Fabricación de Vinos*. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Vogt, E.; Jakob, L. y Lemperle, E. (1986). *El vino: Obtención, elaboración y análisis*. 2º ed. Acribia. Zaragoza. España.
- von Loesecke, H.W.; Mottern, H.H. and Pulley, G.N. (1936). Wines, brandies, and cordials from citrus fruits. *Ind. Eng Chem.* 28: 1224-1229.
- Wahlstrom, V.E. and Fugelsang, K.C. (1987). Utilization of yeast Hulls in High and Low Temperature Fermentation of Grape Wines CATI Pub nº 880103.
- Walker, G.M. (1999). *Microbiology of Wine-making*. Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press. London.
- Ward, O. (1991). *Biología de la fermentación. Principios, procesos y productos*. Ed. Acribia. Zaragoza. España.
- Yeramian, N.; Varela, F.; Calderón, F.; Colomo, B.; Morata, A.; Suárez Lepe, J.A. (2001) y Sancho, E. D. Acidificación del mosto por *Saccharomyces spp.* VI Jornadas Científicas Grupos de Investigación Enológica. Microbiología. Valencia. España. Ponencia.
- Young-Hwan, K, Jae-Ha, K.; Jeang-Sa, K. and Chang-Jin, K. (1997). Screening and identification of the Yeast for orange wine and their citric acid decomposition. *Korean J. Food Sci. Tech.* 29,3: 588-594.
- Yuo-Young, W. and Guo-Qing, H. (2000). A primary study on the brewing technique of orange wine. *J. Zhejiang Univ. (Agriculture and Life Science)* 26,5: 513-515.
- Zohre, D.E. and Erten, H. (2002). The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeast on wine fermentation. *Proc. Bioch.* 38: 319-324.