



*Definir el aislamiento de levaduras saccharomyces spp desde las bayas de uva para la fermentación de una cerveza*

*Define the isolation of saccharomyces spp yeasts from grape berries for the fermentation of a beer*

*Definir o isolamento de leveduras saccharomyces spp de bagas de uva para a fermentação de uma cerveja*

Magna Gutiérrez Rodas <sup>I</sup>  
[mgutierrez@uagraria.edu.ec](mailto:mgutierrez@uagraria.edu.ec)  
<https://orcid.org/0000-0001-8165-5911>

Cristian Andrés Flores Cadena <sup>II</sup>  
[cflores@uagraria.edu.ec](mailto:cflores@uagraria.edu.ec)  
<https://orcid.org/0000-0000-0003-4071>

Daniel Borbor Suárez <sup>III</sup>  
[dborbor@uagraria.edu.ec](mailto:dborbor@uagraria.edu.ec)  
<https://orcid.org/0000-0002-6611-4911>

**Correspondencia:** [mgutierrez@uagraria.edu.ec](mailto:mgutierrez@uagraria.edu.ec)

Ciencias Técnica y Aplicadas  
Artículo de Investigación

\* **Recibido:** 23 de marzo de 2023 \* **Aceptado:** 12 de abril de 2023 \* **Publicado:** 05 de mayo de 2023

- I. Facultad de Ciencias Agrarias, Carrera de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Agraria del Ecuador.
- II. Facultad de Ciencias Agrarias, Carrera de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Agraria del Ecuador.
- III. Facultad de Ciencias Agrarias, Carrera de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Agraria del Ecuador.



## Resumen

El presente trabajo está basado en la investigación descriptiva. Para lo cual tiene por objeto aislar levaduras *Saccharomyces* a partir del mosto de uva fermentado y se evaluó su aplicación en procesos de fermentación de cerveza. La investigación consta de 5 etapas, en la primera se aisló ocho cepas de levadura del género *Saccharomyces*. Para el aislamiento se tomaron muestras de mosto fermentado de uva. Las colonias aisladas se evaluaron en su capacidad de tolerar sulfito utilizando metabisulfito de sodio (600 ppm) y aquellas que toleraron se consideraron representantes del género *Saccharomyces*. Luego, se hizo una evaluación morfológica de las colonias y células mediante microscopía óptica. Seguidamente, las cepas evaluadas se identificaron bioquímicamente utilizando Kit API ID32. En la segunda etapa se evaluó la capacidad de fermentación de las levaduras aisladas utilizando un medio sintético con diferentes fuentes de carbono: glucosa, fructosa, maltosa, lactosa y sacarosa. Los resultados mostraron que las cepas no fermentan lactosa, pero si los demás azúcares: glucosa, fructosa y sacarosa. En la tercera etapa se evaluó la capacidad fermentativa de las cepas a diferentes concentraciones de etanol: 2%, 6%, 10%, 14% y 18% v/v. Todas las cepas mostraron una buena capacidad fermentativa a concentraciones de etanol igual o mayor a 10% v/v. La cepa con mayor tolerancia al etanol (14 y 18% v/v) y rápida fermentación de maltosa fue seleccionada para posteriores ensayos. De las cepas evaluadas se seleccionó la que tuvo las mejores características. La cepa seleccionada (*Saccharomyces* C8) se evaluó en su capacidad fermentativa usando mosto de malta a diferentes temperaturas, concentración celular y grados plato. Para ello se utilizó un diseño factorial completo 2<sup>3</sup> con tres repeticiones y cuatro puntos centrales. Se determinó tres variables respuestas: producción de etanol, productividad de etanol y rendimiento de etanol.

**Palabras Clave:** Máster en Procesamientos de Alimentos; Ingeniera Agrícola Mención Agroindustrial; Docente Universidad Agraria del Ecuador.

## Abstract

This work is based on descriptive research. For which the purpose is to isolate *Saccharomyces* yeasts from the fermented grape must and its application in beer fermentation processes was evaluated. The investigation consists of 5 stages, in the first eight strains of yeast of the genus *Saccharomyces* were isolated. For isolation, samples of fermented grape must were taken. The

isolated colonies were evaluated for their ability to tolerate sulfite using sodium metabisulfite (600 ppm) and those that tolerated were considered representatives of the genus *Saccharomyces*. Then, a morphological evaluation of the colonies and cells was made by light microscopy. Next, the evaluated strains were biochemically identified using the API ID32 Kit. In the second stage, the fermentation capacity of the isolated yeasts was evaluated using a synthetic medium with different carbon sources: glucose, fructose, maltose, lactose and sucrose. The results showed that the strains do not ferment lactose, but the other sugars do: glucose, fructose and sucrose. In the third stage, the fermentative capacity of the strains was evaluated at different concentrations of ethanol: 2%, 6%, 10%, 14% and 18% v/v. All the strains showed a good fermentative capacity at ethanol concentrations equal to or greater than 10% v/v. The strain with the highest tolerance to ethanol (14 and 18% v/v) and rapid maltose fermentation was selected for subsequent trials. Of the evaluated strains, the one with the best characteristics was selected. The selected strain (*Saccharomyces* C8) was evaluated for its fermentative capacity using malt wort at different temperatures, cell concentrations and plato degrees. For this, a complete factorial design  $2^3$  with three repetitions and four central points was used. Three response variables were determined: ethanol production, ethanol productivity and ethanol yield.

**Keywords:** Master in Food Processing; Agricultural Engineer Mention Agroindustrial; Professor Agrarian University of Ecuador.

## Resumo

Este trabalho é baseado em pesquisa descritiva. Para o qual se pretende isolar leveduras *Saccharomyces* do mosto fermentado e avaliar a sua aplicação em processos de fermentação cervejeira. A investigação consiste em 5 etapas, na primeira foram isoladas oito linhagens de leveduras do gênero *Saccharomyces*. Para o isolamento, foram retiradas amostras de mosto de uva fermentado. As colônias isoladas foram avaliadas quanto à tolerância ao sulfito utilizando metabissulfito de sódio (600 ppm) e as que toleraram foram consideradas representantes do gênero *Saccharomyces*. Em seguida, foi feita uma avaliação morfológica das colônias e células por microscopia de luz. Em seguida, as cepas avaliadas foram identificadas bioquimicamente por meio do Kit API ID32. Na segunda etapa, foi avaliada a capacidade fermentativa das leveduras isoladas em meio sintético com diferentes fontes de carbono: glicose, frutose, maltose, lactose e sacarose. Os resultados mostraram que as cepas não fermentam a lactose, mas os outros açúcares sim:

glicose, frutose e sacarose. Na terceira etapa, a capacidade fermentativa das cepas foi avaliada em diferentes concentrações de etanol: 2%, 6%, 10%, 14% e 18% v/v. Todas as cepas apresentaram boa capacidade fermentativa em concentrações de etanol iguais ou superiores a 10% v/v. A cepa com maior tolerância ao etanol (14 e 18% v/v) e rápida fermentação da maltose foi selecionada para os ensaios subsequentes. Das cepas avaliadas, foi selecionada aquela com as melhores características. A cepa selecionada (*Saccharomyces* C8) foi avaliada quanto à sua capacidade fermentativa utilizando mosto de malte em diferentes temperaturas, concentrações celulares e graus platô. Para isso, foi utilizado um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> com três repetições e quatro pontos centrais. Três variáveis de resposta foram determinadas: produção de etanol, produtividade de etanol e rendimento de etanol.

**Palavras-chave:** Mestre em Processamento de Alimentos; Menção Engenheiro Agrônomo Agroindustrial; Professor Universidade Agrária do Equador.

## Introducción

La presente investigación descriptiva se basa en el estudio de nuevas levaduras que también es el interés al cual apuntan los cerveceros artesanales. Las levaduras tipo *Saccharomyces* pueden ser aisladas de diferentes medios, principalmente de plantas y frutos. Una forma más eficaz de poder aislar estas levaduras es cuando con las frutas se elabora un mosto y se deja en fermentación. Cuando la fermentación del mosto inicia, coexisten diferentes géneros de levaduras y bacterias, pero conforme se desarrolla el proceso fermentativo, el mosto aumenta su concentración en etanol eliminando la mayoría de las bacterias y levaduras que no toleran este compuesto o su tolerancia es baja. En este medio comienzan a desarrollarse unos pocos microorganismos con alta tolerancia al etanol, entre ellos destacan las levaduras del género *Saccharomyces*. Las cervezas generalmente tienen un grado alcohólico de 5% v/v, pero dentro de lo artesanal, es común encontrar cervezas con un mayor contenido de etanol hasta de un 11% que se asemejan al vino. Para estas condiciones es necesario emplear una levadura que tenga una tolerancia de etanol alta. Luego de establecer esta característica para la levadura, se debe tener en cuenta otros parámetros muy importantes para una cerveza diferenciada. Esta levadura debe ser capaz de fermentar los azúcares presentes en el mosto, principalmente la maltosa que se encuentra en mayor proporción (Willaert, 2016). Esta levadura

también debe producir aromas agradables y diferenciados. Esta última característica es muy valorada al momento de degustar una nueva cerveza.

Una forma de desarrollar nuevas variedades de cerveza es trabajar con diversos tipos de levaduras que aporten nuevos aromas y sabores que incrementen la calidad sensorial. Las cervecerías artesanales están buscando usar levaduras no convencionales para producir cervezas diferenciadas. Una especie que se está estudiando es *Saccharomyces ludwigii* con el objetivo de producir cervezas bajas en calorías y bajo en etanol (Gschaedler, 2017).

Es necesario conocer las características de la nueva levadura en lo que se refiere a parámetros de fermentación de cerveza, como son temperatura, concentración celular, grados plato y pH. El mosto de cerveza trabaja a un rango de pH entre 5.3 y 5,6 y conforme avanza la fermentación va disminuyendo hasta 4,2 (Kunze, 2006). La temperatura de fermentación influye de forma significativa en el producto final, así, a 4 temperaturas bajas (cervezas lager) se obtiene cervezas ligeras y ofrecen una variedad reducida de aromas, en cambio, a temperaturas más elevadas (cervezas ale) se obtiene una gama de aromas más diverso. En las cervezas artesanales es preferible trabajar a temperaturas altas debido al ahorro de costos y obtención de sabores y aromas diferenciados. Los grados plato indican la cantidad de sólidos totales presentes en el mosto y su concentración determina el grado alcohólico que se puede obtener luego de la fermentación. Es importante conocer la capacidad de fermentación de la levadura en un medio con diferentes grados plato. La cantidad de levaduras que se emplea determina la velocidad de fermentación, pero es necesario conocer un punto de equilibrio para obtener una buena calidad de fermentación y minimizar costos. Para conocer los parámetros de fermentación de una cepa de levadura, se debe realizar un diseño de experimentos, donde se busca optimizar las características más acertadas de la cepa y evaluar si es apta para llegar al objetivo que se desea lograr. Una forma de desarrollar nuevas variedades de cerveza es trabajar con diversos tipos de levaduras que aporten nuevos aromas y sabores que incrementen la calidad sensorial. Las cervecerías artesanales están buscando usar levaduras no convencionales para producir cervezas diferenciadas. Una especie que se está estudiando es *Saccharomyces ludwigii* con el objetivo de producir cervezas bajas en calorías y bajo en etanol (Gschaedler, 2017). Las levaduras tipo *Saccharomyces* pueden ser aisladas de diferentes medios, principalmente de plantas y frutos. Una forma más eficaz de poder aislar estas levaduras, es cuando con las frutas se elabora un mosto y se deja en fermentación. Cuando la fermentación del mosto inicia, coexisten diferentes géneros de levaduras y bacterias, pero conforme se desarrolla

el proceso fermentativo, el mosto aumenta su concentración en etanol eliminando la mayoría de bacterias y levaduras que no toleran este compuesto o su tolerancia es baja. En este medio comienzan a desarrollarse unos pocos microorganismos con alta tolerancia al etanol, entre ellos destacan las levaduras del género *Saccharomyces*.

## **Materiales y métodos**

### ***Recolección y acondicionamiento de la muestra***

El aislamiento de levaduras se realizó a partir de uvas negras (Se tomó una muestra de 1 Kg de uvas negras de mesa). El acondicionamiento se realizó de la siguiente manera; las bayas de uva negra se trituraron mecánicamente sin lavar utilizando guantes quirúrgicos de látex en un recipiente previamente aseptizado. El mosto conteniendo los orujos se dejó fermentar a temperatura ambiente por diez días en un recipiente hermético previamente aseptizado, el cual se tapó con un tapón de algodón para dejar liberar la presión generada por el CO<sub>2</sub> durante la fermentación.

### ***Aislamiento de colonias***

El aislamiento de levaduras se llevó a cabo utilizando medio de cultivo sólido de la siguiente composición: extracto de malta (15.0 g/L); peptona bacteriológica (5.0 g/L); fosfato de amonio (1.0 g/L); glucosa (20.0 g/L) y agar (18.0 g/L). Se preparó 30 ml de agar, se licuó y se vertió en tres tubos de ensayo y se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos. Luego de la esterilización, los tubos de ensayo conteniendo medio de cultivo se dejaron enfriar hasta una temperatura de aproximadamente 45°C. Al primer tubo conteniendo aproximadamente 10 ml de medio se añadió 100 µL del mosto fermentado, se homogenizó y luego se tomó 100 µL de medio de este y se adicionó al siguiente tubo de ensayo. De esta manera se hicieron tres diluciones sucesivas. El contenido de cada tubo se vertió en placas Petri sin dejar solidificar y se incubaron a 25 °C por 48 horas. Durante la incubación se observaron el crecimiento de colonias, las cuales sirvieron para continuar con el aislamiento de levaduras *Saccharomyces*.

### ***Evaluación de tolerancia al metabisulfito de sodio***

Las colonias aisladas fueron evaluadas en su capacidad de tolerar metabisulfito de sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), el cual tiene actividad microbiana frente a bacterias y levaduras no *Saccharomyces*. Para ello se utilizó medio de cultivo líquido de la siguiente composición: extracto de malta (15.0

g/L); peptona bacteriológica (5.0 g/L); fosfato de amonio (1.0 g/L); glucosa (20 g/L) y metabisulfito de sodio (600 mg/L). Se preparó 30 ml de medio y se vertió en tres tubos de ensayo y se esterilizó a 121 °C por 15 minutos. Luego, los tubos esterilizados se dejaron reposar por 8 horas para permitir la disociación completa del metabisulfito de sodio y obtener el compuesto activo antimicrobiano (SO<sub>2</sub>). Seguidamente, con un asa de siembra estéril y en una cámara de flujo laminar se tomaron asadas de colonias de la superficie de las placas Petri obtenidas en la Sección 2.2 y se inocularon en los tubos de ensayo y se incubaron por 2 días a 25 °C. Al término de la incubación se observó la producción de burbujas en los tubos como un indicativo de la actividad fermentativa de levaduras *Saccharomyces*.

### ***Evaluación de la tolerancia al etanol***

Las levaduras sobrevivientes al efecto del metabisulfito de sodio (Sección 2.3.) fueron sometidas a altas concentraciones de etanol. Las levaduras *Saccharomyces* típicamente toleran altas concentraciones de etanol, el cual tiene actividad antimicrobiana. Para ello se utilizó medio de cultivo de la siguiente composición: extracto de malta (15.0 g/L); peptona bacteriológica (5.0 g/L); fosfato de amonio (1.0 g/L) y glucosa (20 g/L). Se preparó 30 ml de medio y se vertió en tres tubos de ensayo y se esterilizaron a 121°C por 15 minutos. Luego, a los tubos se adicionaron etanol absoluto hasta alcanzar una concentración del 15% v/v de etanol en una cabina de flujo laminar. Seguidamente cada tubo se inoculó con 100 µL del caldo fermentado sulfitado obtenido en los ensayos de tolerancia al metabisulfito (Sección 2.3) y se incubó a 25 °C por 48 horas. Al término del cultivo se observó la producción de CO<sub>2</sub> y turbidez, el cual es indicativo de la actividad de levaduras *Saccharomyces*.

### ***Aislamiento de levaduras *Saccharomyces****

Las levaduras sobrevivientes a los tratamientos con metabisulfito y etanol fueron cultivadas en medio sólido de la siguiente composición: extracto de malta (15.0 g/L); 32 peptona bacteriológica (5.0 g/L); fosfato de amonio (1.0 g/L), glucosa (20 g/L) y agar (18.0 g/L). El medio se esterilizó a 121 °C por 15 minutos y luego se vertió en placas Petri. Luego se tomó 100 µL de muestra del medio fermentado obtenido en la Sección 2.4, y se añadió a un tubo de ensayo conteniendo 10 ml agua estéril y se realizó 3 diluciones sucesivas en agua destilada estéril tomando muestras de 100 µL del tubo anterior. Seguidamente, de cada dilución se tomó 50 µL y se inoculó asépticamente

con un asa de Drigalsky en las placas Petri conteniendo medio sólido esparciendo homogéneamente. Las placas Petri se incubaron a 25°C por 48 horas hasta observar el crecimiento de colonias separadas y definidas las cuales posteriormente fueron individualmente inoculadas en tubos de ensayo conteniendo agar inclinado de la misma composición e incubadas por 48 horas a 25°C.

### ***Evaluación microscópica y selección de colonias***

Colonias de levaduras *Saccharomyces* fueron evaluadas microscópicamente con la finalidad de verificar su morfología. Para ello cada aislado se sembró en placas Petri conteniendo medio sólido de la siguiente composición: extracto de malta (15.0 g/L); peptona bacteriológica (5.0 g/L); fosfato de amonio (1.0 g/L), glucosa (20 g/L) y agar (18.0 g/L) e incubado a 25°C por 48 horas. Las colonias fueron observadas en un microscopio óptico a un aumento de 40X y de ellas se seleccionaron ocho al azar para los ensayos posteriores. Las levaduras *Saccharomyces* seleccionadas fueron mantenidas en refrigeración a 7°C y renovadas cada tres meses.

### ***Evaluación de la capacidad fermentativa de azúcares***

Las levaduras seleccionadas (ocho en total) fueron evaluadas en su capacidad de fermentar diferentes azúcares: glucosa, fructosa, maltosa, lactosa y sacarosa. Los experimentos se realizaron en medio líquido de la siguiente composición: azúcar (20.0 g/L), extracto de levadura (10.0 g/L); peptona bacteriológica (5.0 g/L); sulfato de magnesio (0.5 g/L) y fosfato de amonio (1.0 g/L). La fermentabilidad de azúcares se evaluó a través de la producción de CO<sub>2</sub> utilizando tubos Durham. Para ello se vertió medio de cultivo en tubos de ensayo y seguidamente se colocaron campanas Durham en el interior cuidando en no dejar burbujas de aire dentro de ellas. Luego los tubos se 33 autoclavaron, se dejaron enfriar y cada uno se inoculó con dos asadas de la respectiva levadura. Los tubos inoculados se incubaron a 25°C por 48 horas. La actividad fermentativa se evidenció mediante la producción de CO<sub>2</sub> acumulado dentro de las campanas Durham cada 12 horas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### ***Evaluación de la capacidad de fermentación y selección de levadura***

La capacidad fermentativa de las levaduras aisladas se evaluó mediante ensayos de fermentación a diferentes concentraciones de etanol. En los ensayos se utilizó medio de cultivo de la siguiente

composición: extracto de malta (15.0 g/L); peptona bacteriológica (5.0 g/L); fosfato de amonio (1.0 g/L) y glucosa (20.0 g/L). El medio de cultivo se vertió en tubos de ensayo y seguidamente se colocaron campanas Durham dentro de ellas teniendo cuidado en no dejar burbujas de aire. Luego, los tubos de ensayo se esterilizaron, enfriaron y asépticamente se adicionaron etanol absoluto hasta alcanzar concentraciones de 2%, 6%, 10%, 14% y 18% v/v respectivamente. Posteriormente los tubos de ensayo se inocularon con dos asadas de la respectiva levadura y se incubaron a 25°C por 4 días. La intensidad de fermentación en cada caso se evaluó cada 12 horas mediante la observación de producción de gas en las campanas Durham. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y la intensidad de fermentación se reportó como el promedio de las tres observaciones. A partir de los resultados obtenidos se seleccionó la cepa que presentó las mejores características en términos de velocidad de fermentación y poder fermentativo a altas concentraciones de etanol. La capacidad fermentativa y la velocidad de fermentación se determinó de manera cualitativa en base a la intensidad de producción de gas observado en las mediciones realizadas.

### ***Evaluación bioquímica***

Para determinar el género y especie de la cepa de levadura seleccionada se realizó una identificación bioquímica más completa mediante la utilización de un kit API. Se utilizó un el kit API ID 32C que es un test de asimilación de nutriente. Cuenta con 32 celdas distintas de fuente de carbono, cuando la levadura es capaz de asimilar la fuente de carbono de las celdas, forma una aglutinación en el medio dando una reacción positiva. El kit también presenta un pocillo adicional con esculina, para una reacción auxiliar en caso el sistema muestre una baja diferenciación entre dos especies. 34 Para realizar el ensayo, la muestra de levadura se diluyó en 3 ml de agua hasta alcanzar una concentración de 2 Macfarlán, luego se tomó 250 uL de la muestra y se adicionó al medio API ID 32C. Seguidamente se homogenizó y se adicionó 135 uL a cada celda del API ID 32C, luego se tapó y se colocó en incubación a 30 °C. Se realizaron evaluaciones de aglutinación luego de 24 y 48 horas. La identificación se realizó usando el API software (BioMérieux, manual API ID 32C).

### ***Fermentación de mosto de malta en matraces***

**Propagación de la levadura** La cepa de levadura seleccionada en la Sección 2.8 fue propagada en mosto de malta de 8°Brix. El medio de propagación fue preparado a partir de un concentrado comercial de mosto de malta usado en la producción de cerveza. El mosto se ajustó a 8 °Brix con agua destilada y se pasteurizó a 105°C por 8 minutos. Luego se vertió 100 mL de mosto en matraces de 250 mL y se inoculó con dos asadas de la levadura seleccionada. La propagación se realizó en agitación (150 rpm) en un agitador orbital a temperatura ambiente por 48 horas. Luego de la propagación las células se colectaron mediante centrifugación a 3600 rpm por 10 minutos. Las células se suspendieron en 5 mL de mosto fresco y se procedió a determinar la concentración de células viables utilizando una cámara de Neubauer y la metodología de tinción con azul de metileno (EBC, 1962).

**Fermentación de mosto de malta** En los experimentos de fermentación, se empleó mosto de malta concentrado (85 °Brix) el cual fue diluido con agua destilada hasta obtener valores determinados. Las variables que se estudiaron fueron concentración de extracto seco (ES) del mosto (14 y 20°P), temperatura (T°) de fermentación (12 y 18°C) y concentración de inóculo (CI) ( $1 \times 10^{-6}$  y  $1 \times 10^{-8}$  células/mL) para ver sus efectos en la producción, productividad y rendimiento de etanol. Para ello se utilizó un diseño factorial completo 23 con 3 repeticiones resultando en total 24 tratamientos. Las fermentaciones se realizaron a condiciones estáticas y se monitorearon mediante el pH y °Brix. La determinación del 35 etanol producido se llevó a cabo por picnometría. El azúcar residual se determinó mediante oxidación química utilizando ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959).

**Fermentación de cerveza en biorreactor** Los ensayos de fermentación se realizaron en un biorreactor airlift (5L) a las condiciones definidas anteriormente que incluyen extracto seco del mosto, temperatura y densidad celular (Sección 2.9.2). El biorreactor estuvo provisto de un sistema de enfriamiento, un tubo interno concéntrico, suministro de aire controlado por un rotámetro, un difusor colocado en la parte inferior de material poroso, entradas para electrodos de pH, oxígeno disuelto y toma de muestra. El cultivo en biorreactor se realizó con un volumen de trabajo de 2.7 L, pH del mosto de 5.5 y flujo de aireación de 0.075 vvm. La cerveza producida se evaluó sensorialmente mediante pruebas afectivas utilizando una escala hedónica de cinco puntos (1: me desagrada mucho y 5: me agrada mucho). Se evaluaron atributos tales como sabor y aroma utilizando un panel compuesto por 10 jueces no entrenados entre 20 y 25 años de edad. Los jueces se seleccionaron en base considerando que no sean bebedores frecuentes o abstemios.

## **Resultados y discusión**

### ***Aislamiento de colonias, tolerancia al metabisulfito y etanol***

Se aislaron microorganismos a partir de mosto de uva fermentado. El tiempo de fermentación (10 días) influyó en el proceso de selección natural de levaduras. Se ha reportado que las levaduras más tolerantes al etanol tales como *Saccharomyces* sobreviven hacia el final de la fermentación (Albergaria y Arneborg, 2016). Seguidamente, las colonias aisladas se sometieron a la actividad del metabisulfito (600 mg/L), el cual tiene actividad antimicrobiana contra bacterias lácticas, acéticas y levaduras no-*Saccharomyces*. Se ha reportado que las levaduras *Saccharomyces* son capaces de tolerar altas concentraciones de sulfito (200.0 mg/L) en comparación con las bacterias lácticas y acéticas y también levaduras no-*Saccharomyces* (Miranda et al., 2015). El uso de antimicrobianos se ha realizado desde mucho tiempo atrás por ejemplo en la producción de vinos. Por ejemplo, los tanques de fermentación y utensilios se desinfectan con azufre con la finalidad de eliminar los microorganismos indeseables que podían afectar la calidad de los vinos. Posteriormente, las colonias tolerantes al metabisulfito fueron sometidas a la actividad de etanol (15 % v/v). Se ha demostrado que el etanol tiene actividad antimicrobiana debido a que interrumpe la actividad enzimática dentro de la célula. Las levaduras del género *Saccharomyces* se caracterizan por tolerar altas concentraciones de etanol y por ello se utiliza en la producción de vinos y bioetanol (Lewis, 2010). La presencia de metabisulfito y etanol en un medio de fermentación tiene un efecto sinérgico mayor que el efecto individual de cada uno. Se ha reportado que la utilización de metabisulfito de sodio (200 mg/L) y etanol (12 % v/v) resultó en la sobrevivencia del 56% de levaduras *Saccharomyces* en experimentos realizados con un caldo nutritivo-dextrosa para levaduras a 25 °brix, pH de 3,5 y durante un tiempo 15 horas. (Miranda et al., 2015). Al término de los ensayos de tolerancia al etanol, se obtuvieron colonias de levaduras del género *Saccharomyces* resistentes al metabisulfito y etanol. Seguidamente se evaluó la morfología de las colonias y células por microscopía óptica. Las colonias y células que presentaron morfologías típicamente relacionadas al género *Saccharomyces* fueron seleccionadas.

### ***Fermentación de azúcares***

Las levaduras seleccionadas (ocho cepas) fueron evaluadas en su capacidad de fermentar azúcares tales como: glucosa, maltosa, sacarosa, fructosa y lactosa. Los resultados de fermentación se

muestran en la tabla 1. Se ha observado que todas las levaduras aisladas fueron capaces de fermentar glucosa y fructosa monosacáridos abundantes en jugos de frutas tales como uva, manzana, pera, etc. Sin embargo, las levaduras (C6, C7 y C8) fueron capaces de fermentar sólo sacarosa (disacárido presente en el jugo de caña de azúcar) y maltosa, disacárido que resulta de la hidrólisis del almidón de la cebada. En procesos de fermentación de vinos se desea aquellas levaduras capaces de fermentar principalmente glucosa y fructosa. Por otro lado, en procesos de fermentación de cerveza se desea levaduras capaces de fermentar principalmente maltosa. La capacidad de las levaduras para fermentar disacáridos se debe a la producción de enzimas que rompen enlaces glucosídicos y liberan monosacáridos (glucosa, fructosa o galactosa). Asimismo, no se observó fermentación de lactosa por las levaduras, lo que indica que no fueron capaces de romper el enlace glucosídico entre glucosa y galactosa. De todas las levaduras evaluadas, C6, C7 y C8 fueron capaces de fermentar la mayor cantidad de azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa). Ellas mostraron una fermentación intensa a las 24 horas para el caso de glucosa y sacarosa. En el caso de fructosa la mayor fermentación se observó a la 30 hora de fermentación. La fuerza de fermentación de maltosa fue alta para las tres levaduras *Saccharomyces* aisladas. Es sabido que las levaduras utilizan los azúcares en base a su grado de complejidad, así fermentan primero los monosacáridos, luego los disacáridos, trisacáridos y los azúcares más complejos (Hunze, 2006).

**Tabla 1.**

*Capacidad de fermentación de azúcares por las levaduras seleccionadas.*

| Cepas   | DEXTROSA |     |     |     | SACAROSA |     |     |     | FRUCTOSA |     |     |     | MALTOSA |     |     |     | LACTOSA |    |    |    |
|---------|----------|-----|-----|-----|----------|-----|-----|-----|----------|-----|-----|-----|---------|-----|-----|-----|---------|----|----|----|
|         | 12h      | 18h | 24h | 30h | 12h      | 18h | 24h | 48h | 12h      | 18h | 24h | 30h | 12h     | 24h | 30h | 36h | 12h     | 1d | 2d | 3d |
| C1      | -        | +   | ++  | +++ | -        | -   | -   | -   | -        | *   | ++  | +++ | -       | -   | -   | -   | -       | -  | -  | -  |
| C2      | -        | -   | +   | ++  | -        | -   | -   | -   | -        | *   | ++  | +++ | -       | -   | -   | -   | -       | -  | -  | -  |
| C3      | -        | -   | +   | ++  | -        | -   | -   | -   | -        | *   | ++  | +++ | -       | -   | -   | -   | -       | -  | -  | -  |
| C4      | -        | -   | +   | ++  | -        | -   | -   | -   | -        | *   | ++  | +++ | -       | -   | -   | -   | -       | -  | -  | -  |
| C5      | -        | +   | ++  | ++  | -        | -   | -   | -   | -        | *   | ++  | +++ | -       | -   | -   | -   | -       | -  | -  | -  |
| C6      | +        | ++  | +++ | +++ | +        | ++  | +++ | +++ | +        | +   | ++  | +++ | -       | +   | ++  | +++ | -       | -  | -  | -  |
| C7      | +        | ++  | +++ | +++ | +        | +   | +++ | +++ | -        | *   | ++  | +++ | -       | +   | ++  | +++ | -       | -  | -  | -  |
| C8      | +        | ++  | +++ | +++ | +        | +   | +++ | +++ | +        | +   | ++  | +++ | -       | +   | +++ | +++ | -       | -  | -  | -  |
| Control | -        | +   | ++  | +++ | -        | +   | ++  | +++ | -        | *   | ++  | +++ | -       | ++  | +++ | +++ | -       | -  | -  | -  |

(-): Fermentación nula; (+): Fermentación débil; (++) Fermentación moderada y (+++): Fermentación intensa. Los signos positivos indican la acumulación de CO<sub>2</sub> en los tubos Durham (longitud = 5 cm) y desplazamiento del medio líquido, así: (+) = <2.5 cm; (++) = ≥ 2.5 cm y (+++) = desplazamiento total del líquido. Levadura control: *Saccharomyces pastorianus* SafLager W-34/70.

Aparte de la producción de gas, la formación de película sobre la superficie del medio es una característica importante, ya que está relacionado con el requerimiento de oxígeno por los microorganismos. De todas las levaduras ensayadas, ninguna fue capaz de formar película durante

el tiempo de fermentación. Además de la producción de gas y formación de película, se ha evaluado la formación de turbidez en los tubos de ensayo, el cual está asociado a la intensidad de crecimiento de las levaduras. Los resultados de formación de turbidez se muestran en la Tabla 2. Las levaduras C1, C2, C3, C4 y C5 formaron turbidez cuando fueron cultivadas en glucosa y fructosa, lo que está relacionado con la afinidad por estos azúcares. Las levaduras C6, C7 y C8 formaron turbidez en presencia de glucosa, fructosa y sacarosa, sin embargo, en presencia de maltosa y lactosa no se observó dicha característica. La formación de turbidez, el cual es un indicativo del crecimiento celular está relacionada con el metabolismo del azúcar y otros nutrientes, entre ellos, los aminoácidos y oxígeno. El agotamiento de este último conduce al detenimiento del crecimiento.

**Tabla 2.**

*Formación de turbidez por las levaduras en fermentaciones con diferentes azúcares.*

| Cepas   | DEXTROSA |     |     |     | SACAROSA |     |     |     | FRUCTOSA |     |     |     | MALTOSA |     |     |     | LACTOSA |    |    |    |
|---------|----------|-----|-----|-----|----------|-----|-----|-----|----------|-----|-----|-----|---------|-----|-----|-----|---------|----|----|----|
|         | 12h      | 18h | 24h | 30h | 12h      | 18h | 24h | 48h | 12h      | 18h | 24h | 30h | 12h     | 24h | 30h | 36h | 12h     | 1d | 2d | 3d |
| C1      | -        | -   | +   | +   | -        | -   | -   | -   | -        | +   | +   | +   | -       | -   | -   | -   | -       | -  | -  | -  |
| C2      | -        | -   | +   | +   | -        | -   | -   | -   | -        | +   | +   | +   | -       | -   | -   | -   | -       | -  | -  | -  |
| C3      | -        | -   | +   | +   | -        | -   | -   | -   | -        | +   | +   | +   | -       | -   | -   | -   | -       | -  | -  | -  |
| C4      | -        | -   | +   | +   | -        | -   | -   | -   | -        | +   | +   | +   | -       | -   | -   | -   | -       | -  | -  | -  |
| C5      | -        | -   | +   | +   | -        | -   | -   | -   | -        | +   | +   | +   | -       | -   | -   | -   | -       | -  | -  | -  |
| C6      | +        | +   | +   | +   | +        | +   | +   | +   | +        | +   | +   | +   | -       | -   | -   | -   | -       | -  | -  | -  |
| C7      | +        | +   | +   | +   | +        | +   | +   | +   | +        | +   | +   | +   | -       | -   | -   | -   | -       | -  | -  | -  |
| C8      | +        | +   | +   | +   | +        | +   | +   | +   | +        | +   | +   | +   | -       | -   | -   | -   | -       | -  | -  | -  |
| Control | +        | +   | +   | +   | +        | +   | +   | +   | +        | +   | +   | +   | -       | -   | -   | -   | -       | -  | -  | -  |

Dónde: (-): sin turbidez y (+): turbidez.

### **Capacidad fermentativa en presencia de etanol**

Los resultados de la capacidad fermentativa de las levaduras a diferentes concentraciones de etanol se muestran en la Tabla 3. Se observó que las levaduras C1, C2, C3, C4 y C5 fueron capaces de fermentar en presencia de concentraciones de etanol de 2 y 6% v/v evaluados en 3 días. Sin embargo, concentraciones mayores (10, 14 y 18% v/v) inhibieron la actividad fermentativa. Se ha reportado que el etanol afecta primero la capacidad de fermentar de las levaduras y posteriormente su viabilidad. Así altas concentraciones detienen la actividad enzimática paulatinamente deteniendo toda actividad metabólica lo que conduce a su muerte. Por otro lado, las levaduras C6, C7 y C8 mostraron una capacidad de fermentar a 10, 14 y 18% v/v de etanol. Un aspecto 40 resaltante es que la levadura control (*Saccharomyces pastorianus* SafLager W-34/70) no fue capaz de fermentar a 18% v/v de etanol hacia el 4to día de fermentación. De las levaduras con capacidad de fermentar a 10, 14 y 18% v/v de etanol la cepa C6 mostró mejores características. Desde el punto

de vista de producción de vinos y cervezas, levaduras capaces de fermentar a altas concentraciones de etanol son requeridas ya que permite obtener bebidas con diferentes grados alcohólicos. Está reportado que levaduras no-*Saccharomyces* no son capaces de tolerar altas concentraciones de etanol y se inhiben rápidamente a medida que la concentración aumenta. Miranda et al. (2015), evaluaron la capacidad fermentativa de levaduras *Saccharomyces* que aislaron a partir de mosto de uva, encontrando que fermentaron con normalidad a una concentración de 12% de etanol. Por otro lado, Guzmán (2012), evaluó el efecto de diferentes concentraciones de etanol (10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22 %v/v) sobre la viabilidad de tres cepas de levaduras *Saccharomyces* spp., nativas. Los resultados mostraron que la viabilidad celular disminuye a medida que aumenta la concentración de etanol desde 18, 20 y 22%v/v durante 24 horas. La capacidad de fermentar a altas concentraciones de etanol está relacionada con la su tolerancia a este compuesto, el cual desestabiliza la membrana celular y la presencia de algunas proteínas y aminoácidos como la prolina (Lewis, 2010; Venegas et al., 2012).

**Tabla 3.**

*Capacidad fermentativa de levaduras a diferentes concentraciones de etanol.*

|         | ETANOL 2% |     |     |     | ETANOL 6% |     |     |     | ETANOL 10% |    |     |     | ETANOL 14% |     |     |     |     | ETANOL 18% |    |    |     |     |
|---------|-----------|-----|-----|-----|-----------|-----|-----|-----|------------|----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|------------|----|----|-----|-----|
|         | 12h       | 1d  | 2d  | 3d  | 12h       | 1d  | 2d  | 3d  | 12h        | 1d | 2d  | 3d  | 12h        | 24h | 36h | 48h | 3d  | 12h        | 1d | 2d | 3d  | 4d  |
| C1      | -         | -   | +   | +++ | -         | -   | +   | +   | -          | -  | -   | -   | -          | -   | -   | -   | -   | -          | -  | -  | -   | -   |
| C2      | -         | -   | +   | ++  | -         | -   | +   | +   | -          | -  | -   | +   | -          | -   | -   | -   | -   | -          | -  | -  | -   | -   |
| C3      | -         | -   | +   | ++  | -         | -   | +   | +   | -          | -  | -   | -   | -          | -   | -   | -   | -   | -          | -  | -  | -   | -   |
| C4      | -         | -   | +   | ++  | -         | -   | +   | +   | -          | -  | -   | -   | -          | -   | -   | -   | -   | -          | -  | -  | -   | -   |
| C5      | -         | -   | +   | ++  | -         | -   | +   | +   | -          | -  | -   | -   | -          | -   | -   | -   | -   | -          | -  | -  | -   | -   |
| C6      | +         | +++ | +++ | +++ | -         | +++ | +++ | +++ | -          | ++ | +++ | +++ | -          | +   | ++  | +++ | +++ | -          | -  | ++ | +++ | +++ |
| C7      | +         | +++ | +++ | +++ | +         | +++ | +++ | +++ | -          | ++ | +++ | +++ | -          | -   | +   | +++ | +++ | -          | -  | +  | +   | ++  |
| C8      | +         | +++ | +++ | +++ | -         | +++ | +++ | +++ | -          | +  | +++ | +++ | -          | -   | +   | ++  | +++ | -          | -  | +  | +   | ++  |
| Control | -         | +   | +++ | +++ | -         | +   | +++ | +++ | -          | +  | +++ | +++ | -          | -   | +   | +++ | +++ | -          | -  | -  | -   | -   |

Dónde: (-): Fermentación nula; (+): Fermentación débil; (++) Fermentación moderada y (+++): Fermentación intensa. Los signos positivos indican la acumulación de CO<sub>2</sub> en los tubos Durham (longitud = 5 cm) y desplazamiento del medio líquido, así: (+)= <2.5 cm; (++) = ≥ 2.5 cm y (+++) = desplazamiento total del líquido.

Adicionalmente se evaluó la formación de turbidez por las levaduras aisladas (Tabla 4). Los resultados mostraron la formación de turbidez tenue en todos los ensayos realizados a una concentración de etanol de 2%v/v. La turbidez está relacionada con el crecimiento celular y la utilización de la fuente de carbono como fuente de energía. Así, una concentración de etanol del 2%v/v no mostro detener el metabolismo energético fundamental para el crecimiento celular. Por

otro lado, sólo las levaduras C6, C7 y C8 produjeron turbidez tenue a una concentración de etanol del 6% v/v, lo que indica que fueron capaces de crecer lentamente. Con respecto a los ensayos a concentraciones de etanol de 10, 14 y 18% v/v, ninguna levadura, incluyendo el control fueron capaces de formar turbidez.

**Tabla 4.**

*Formación de turbidez por levaduras cultivadas a diferentes concentraciones de etanol.*

|         | ETANOL 2% |    |    |    | ETANOL 6% |    |    |    | ETANOL 10% |    |    |    | ETANOL 14% |     |     |     | ETANOL 18% |     |    |    |    |    |   |
|---------|-----------|----|----|----|-----------|----|----|----|------------|----|----|----|------------|-----|-----|-----|------------|-----|----|----|----|----|---|
|         | 12h       | 1d | 2d | 3d | 12h       | 1d | 2d | 3d | 12h        | 1d | 2d | 3d | 12h        | 24h | 36h | 48h | 3d         | 12h | 1d | 2d | 3d | 4d |   |
| C1      | -         | +  | +  | +  | -         | -  | -  | -  | -          | -  | -  | -  | -          | -   | -   | -   | -          | -   | -  | -  | -  | -  | - |
| C2      | -         | +  | +  | +  | -         | -  | -  | -  | -          | -  | -  | -  | -          | -   | -   | -   | -          | -   | -  | -  | -  | -  | - |
| C3      | -         | +  | +  | +  | -         | -  | -  | -  | -          | -  | -  | -  | -          | -   | -   | -   | -          | -   | -  | -  | -  | -  | - |
| C4      | -         | +  | +  | +  | -         | -  | -  | -  | -          | -  | -  | -  | -          | -   | -   | -   | -          | -   | -  | -  | -  | -  | - |
| C5      | -         | +  | +  | +  | -         | -  | -  | -  | -          | -  | -  | -  | -          | -   | -   | -   | -          | -   | -  | -  | -  | -  | - |
| C6      | +         | +  | +  | +  | -         | +  | +  | +  | -          | -  | -  | -  | -          | -   | -   | -   | -          | -   | -  | -  | -  | -  | - |
| C7      | +         | +  | +  | +  | -         | +  | +  | +  | -          | -  | -  | -  | -          | -   | -   | -   | -          | -   | -  | -  | -  | -  | - |
| C8      | +         | +  | +  | +  | -         | +  | +  | +  | -          | -  | -  | -  | -          | -   | -   | -   | -          | -   | -  | -  | -  | -  | - |
| Control | +         | +  | +  | +  | -         | +  | +  | +  | -          | -  | -  | -  | -          | -   | -   | -   | -          | -   | -  | -  | -  | -  | - |

Dónde: (-): sin turbidez y (+): turbidez.

### *Evaluación bioquímica*

Para la identificación de la cepa seleccionada (C8) se usó el kit API ID 32C. El cultivo fresco de la levadura se inoculó en las celdas del kit que contiene 25 compuestos químicos diferentes. Se incubó durante 24 horas y el resultado se interpretó mediante el software API web. La levadura se identificó como *Saccharomyces cerevisiae*. La tabla 5 muestra el resultado obtenido.

**Tabla 5.**

*Identificación bioquímica de la levadura seleccionada mediante el KIT API ID 32C.*

| Código | Taxón significativo             | Proximidad relativa al taxón indicado (%ID) | Proximidad al perfil más típico del Taxón (T) |
|--------|---------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| C8     | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 96                                          | 0,89                                          |

### *Fermentación de mosto de malta en matraces*

A partir de los resultados de fermentabilidad de azúcares y capacidad de fermentación a diferentes concentraciones de etanol se seleccionó la levadura C8. Seguidamente se realizaron ensayos de fermentación utilizando mosto de malta comercial. Se evaluaron el efecto de la temperatura,

extracto seco y concentración celular sobre la producción, rendimiento y productividad de etanol. La matriz experimental del diseño factorial 2<sup>3</sup> con tres repeticiones y cuatro puntos centrales que incluye las respuestas de los respectivos tratamientos se muestra en la Tabla 6. Los datos fueron procesados utilizando el programa Design Expert 10.1. Como se muestra, los valores de producción de etanol estuvieron entre 24,8 y 49,9 g etanol/L, productividad de etanol están entre 0,073 y 0,191 g etanol/L.h y de rendimiento de etanol están entre 0,24-0,43 g. etanol/g. azúcar. Si bien estos datos representan el rango de cada variable respuesta correspondiente a la zona de experimentación, es necesario determinar la mejor combinación de los valores de las variables independientes que permita obtener los valores máximos de producción, rendimiento y productividad de etanol.

**Tabla 6.**

*Matriz experimental del diseño factorial completo. Con 3 repeticiones y 4 puntos centrales. Resultados en producción de etanol y rendimiento*

| Run | T (°C) | Materia seca (°P) | Concentración celular (cel/ml) | Producción de etanol (g.etanol/L.) | Productividad (g.etanol/L.h) | Rendimiento (g. etanol/g. azúcar) |
|-----|--------|-------------------|--------------------------------|------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| 1   | 12     | 20                | 1,00E+06                       | 25,807                             | 0,086                        | 0,416                             |
| 2   | 18     | 14                | 1,00E+08                       | 34,365                             | 0,168                        | 0,320                             |
| 3   | 15     | 17                | 5,05E+07                       | 40,631                             | 0,125                        | 0,287                             |
| 4   | 18     | 20                | 1,00E+08                       | 47,132                             | 0,151                        | 0,247                             |
| 5   | 12     | 14                | 1,00E+06                       | 30,94                              | 0,086                        | 0,369                             |
| 6   | 12     | 20                | 1,00E+06                       | 24,762                             | 0,103                        | 0,400                             |
| 7   | 12     | 20                | 1,00E+08                       | 47,132                             | 0,135                        | 0,311                             |
| 8   | 18     | 14                | 1,00E+08                       | 36,642                             | 0,191                        | 0,345                             |
| 9   | 12     | 14                | 1,00E+06                       | 30,06                              | 0,078                        | 0,351                             |
| 10  | 12     | 20                | 1,00E+08                       | 44,991                             | 0,121                        | 0,294                             |
| 11  | 12     | 20                | 1,00E+08                       | 46,061                             | 0,132                        | 0,288                             |
| 12  | 15     | 17                | 5,05E+07                       | 41,719                             | 0,129                        | 0,338                             |
| 13  | 18     | 20                | 1,00E+06                       | 49,274                             | 0,128                        | 0,292                             |
| 14  | 15     | 17                | 5,05E+07                       | 39,543                             | 0,122                        | 0,279                             |

|    |    |    |          |        |       |       |
|----|----|----|----------|--------|-------|-------|
| 15 | 18 | 20 | 1,00E+08 | 52,486 | 0,168 | 0,266 |
| 16 | 18 | 14 | 1,00E+06 | 30,94  | 0,107 | 0,266 |
| 17 | 18 | 20 | 1,00E+06 | 47,132 | 0,123 | 0,274 |
| 18 | 18 | 20 | 1,00E+08 | 49,927 | 0,160 | 0,267 |
| 19 | 18 | 20 | 1,00E+06 | 48,204 | 0,126 | 0,288 |
| 20 | 12 | 14 | 1,00E+08 | 33,115 | 0,145 | 0,330 |
| 21 | 18 | 14 | 1,00E+08 | 35,35  | 0,184 | 0,327 |
| 22 | 12 | 14 | 1,00E+08 | 33,115 | 0,145 | 0,342 |
| 23 | 12 | 20 | 1,00E+06 | 27,98  | 0,097 | 0,437 |
| 24 | 12 | 14 | 1,00E+08 | 33,115 | 0,145 | 0,366 |
| 25 | 15 | 17 | 5,05E+07 | 39,543 | 0,122 | 0,301 |
| 26 | 12 | 14 | 1,00E+06 | 27,98  | 0,073 | 0,335 |
| 27 | 18 | 14 | 1,00E+06 | 34,365 | 0,119 | 0,304 |
| 28 | 18 | 14 | 1,00E+06 | 30,94  | 0,107 | 0,294 |

***Producción de etanol***

Se analizó la producción óptima de etanol mediante un análisis estadístico combinando las variables de temperatura, concentración celular y grados plato (°P). Los datos obtenidos mediante ANOVA muestran que el modelo es significativo (Tabla 7) debido a que el valor-p es menor a 0.05. En la tabla también se observa que los factores del modelo A, B, C, AB, AC, BC y ABC tienen un valor-p menor a 0.05 lo cual indica que son significativos para la determinación del análisis de la producción óptima de etanol.

**Tabla 7.**

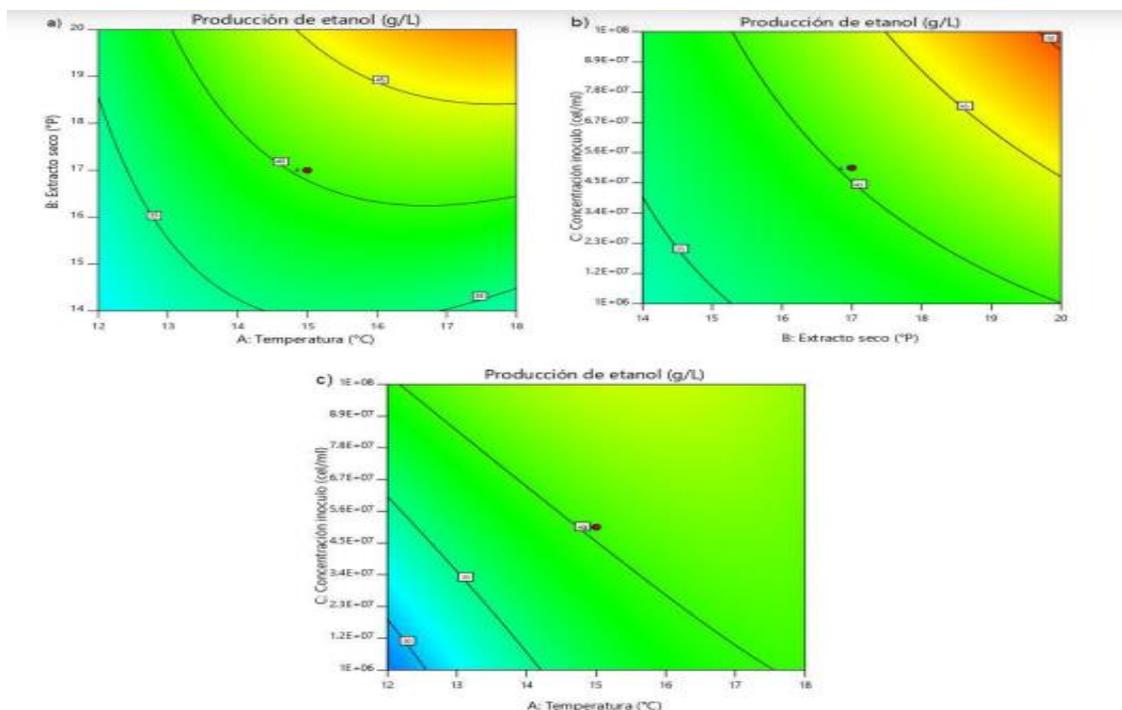
*Análisis de varianza para la producción de etanol.*

|                        | <b>Sum of squares</b> | <b>Df</b> | <b>Mean square</b> | <b>F-value</b> | <b>P-value</b> |
|------------------------|-----------------------|-----------|--------------------|----------------|----------------|
| <i>Model</i>           | 1774.40               | 8         | 221.80             | 98.87          | < 0.0001       |
| <i>A-Temperatura</i>   | 350.36                | 1         | 350.36             | 156.18         | < 0.0001       |
| <i>B-Extracto seco</i> | 599.61                | 1         | 599.61             | 267.29         | < 0.0001       |
| <i>C-Conc.celular</i>  | 301.37                | 1         | 301.37             | 134.35         | < 0.0001       |
| <i>AB</i>              | 166.14                | 1         | 166.14             | 74.06          | < 0.0001       |
| <i>AC</i>              | 125.83                | 1         | 125.83             | 56.09          | < 0.0001       |
| <i>BC</i>              | 81.01                 | 1         | 81.01              | 36.11          | < 0.0001       |
| <i>A<sup>2</sup></i>   | 26.56                 | 1         | 26.56              | 11.84          | 0.0027         |
| <i>ABC</i>             | 123.52                | 1         | 123.52             | 55.06          | < 0.0001       |
| <i>Pure Error</i>      | 42.62                 | 19        | 2.24               |                |                |

$R^2 = 0.98$ ,  $R^2$  ajustado = 0.97.

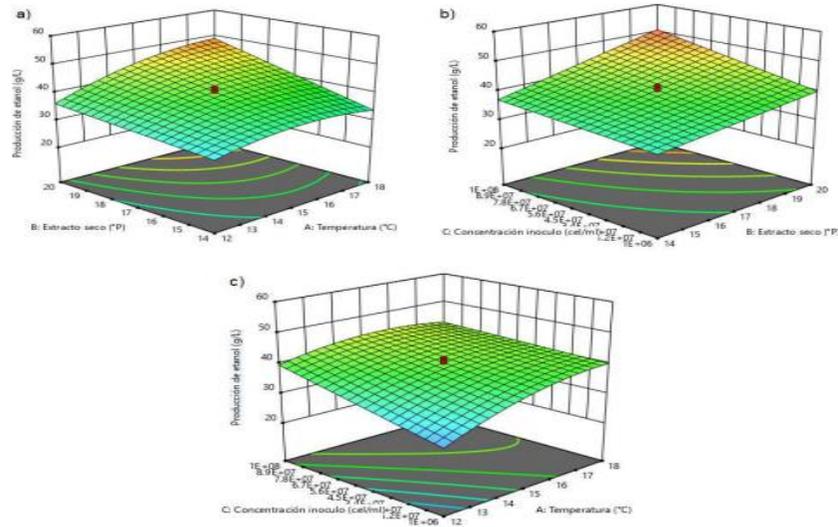
A partir del análisis de datos, se generó una ecuación empírica que relaciona la variable respuesta y las independientes, el cual para la producción de etanol se expresa en términos de la siguiente ecuación lineal: Producción de etanol =  $58.79510 + 1.98867 T^\circ - 7.20115 ES - 1.20599 \times 10^{-6} CI + 0.549500 T^\circ \times ES + 7.11504 \times 10^{-8} T^\circ \times CI + 8.87565 \times 10^{-8} ES \times CI - 0.309264 T^{\circ 2} - 5.09231 \times 10^{-9} T^\circ \times ES \times CI$ . Los valores de  $R^2 = 0.98$  y  $R^2$  ajustado = 0.97, indican un buen ajuste de los datos a la ecuación encontrada. El efecto de las variables independientes sobre la producción de etanol se observa en la Figura 2. Así, el incremento de la temperatura de fermentación y el contenido de extracto seco incrementa la producción de etanol (Figura 2a). Esto se debe a que, a mayor contenido de azúcares fermentables en el mosto hay una mayor producción de etanol 45 siempre y cuando la levadura sea capaz de producir una mayor cantidad de etanol. Por otro lado, a mayor temperatura una mayor actividad de la levadura lo que favorece la producción de etanol. Se observa además un

efecto combinado entre ambas variables los cuales se comportan directamente proporcional a la producción de etanol. Con respecto a la concentración inicial de células, se observa un efecto positivo al incrementar dicha concentración (Figura 2b). De igual modo, se observa un efecto combinado con el contenido de extracto seco del mosto, es decir, al incrementar tanto la concentración de células y azúcares fermentables, la producción de etanol incrementa. Adicionalmente se observó un efecto combinado débil de la temperatura y la concentración de células en la producción de etanol dentro de los rangos ensayados (Figura 2c). Esto se debe a que en la producción de etanol el contenido de extracto seco tiene un mayor efecto debido a que está relacionado con el contenido de azúcares fermentables en el mosto y la temperatura es un catalizador de reacciones enzimáticas celulares. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* fue aislada de una fermentación espontánea a temperatura ambiente. Todas las levaduras fermentan mejor mientras se incrementa la temperatura hacia el valor óptimo, pero se debe tener en cuenta un factor importante que es la producción de compuestos volátiles tales como: diacetilo, alcoholes superiores y ésteres. Estos compuestos se producen en mayor cantidad cuando se incrementa la temperatura de fermentación, por ello se experimentó con una temperatura máxima de 18 °C que está dentro del rango de las levaduras de fermentación alta. Por otro lado, mientras más azúcares disponibles haya en el mosto, se va a producir mayor cantidad de etanol siempre y cuando también haya nutrientes para el desarrollo de las células. A una mayor concentración de células, se aprovecha todos nutrientes disponibles y se maximiza la producción de etanol. En nuestros resultados las levaduras aprovecharon las mejores condiciones de cada factor para una mayor producción de etanol.



**Figura 2. Planos de contorno que muestran el efecto del extracto seco y temperatura (a), extracto seco y concentración celular (b) y, temperatura y concentración celular (c) en la producción de etanol**

Adicionalmente, con los resultados obtenidos (Tabla 6) se ha procedido a la optimización de la producción de etanol, y se presentan como gráficos de Superficie de Respuesta (Figura 3). Los parámetros que conducirían a la producción máxima de etanol (51.060 g/L) de acuerdo con la optimización realizada con el software Design Expert serían, temperatura 18°C, extracto seco 20°Plato y 108 células/ml respectivamente. La producción de etanol está influenciada principalmente por la cantidad de azúcares fermentables en el mosto (maltosa). La producción de cerveza se realiza por lo general con mostos de 9° Plato para alcanzar el contenido alcohólico comercial (4.5 %v/v de etanol). Mostos con mayores contenidos de extracto seco implica una mayor cantidad de maltosa que será convertido en etanol y otros componentes. La capacidad de la levadura para fermentar a mayores gravedades específicas y producir mayores cantidades de etanol es deseable desde el punto de vista tecnológico. Los resultados mostraron que el incremento de la producción de etanol está relacionado con una mayor concentración de extracto seco (Figura 3 a,b), mayor concentración de inóculo (Figura 3b). Por el contrario, el incremento de la temperatura tendría poco efecto en una mayor producción de etanol (Figura 3c).



**Figura 3. Gráficos de Superficie de Respuesta de fermentaciones realizadas con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* C8 a diferentes condiciones. Efecto de la temperatura y extracto seco (a), extracto seco y concentración de inóculo (b) y, temperatura y concentración celular (c) en la producción de etanol.**

### Conclusiones

- Se aislaron ocho cepas de levaduras con características comúnmente observadas en *Saccharomyces* tales como tolerancia al etanol (12%v/v) y al metabisulfito de sodio (200 mg/L). Asimismo, se evaluaron morfológicamente mostrando formas redondas y elipsoidales típicamente del género *Saccharomyces*.
  - Todas las cepas aisladas (08) fueron capaces de fermentar glucosa mientras que sólo tres (C6, C7 y C8) fueron capaces de fermentar además sacarosa y maltosa. Levaduras capaces de fermentar un mayor espectro de azúcares son deseadas.
- Adicionalmente, las cepas aisladas no fueron capaces de fermentar lactosa.
- Las cepas C6, C7 y C8 fueron capaces de fermentar en medios conteniendo hasta 18%v/v, característica adecuada para procesos de producción de etanol. De las tres cepas, se eligió la cepa 8 para los ensayos de fermentación de cerveza.
  - La producción de etanol durante la fermentación de cerveza estuvo influenciada por la temperatura, el extracto seco del mosto y la concentración inicial de inóculo.

Así, al incrementar la temperatura de fermentación, la cantidad de azúcares fermentables y la densidad celular inicial se incrementa la producción de etanol.

- Con respecto a la productividad de etanol, el incremento de la temperatura y la concentración inicial de inóculo tiene efecto positivo. Sin embargo, el extracto seco del mosto tuvo poco efecto. Esto se debería a que a mayor cantidad de células la conversión de azúcares a etanol es más rápido y, por otro lado, el incremento de la temperatura acelera los procesos bioquímicos de las levaduras.
- Los ensayos de fermentación realizados en biorreactor resultaron en valores de producción de etanol menores a lo observado en fermentaciones realizadas en matraces. Esto se debería al suministro de oxígeno, el cual debió desviar la conversión de etanol hacia la formación de biomasa.

## Referencias

1. Anacleto J. and Uden N. (1982). Kinetics and activation energetics of death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by sulfur dioxide. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXIV, Pp. 2477-2486.
2. Almeida, R., Silva J., Lima, U., Silva, D. & Assis, A. (2001). Evaluation of fermentation parameters during high-gravity beer production. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 18(4), 459-465.
3. Querol, A. Bond U. (2009). The complex and dynamic genomes of industrial yeasts, *FEMS Microbiol. Lett.* 293 1–10.
4. Albergaria, H. Arneborg, N. 2016. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:2035–2046.
5. Baccolo, G., Stamerra, G., Coppola, D., Orlandi, I. and Vai, M. (2018). Mitochondrial Metabolism and Aging in Yeast. *International Review of Cell and Molecular Biology*, Volume 340. ISSN 1937-6448.
6. Barata, A. Caldeira, J. Botelho, R. Pagliara, D. Malfeito-Ferreira, M. Loureiro, V. (2008).
7. Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. *International Journal of Food Microbiology* 121: 201–207.

8. Batt, Carl A., and Mary Lou Tortorello. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier/Academic Press, 2014.
9. Bellut, K., & Arendt, E.K. (2019). Chance and Challenge: Non-*Saccharomyces* Yeasts in Nonalcoholic and Low Alcohol Beer Brewing – A Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 77(2), 77-91.
10. BioMerieux.
11. Manual API ID 32 C, (2011). Identification system for yeasts REF 32 200 USA, 07990H - xl – 2011.
12. Briggs D., Boulton C., Brookes P. and Stevens R. (2004). *Brewing: Science and practice*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited. Capece, A.; Romaniello, R.; Siesto, G.; Pietrafesa, R.; Massari, C.; Poeta, C. y Romano, P. 2010. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 144: 187-192.
13. Cáceres, J. y Reyna A. (2002). Modelamiento microbiológico para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. (Tesis de pre grado). Universidad De La Sabana. Bogotá, Colombia. Ciani, M. Comitini, F. (2015). Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. *Current Opinion in Food Science*, 1:1–6.
14. Conant, G. y Wolfe, K. (2007). Increased glycolytic flux as an outcome of whole-genome duplication in yeast. *Molecular Systems Biology* 3:129.
15. EUROPEAN BREWERY CONVENTION: yeast group estimation of yeast viability. *Inst. Brew. Vol. 68*, 1962.
16. Ding, J. Huang, X. Zhang, L. Zhao, N. Yang, D. Zhang, K. (2009). Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 85:253–263.
17. Divol, B. du Toit, M. Duckitt, E. (2012). Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*. 95:601–613.

18. Dujon, B. Yeast evolutionary genomics. (2010). *Nat Rev Genet*, 11:512-524.
19. Flores, C., Rodríguez, C., Petit, T. y Gancedo, C. (2000). Carbohydrate and energy yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 507-529.
20. Francesca N., Chiurazzi M.; Romano R.; Aponte M., Settanni L., Moschetti G., 2009. Indigenous yeast communities in the environment of 'Revollobianco' grape variety and their use in commercial White wine fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 26:337-351.
21. Freydière AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med Mycol* 2001; 39: 9-33. 65
22. Garrido F. (2014). Análisis sensorial de la cerveza. Asociación Madrileña de Sumilleres (AMS).
23. Gigliarelli, P. (2013). Fermentación. Mash, Volumen 379. Obtenido de
24. <http://www.revistamash.com/detalle.php?id=379>.
25. Gody, A. (2013). Aislamiento e identificación molecular de especies de levaduras NoSaccharomyces presentes en uvas (Tesis de pre grado). Universidad De La República
26. Uruguay, Montevideo, Uruguay.
27. Gojkovic, Z., Knecht W., Zameitat, E., Warneboldt, B., Coutelis J-B., Pynyaha, Y., Neuveglise, C., Møller K., Lüffler, M. y Piskur, J. (2004). Horizontal gene transfer promoted evolution of the ability to propagate under anaerobic conditions in yeasts. *Mol Gen Genomics* 271: 387–393.
28. González S., Barrios E., Querol A. (2006), Molecular identification and characterization of wine yeast isolated from Tenerife (Canary Island, Spain) *J Appl Microbiol* 102: 1018- 1025.
29. Gutiérrez H. y Salazar R. (2008). Análisis y diseño de experimentos. México, México
30. D.F. McGRAW-HILL/INTERAMERICANA. Guzmán Y. (2015). Efecto del etanol sobre la viabilidad de 3 cultivos de Saccharomyces spp nativos productores de etanol (tesis de pregrado). Universidad Nacional De Trujillo. Perú.

31. Harrison M. (2009). Beer/brewing. *Applied Microbiology: Agro/Food*. Henick-Kling T., Edinger W., Daniel P. and Monk P. (1998). Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *Journal of Applied Microbiology* 84, 865–876.
32. Hernández, S.J., Domínguez, E.L. y Gonzaga, L. (2015). Magnetic Field Influence in *E. coli* and *S. cerevisiae* Growth and the Ability of *Pseudomonas* sp and *Bacillus* sp to be Phosphorus Solubilizers for Industrial Usage. *Revistas de ciencias*. 19 (1):109-121.
33. Herskowitz, I. (1988). Life Cycle of the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews*, Dec., p. 536-553. 66 Hittinger, T., Rokas, A., Bai, F-Y., Boekhout, T., Goncalves, P., Jeffries T. W., Kom

© 2023 por los autores. Este artículo es de acceso abierto y distribuido según los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).