

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE
FACULTAD DE INGENIERÍA

TESIS DE GRADO:

**Evaluación del potencial para elaboración de
sidras de levaduras Patagónicas criotolerantes
del género *Saccharomyces***

Tesista: GONZALEZ CONTRERAS, Yanet Lucía

Carrera: Ingeniería Química

Legajo: 96553

Director: Dr. Christian A. Lopes

Codirector: MSc. Raúl Jorge Barbagelata

Lugar de trabajo: Grupo de Biodiversidad y Biotecnología de
Levaduras.

**Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería
de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas
(PROBIEN, CONICET-UNCo)**

DICIEMBRE 2018



Agradecimientos

A Dios, por darme la fuerza y absolutamente todo lo que necesito cada día de mi vida.

A mi mamá y hermanos, por ser mis ejemplos en este camino, por el apoyo y amor incondicional.

A mis hijos, porque juntos son la luz de mi alma y el motor de mi vida.

A mi esposo, por ser mi refugio en los momentos más duros y el mejor compañero de vida que alguna vez soñé tener.

A mis amigos, por las risas, los llantos y los grandes momentos compartidos que siempre me ayudaron a seguir luchando por mis sueños.

A mi tutor, Christian por estar siempre presente, por la paciencia infinita y por la pasión que trasmite por lo que hace.

A mi cotutor, Raúl porque supo entenderme y ayudarme siempre con una gran sonrisa.

A todo el equipo del laboratorio de Biodiversidad y Biotecnología de Levaduras del PROBIEN, por la buena predisposición para enseñarme lo necesario para encarar esta tesis, los mates y las charlas.

A La Universidad Nacional del Comahue y los profesores de la carrera que dejaron una huella en mi vida, algunos enseñando desde lo académico y otros desde su propia humanidad.

A todas las personas que en este gran proyecto de mi vida me brindaron la ayuda necesaria para que esta tesis fuera posible.

	ÍNDICE
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INTRODUCCIÓN	1
1. LA SIDRA	1
1.1. Historia y situación actual en el mercado	1
1.2. Definición y propiedades	4
1.3 El proceso de elaboración de sidra	4
1.3.1. Ingreso de la fruta	7
1.3.2. Obtención del jugo	7
1.3.3. Sulfitación del mosto	8
1.3.4. Clarificación	9
1.3.5. Procesos Fermentativos	9
1.3.6. Operaciones Post-fermentativas	10
2. LEVADURAS	10
2.1. Levaduras en procesos fermentativos	11
El fenotipo killer	13
2.2. Las levaduras y el aroma de las bebidas fermentadas	14
2.3. Selección de levaduras para cultivos iniciadores de sidra	18
Criterios de selección de cepas	20
2.4. Perspectiva en la región del Comahue	21
OBJETIVOS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
1. MATERIAL BIOLÓGICO	23
2. MEDIOS DE CULTIVO	23
3. SOLUCIONES	24

4. EQUIPAMIENTO	24
5. MOSTOS	25
6. MICROFERMENTACIONES	25
7. ESCALADO DE LAS FERMENTACIONES	25
8. MODELADO DE PARÁMETROS CINÉTICOS	26
9. PARÁMETROS ENOLÓGICOS	27
10. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES	27
11. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	28
12. ACTIVIDAD ANTAGONISTA	29
13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
1. EVALUACIÓN DE LAS LEVADURAS EN MICROFERMENTACIONES	30
1.1. Cinéticas de fermentación	30
1.2. Análisis fisicoquímico	34
2. EVALUACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS Y ANTAGONISTA DE LAS LEVADURAS	39
3. EVALUACIÓN DE LAS LEVADURAS SELECCIONADAS A MAYOR ESCALA CON ÉNFASIS EN LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS	41
3.1. Cinéticas de fermentación	41
3.2. Composición química de las sidras	44
CONCLUSIONES	52
PERSPECTIVAS	53
BIBLIOGRAFÍA	54
PÁGINAS WEB	64

RESUMEN

Las levaduras son los microorganismos responsables de la transformación del mosto de manzana en sidra, mediante el proceso metabólico conocido como fermentación alcohólica. Durante este proceso, las levaduras metabolizan los azúcares y otros constituyentes del mosto transformándolos en etanol, dióxido de carbono (CO₂) y otros productos finales que contribuyen a la composición química y a las características sensoriales de la sidra resultante. Aun cuando la especie de levadura más ampliamente involucrada en las fermentaciones de sidras en el mundo es *Saccharomyces cerevisiae*, también se ha reportado la presencia de la especie criotolerante *Saccharomyces uvarum* principalmente asociada a fermentaciones realizadas a bajas temperaturas. Una fermentación llevada a cabo a bajas temperaturas permite conservar mejor los compuestos volátiles relacionados con el aroma, por lo que disponer de levaduras criotolerantes para estos procesos es de suma importancia.

El objetivo de este trabajo fue evaluar las características de interés para la elaboración de sidras de cepas Patagónicas de las especies criotolerantes *S. uvarum* y *S. eubayanus* y las características organolépticas de las sidras obtenidas con ellas.

Se comprobó que las dos especies criotolerantes son capaces de completar la fermentación de mostos de manzana a bajas temperaturas, produciendo sidras con bajos niveles de acidez volátil y elevada concentración de glicerol. Las cepas evaluadas en este trabajo presentaron una clara ventaja tecnológica respecto de la especie *S. cerevisiae*, comúnmente usada en la elaboración de sidra, tanto en las propiedades cinéticas como por la complejidad aromática de las sidras base obtenidas. Se observaron también diferencias significativas en los productos elaborados con cada especie criotolerante. *S. uvarum* fue superior en cuanto a la cinética de fermentación y a la producción de ésteres en general. *S. eubayanus* se destacó por la producción de glicerol y alcoholes superiores.

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis evidenciaron que las dos especies criotolerantes presentan un elevado potencial para ser utilizadas como cultivos iniciadores de la fermentación en mostos de manzana para la mejora de la producción de sidras regionales.

PALABRAS CLAVES: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces eubayanus*, levaduras criotolerantes, sidra, aroma.

ABSTRACT

Yeasts are the microorganisms responsible for the transformation of apple must into cider, though the metabolic process called alcoholic fermentation. During this process, yeasts not only produce ethanol and carbon dioxide, but also a number of minor metabolic products associated with the complex cider aroma and taste. Although *Saccharomyces cerevisiae* is the yeast species traditionally involved in cider fermentations around the world, the presence of other cryotolerant species belonging to the same genus, *Saccharomyces uvarum*, has been also detected particularly in ciders fermented at low temperature. Low fermentation temperature is particularly useful to conserve volatile compounds related to the aroma; in this context, the research and development about cryotolerant yeasts starter cultures becomes interesting.

The aim of this work was to evaluate the features of interest for the elaboration of ciders ability in a set of Patagonian strains belonging to the cryotolerant yeast species *S. uvarum* and *S. eubayanus* as well as the main physicochemical parameters in the obtained ciders.

The two cryotolerant species were able to complete the apple must fermentations at low temperature, producing ciders with low volatile acidity and high glycerol concentrations. The strains evaluated in this Thesis showed a technological advantage with regard to the species *S. cerevisiae*, commonly used for cider production, in both kinetic parameters and in the aromatic features of the obtained ciders. Significant differences were also obtained in the ciders elaborated with each different cryotolerant species. *S. uvarum* showed a good fermentation kinetic and the highest production of total esters. On the other hand, *S. eubayanus* evidenced the highest glycerol and alcohols production.

The results obtained in this work evidenced that the two cryotolerant species exhibited an interesting potential to be used in the development of starter cultures for the elaboration of ciders with regional specific characteristics.

KEYWORDS: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces eubayanus*, *Cryotolerant yeast*, *Cider*, *Aroma*.

INTRODUCCIÓN

1. LA SIDRA

1.1. Historia y situación actual en el mercado.

La sidra¹ es la bebida alcohólica que resulta de la fermentación del jugo de manzana obtenido a partir de la molienda y prensado de estas frutas sanas y limpias. Esta bebida típicamente europea, comenzó a elaborarse hace aproximadamente 2000 años (Durieux *et al.*, 2005). A lo largo de la historia del hombre numerosos documentos nombran a los pomares (plantaciones de manzanos) y el consumo de bebidas preparadas a partir del jugo de manzana. Esta práctica fue muy popular entre la población celta, y también se ha descripto durante la invasión romana a Inglaterra (Durieux *et al.*, 2005). En regiones templadas de Europa como la Normandía y la Britania francesa como la zona de Asturias en España, la explotación del manzano, la elaboración y el consumo de sidra datan de los siglos VIII y IX (Edad Media). Luego de la invención de la prensa, durante los siglos XII y XIII, ambas actividades productivas se transformaron en la mayor riqueza de estas regiones consolidándose finalmente durante el siglo XIX, cuando se lograron resolver las dificultades técnicas que entrañaba la sidra natural – particularmente relacionados a su estabilización microbiológica– diversificándose la producción. A partir de ese momento se comienzan a elaborar otros productos como vinagre de manzana, coñac y espumante de manzana (Durieux *et al.*, 2005). La sidra se mantuvo como una bebida popular en EE.UU y Nueva Inglaterra hasta la Guerra Civil (1936-1939), cuando la cerveza comenzó a tomar su lugar en el mercado americano debido a la influencia de inmigrantes alemanes en los EE.UU. En las últimas décadas del siglo XX, la sidra se reinstala en el mercado americano (EE.UU) y europeo gracias a las mejoras tecnológicas que reflejaron un incremento en la calidad del producto, nuevas estrategias de marketing y a la cultura alimenticia de los comensales (Rowles, 2000).

Actualmente, Reino Unido, en particular el sudeste de Inglaterra con una producción de seis millones de hectolitros anuales, tiene la mayor producción y el mayor consumo mundial de sidra per cápita (Johansen, 2000; Rowles, 2000). Le siguen en importancia Irlanda, las regiones de Normandía y Britania en Francia y Asturias en España. En todos ellos la sidra constituye no sólo una bebida tradicional sino también el centro de actividad turística de

1: La palabra de origen griego (*Sikera*) pasa al latín como *sicera* y en Asturias es inicialmente transformada en *sizra* y finalmente en *sidra*. Fuente: Sidras de Asturias.

gran relevancia para las economías regionales. La Unión Europea sostiene el renacer de la sidra en un esfuerzo por asistir a las economías rurales y varios países europeos fortalecen a la industria sidrera con grandes inversiones en tecnología y producción (Rowles, 2000).

En Argentina, la elaboración de sidra está estrechamente ligada a la producción de frutas de pepita (manzanas y peras), actividad productiva que se concentra principalmente en las regiones Norpatagónica (provincia de Río Negro) y Cuyana (provincias de Mendoza y San Juan). Existen en el país 15 empresas elaboradoras de sidra a gran escala, de las cuales 7 plantas industriales se encuentran en Mendoza, otras 7 en Río Negro y 1 en San Juan. De estas 15 empresas, 4 producen el 75% de la sidra nacional y 3 de ellas están localizadas en la región Norpatagónica (Ministerio de Agricultura y Ganadería). En la Figura 1 se muestra la localización de las principales sidreras de la Argentina.

Históricamente, el destino de la producción de manzanas registra la siguiente distribución: 35% consumo en fresco, 17% exportación y 48% industria. Por su parte, la industria destina el 83 % del volumen que procesa a jugo concentrado, 5% a manzana deshidratada (y otros productos derivados de la molienda) y 12% a la elaboración de sidra. La cantidad de manzanas destinada a la elaboración nacional de sidras se estima en 54 mil toneladas. No obstante, si se considera también la cantidad de pera que ingresa en la elaboración industrial de esta bebida (según parámetro del CAA), el valor total alcanzaría las 60 mil toneladas, cifra que coincide con estimaciones de fuentes especializadas de la provincia de Río Negro (Secretaría de Fruticultura de Río Negro). Teniendo en cuenta la relación aproximada entre 1,5 kg de fruta (90 % manzana y 10 % pera) para elaborar 1L de sidra, la producción nacional de esta bebida fue de 40 millones de litros en el año 2010.

No existen datos actualizados, sin embargo, considerando la estimación de la producción nacional antes indicada, se observa que el consumo *per cápita* actual no podría superar el litro por habitante por año. Este nivel de consumo se mantiene constante desde los últimos años, incluso con tendencia declinante, pese a la progresiva disminución del precio del producto (Fuente: Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca). El consumo *per cápita* en el año 2010 fue de 0,84 litros (Fuente: Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca). Sin embargo en el año 2012 la producción de sidra, según cifras del grupo que concentra el 50% del mercado, alcanzó los 80 millones de litros al año, lo que evidencia un consumo de casi 2 litros por persona al año. La espiral ascendente se combina con la marcada estacionalidad del consumo de la sidra, ya que el 80% del mismo se encuentra concentrado en los meses que van entre

octubre y diciembre, con un mayor consumo en las fiestas de fin de año. De tal forma, el consumo de sidra se encuentra casi limitado a una época del año específica, pasando a ser un producto temporal y con fuertes competidores en el mercado de las bebidas alcohólicas.

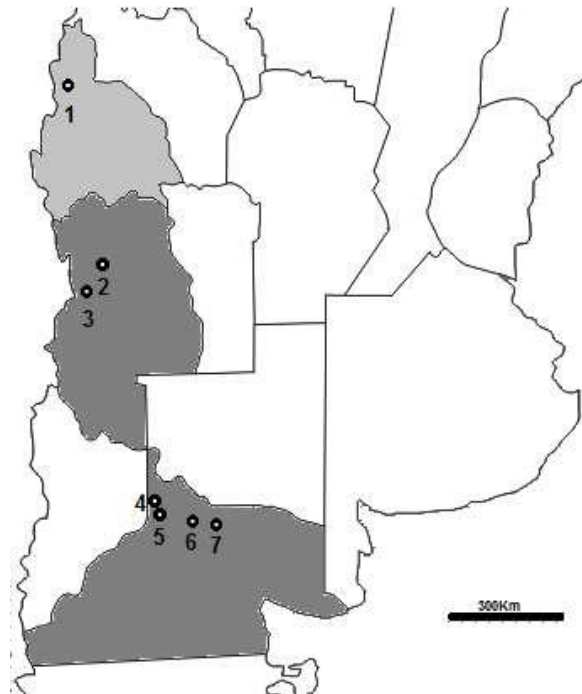


Figura 1: Localización de las principales sidreras de la Argentina. San Juan: 1: Zona de Calingasta. Mendoza: 2: Vista Flores. 3: Valle de Uco. Río Negro: 4: Cipolletti. 5: Allen. 6: General Roca. 7: Villa Regina.

A nivel nacional el sector debería enfocarse a reposicionar a la sidra como bebida saludable, natural y sabrosa, elaborada a base de manzana, apuntando a desestacionalizar su consumo y convertirla nuevamente en la bebida más popular para las fiestas. Cabe destacar, que casi la totalidad de lo que compran los argentinos es producido dentro de su propia frontera. Las importaciones son prácticamente nulas, llegando en años excepcionales como 2011 a 200 mil litros (Fuente: Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca).

Actualmente en la región Patagónica se está promoviendo el consumo de sidra integrado con el turismo en lo que se denomina “la ruta de la sidra”, donde se propone a los turistas paseos a zonas de chacra y sidreras, degustaciones e información sobre los productos, con el objetivo de promover el turismo y a la vez ofrecer una nueva oportunidad de consumo de este producto (Fuente: Diario Río Negro online).

1.2. Definición y propiedades.

El Código Alimentario Argentino (CAA, Ley 18.284 – 18/07/09 – Decreto 2126/7. Reglamentario de la Ley 18284) en su artículo 1085 del Capítulo XIII – (Bebidas fermentadas) define a la sidra base como “la bebida que resulta exclusivamente de la fermentación alcohólica normal del jugo recién obtenido de manzanas sanas y limpias de uso industrial, con o sin la adición de hasta un 10 % de jugo de pera obtenido en idénticas condiciones que el jugo de manzana y fermentado en forma conjunta o separada” y a la sidra como “la sidra base, endulzada y gasificada” (Artículo 1085 bis). Las graduaciones alcohólicas mínimas permitidas por el código para la sidra base y la sidra son $4,5 \pm 0,3$ % v/v y $4,0 \pm 0,3$ % v/v a 20 °C, respectivamente.

Según el contenido de azúcar, la sidra se clasifica en seca, semi-seca y dulce y según la presencia de espuma, en tranquila y espumosa. En general, la bebida presenta un color amarillo dorado intenso, con tonalidades verdosas; su aspecto es límpido, brillante y luminoso denotándose la presencia de finas burbujas y buena densidad en copa. Desde el punto de vista aromático denota una nariz limpia y franca de intensidad media, con aroma de manzana, notas cítricas de lima y pomelo y presencia de aromas secundarios propios de la fermentación (Chandon, 2003). Más allá de esta descripción general, las cualidades de la sidra se encuentran íntimamente ligadas a las características y calidad de la materia prima, a las prácticas involucradas en el proceso de elaboración y a las características de la biota microbiana asociada a los procesos fermentativos (Johansen, 2000).

1.3. El proceso de elaboración de sidra

El jugo o mosto de manzana, y en menor medida de pera, obtenidos por molienda y prensado de sus respectivas frutas frescas, constituye la materia prima de la cual se parte para elaborar la sidra. La calidad de dicho mosto, y consecuentemente de la sidra, depende de la variedad, grado de madurez y de las condiciones higiénico-sanitarias de las manzanas utilizadas (Piyasena *et al.*, 2002).

En la región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén las variedades de manzanas usualmente empleadas en la elaboración de sidra son Red Delicious y Golden Delicious (dulces), Johnathan (semiácida) y Granny Smith (ácida). La mezcla de distintas variedades de manzana suele ser una buena estrategia para obtener una pulpa de características tales que faciliten su

prensado y lograr un adecuado balance en los contenidos de azúcares, ácidos y taninos (Johansen, 2000; Coudray *et al.*, 2003).

Debido a su alto contenido en ácido málico, el jugo de manzana es un líquido muy cáustico y por ello el equipamiento utilizado en las sidreras sólo puede estar construido con ciertos tipos de materiales capaces de resistir a la corrosión. Esto motivó que durante muchos años se utilizara la madera para el proceso de prensado, fermentación y almacenamiento. Aunque en algunos países como Irlanda y España todavía se sigue utilizando este tipo de equipamiento (Morrissey *et al.*, 2004), en la actualidad los materiales más utilizados para su construcción son acero inoxidable, plásticos, fibra de vidrio y/o resinas epoxy. Estos materiales, a diferencia de la madera, no contienen poros por lo cual se facilita la limpieza y desinfección de los equipos contruidos con ellos (del Campo *et al.*, 2003). De la misma manera, los materiales y revestimientos de los pisos de las instalaciones de las sidreras también deben ser tales que faciliten las tareas de higiene de los mismos (Mangas *et al.*, 1996; Piyasena *et al.*, 2002). En la Figura 2 se muestran los procesos básicos que involucran la elaboración de la sidra.

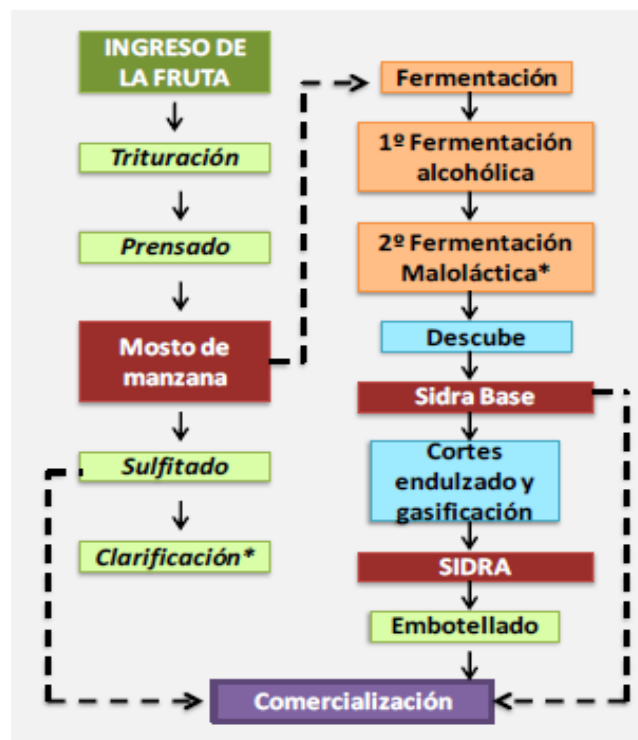


Figura 2: Esquema del proceso de producción de sidra, desde el ingreso de la fruta hasta su comercialización. En verde etapa pre-fermentativa; en naranja etapa fermentativas; en celeste etapa post-fermentativa. *Pasos opcionales del proceso.

La etapa pre-fermentativa comienza con la recolección de la manzana, continúa con la extracción del mosto y finaliza con la clarificación (Blanco Gomis y Mangas, 2010). En cuanto a la manzana destinada a la elaboración de sidra, los principales países productores de esta bebida como España, Francia y EE.UU utilizan variedades específicas que se clasifican en tipos o bloques tecnológicos relacionados con su contenido de azúcares (hasta 15 g/L), su acidez (0,1-1 % de ácido málico), su estructura fibrosa y el contenidos de polifenoles (taninos) (Lea, 1995). En particular, las manzanas para sidra presentan mayor proporción de polifenoles que las destinadas a consumo en fresco o de mesa; su concentración varía entre 0,1 y 5 g/Kg de peso fresco, aunque han sido detectadas concentraciones por encima de 10 g/Kg. El agrupamiento en bloques tecnológicos es muy útil para realizar, como se mencionó, por ejemplo la adecuada mezcla de materia prima durante el proceso de elaboración de la sidra.

Aunque intervienen los diferentes parámetros antes mencionados, los grupos tecnológicos se establecen particularmente en función de la cantidad presente en el fruto de dos grupos de moléculas que contribuyen al *flavour* (aroma y sabor) de la manzana: los ácidos y los polifenoles. Así, por ejemplo, una variedad ácida se caracteriza por presentar una proporción elevada de ácidos orgánicos y bajo contenido de taninos; una variedad amarga se caracteriza por tener una concentración baja de ácidos y muy elevada de polifenoles y una variedad dulce por tener una baja cantidad de ácidos y polifenoles. Como se deduce de la definición del bloque dulce, una variedad perteneciente a este grupo, no tiene por qué tener mayor cantidad de azúcares que una ácida o una amarga, ya que la pertenencia a él no está en función del nivel de azúcares que presente el fruto. Además de estos tres bloques tecnológicos principales, existen otros con características intermedias (Blanco Gomis y Mangas, 2010). En la Tabla 1 se muestran los valores de la concentración de ácidos totales (expresados como ácido sulfúrico) y taninos (expresados como ácido tánico) que determinan los diferentes grupos tecnológicos, junto con las principales variedades de manzanas cultivadas en Argentina. Aunque en la región se cultivan variedades pertenecientes a todos los bloques tecnológicos, la mayor producción de sidras de la región se realiza con manzanas de segunda calidad, que provienen del descarte de aquellas que no cumplen con los estándares de calidad para su consumo en fresco en el mercado internacional. Esto, a su vez, provoca que los mostos se realicen con mezclas de varios tipos de manzana, lo cual influye en una disminución de la calidad del producto final.

Tabla 1: Clasificación de las variedades de manzana destinada a la elaboración de sidras, en función del contenido en ácidos y taninos.

BLOQUE TECNOLÓGICO	ACIDEZ (H ₂ SO ₄ g/L)	TANINOS (Ácido tánico g/L)	VARIEDADES DE MANZANA
Amargo	≤3,29	≥2,00	John Apple, Royal Wilding
Ácido	≥4,8	≤1,45	Granny Smith, Calville Blanc, Belle de Boskoop, Lakely
Dulce	≤3,29	≤1,45	Fuji, Red Delicious
Dulce-amargo	≤3,29	(1,45-2)	Catshead
Ácido- amargo	≥4,8	(1,45-2)	Byfor Wonder, Carlisle Codling
Acidulado	(3,29-4,8)	≤1,45	Royal Golden, Pink Lady

Datos proporcionados por la EEA INTA-Alto Valle, Río Negro (Argentina).

1.3.1. Ingreso de la fruta.

Las manzanas que ingresan a las sidreras son volcadas en lagares (piletas destinadas al almacenamiento de las manzanas en las condiciones de ingreso) desde donde, mediante corriente de agua potable y por flotación, son transportadas hasta los molinos para su trituración. Este transporte implica el lavado indirecto de la fruta.

1.3.2. Obtención del jugo

Trituración. La fruta que llega al molino es elevada hasta las tolvas mediante cintas transportadoras (Figura 3A). En los molinos a martillo la fruta cae y mediante golpe y compresión sobre una lámina metálica cribada es triturada, obteniéndose la pulpa.

Prensado. Las prensas pueden ser hidráulicas o de cintas. En estas últimas, de proceso continuo, la pulpa ingresa a un sistema de cintas de doble malla sintética montado sobre una plataforma horizontal y a medida que avanza entre las cintas es sometida a presiones crecientes ejercidas por una serie de rodillos (10 a 12) dispuestos por encima y por debajo de las mismas en una extensión de aproximadamente 4 metros (Figura 3B). El jugo turbio de primera extracción o mosto, escurre y se recoge en una bandeja de acero inoxidable que se encuentra en la parte inferior. El orujo adherido a la malla inferior (Figura 3C) es extraído mediante raspado con una cuchilla que se encuentra al final de la prensa, hidratado y conducido a una segunda prensa donde se obtiene el jugo de segunda extracción.

El jugo que sale de las prensas es conducido mediante colectores laterales hacia un sistema de cañerías que lo transportará hasta las piletas de fermentación (Figura 3D) (Barbagelata, 2010).

1.3.3. Sulfitación del mosto

El SO_2 (anhídrido sulfuroso o dióxido de azufre) es uno de los compuestos más antiguos usados en la industria de elaboración de alimentos y bebidas por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas (du Toit y Pretorius, 2000). El acondicionamiento del mosto para dar inicio al proceso fermentativo involucra la adición de SO_2 , práctica conocida como sulfitación. Una elevada concentración de dióxido de azufre puede comprometer el aroma y el sabor del producto final (Pretorius y Hoj, 2005) debido a una excesiva formación de sulfuro de hidrógeno y mercaptanos (Jiranek, 2003), así como también provocar efectos indeseables sobre la salud de ciertos consumidores (du Toit y Pretorius, 2000), por lo que el agregado de SO_2 debe garantizar la protección del mosto sin caer en excesos perjudiciales. Se estima que son necesarias concentraciones del orden de 1 mg/L de SO_2 molecular para evitar cualquier actividad fermentativa (Sudrand y Chauvert, 1985).



Figura 3: Equipamiento utilizado en la elaboración de sidras patagónicas. **A:** Cinta transportadora. **B:** Prensa de cintas. **C:** Descarte del orujo. **D:** Sector de las piletas de fermentación.

1.3.4. Clarificación

En el caso de que el mosto presente una elevada turbidez, puede ser necesaria la clarificación del mismo, previamente al desarrollo del proceso fermentativo. El tipo de clarificación comúnmente utilizado es la clarificación enzimática con pectinasas que provocan que las partículas en suspensión puedan flocular (Blanco Gomis y Mangas, 2010).

1.3.5. Procesos Fermentativos

Efectuada la etapa de ajuste del SO_2 y la clarificación (optativa), el mosto es transportado a la pileta donde se dará inicio a la fermentación primaria o alcohólica, llevada a cabo por levaduras. Estos microorganismos son los encargados de transformar los azúcares del mosto en alcohol y en cientos de metabolitos secundarios que contribuyen a las características sensoriales, como el aroma y el sabor de la sidra. El inicio y la velocidad de la fermentación se encuentran en relación directa con las condiciones de aireación y de temperatura que se establecen al inicio del proceso y con la adición (fermentaciones conducidas) o no (fermentaciones espontáneas o naturales) de cultivos iniciadores o *starter* constituidos por cepas de levaduras seleccionadas.

Con respecto a la temperatura de fermentación, las fermentaciones naturales raramente progresan por debajo de los $10\text{ }^\circ\text{C}$, entre $10\text{ }^\circ\text{C}$ y $30\text{ }^\circ\text{C}$ su velocidad crece linealmente con el aumento de la temperatura y entre $35\text{ }^\circ\text{C}$ y $40\text{ }^\circ\text{C}$ ésta se convierte en un factor limitante del crecimiento celular. Temperaturas de fermentación elevadas ($>25^\circ\text{C}$) favorecen también la evaporación de compuestos de importancia para el aroma del producto. Por lo expuesto, la temperatura de fermentación requiere un riguroso control con el fin de evitar paradas de la fermentación o deterioro en la calidad organoléptica de la sidra (Suárez-Lepe, 1997). Una vez finalizada la fermentación alcohólica y cuando la densidad del mosto es de aproximadamente 1003 g/L (concentración de azúcares $< 2\text{ g/L}$), se efectúa el primer trasiego con el objetivo de eliminar las borras de fermentación depositadas en el fondo de las piletas, seguido de un período de reposo o maduración (tres o cuatro meses). Durante la maduración el producto se clarifica naturalmente o por el agregado de agentes clarificantes. El producto final, filtrado, se denomina “sidra base” de acuerdo al Código Alimentario Argentino, aunque a nivel industrial se lo conoce también como “caldo de sidra”.

Seguido al proceso de fermentación primaria o alcohólica puede o no ocurrir una fermentación secundaria o maloláctica, llevada a cabo por las bacterias del ácido láctico

(BAL) (Beech, 1972; Herrero *et al.*, 1999; Nedovic *et al.*, 2000). Este proceso, que consiste en la conversión del ácido L-málico en L-láctico, contribuye a la de acidificación de la sidra y de otras bebidas fermentadas, a su estabilidad microbiológica y a la complejidad de su aroma (Xu *et al.*, 2005).

1.3.6. Operaciones Post-fermentativas

Con el fin de lograr un producto con sabor balanceado, en términos de acidez y contenido de taninos, se puede efectuar el mezclado o corte de sidras base. Luego se procede a efectuar el endulzado con sacarosa y gasificación con anhídrido carbónico (CO₂), obteniéndose el producto final listo para ser embotellado.

Este producto es el denominado “sidra” por el Código Alimentario con densidades establecidas en 1025 g/L para la sidra dulce y de 1015 g/L para la sidra semidulce.

2. LEVADURAS

Las levaduras son hongos unicelulares, que se reproducen por gemación o fisión y pueden o no presentar una fase sexual con formación de esporas durante su ciclo de vida. Las levaduras también pueden constituir sólo una etapa en el ciclo de vida de un hongo filamentoso (estadio levaduriforme, Kurtzman *et al.*, 2011). Las levaduras no son una clasificación taxonómica sino que son un grupo de hongos que comprende representantes de los taxa *Ascomycotina* y *Basidiomycotina*. Históricamente ligadas al hombre a través de la elaboración de alimentos y bebidas fermentadas, las levaduras constituyen probablemente el grupo microbiano con más tradición en biotecnología.

Desde el punto de vista nutricional, las levaduras son eucariotas heterótrofos quimiorganótrofos capaces de utilizar ciertos hidratos de carbono, glucosa en particular, como fuente de carbono y de energía (Gancedo y Serrano, 1989; Kurtzman y Fell, 1998). Conforme a sus requerimientos de oxígeno las levaduras se clasifican en aeróbicas estrictas y aeróbicas facultativas. Las levaduras aeróbicas facultativas pueden a su vez diferenciarse en respiratorias y fermentativas. Durante el crecimiento aeróbico, las levaduras respiratorias, que incluyen la mayoría de las especies de levaduras, metabolizan menos del 30 % del azúcar vía fermentación alcohólica. Ejemplos típicos de este subgrupo de levaduras anaerobias facultativas son ciertas especies de los géneros *Hansenula*, *Kluyveromyces* y *Pichia*, muchas

de las cuales son relevantes en el proceso de elaboración de bebidas fermentadas, fundamentalmente en los estadios iniciales. Por su parte, en las levaduras fermentativas el 90% del catabolismo de la glucosa ocurre vía fermentación alcohólica aún en presencia de oxígeno. Esta característica metabólica convierte a ciertas especies, como *S. cerevisiae*, en las protagonistas en la elaboración de las bebidas fermentadas y a otras, como *Brettanomyces spp.*, en potenciales y muy peligrosos contaminantes de éstas.

2.1. Levaduras en procesos fermentativos.

La comprensión actual de la microbiología asociada a la elaboración de bebidas fermentadas tiene sus orígenes en los estudios pioneros realizados por Louis Pasteur (1822-1895) (Amerine, 1985). Pasteur demostró que las levaduras eran los microorganismos responsables de la fermentación alcohólica que transformaba el jugo de uva en vino y que ciertas especies de bacterias podían crecer en el mismo causando su contaminación.

En particular, la transformación del mosto de manzana en sidra es un complejo proceso microbiológico que involucra la interacción de diferentes levaduras y bacterias, y la presencia menos relevante de algunos hongos filamentosos (Pretorius, 2000). Siendo las levaduras los organismos claves por ser las responsables de conducir dicha fermentación alcohólica.

Las levaduras metabolizan las hexosas (glucosa y fructosa) presentes en el mosto a través de la glucólisis, a partir de la cual se obtiene ácido pirúvico (Pronk *et al.*, 1996). El primer paso del proceso glucolítico involucra el transporte de la glucosa o fructosa hacia el interior de la célula, proceso que se lleva a cabo por difusión facilitada. En el caso de la sacarosa, este carbohidrato es hidrolizado fuera de la célula por una enzima denominada invertasa que es secretada por la levadura al espacio periplasmático, luego los monosacáridos obtenidos son transportados al interior celular.

En condiciones anaeróbicas, como las que se establecen durante el proceso de elaboración de sidras, las levaduras transforman al piruvato mayoritariamente en etanol y CO₂, en el proceso de fermentación alcohólica antes mencionado (Figura 4). El objetivo de este proceso bioquímico, central en la elaboración de sidra y de otras bebidas fermentadas, es el de mantener el balance redox necesario para sostener el catabolismo glucolítico, única fuente de producción de energía de la célula en estas condiciones (Figura 4).

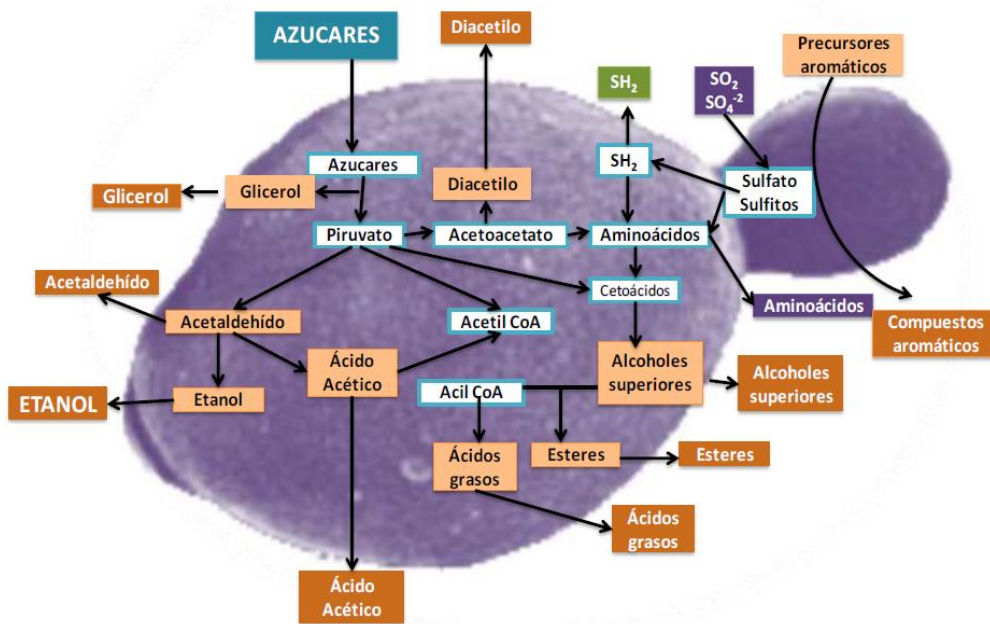


Figura 4: Esquema del metabolismo de una levadura durante la fermentación alcohólica. Extraído de Swiegers et al. (2005) con modificaciones.

La transformación natural o espontánea del mosto de manzana en sidra base es llevada a cabo por la acción secuencial de diferentes especies de levaduras salvajes naturalmente presentes en la superficie de las manzanas o sobre el equipamiento de la sidrera (Cabranes *et al.*, 1990; Martini y Martini, 1990; Sipiczki *et al.*, 2001; Coton *et al.*, 2006). En este tipo de fermentaciones, la etapa inicial está dominada por levaduras de bajo poder fermentativo como las pertenecientes a los géneros *Hanseniaspora* (*Kloeckera*) y *Metschnikowia* y en menor extensión, *Kluyveromyces*, *Lachancea*, *Pichia*, entre otras (Cabranes *et al.*, 1990; Coton *et al.*, 2006; Kurtzman *et al.*, 2011). Estas levaduras, colectivamente denominadas *no-sacaromicéticas*, alcanzan un desarrollo entre 1×10^6 - 1×10^7 UFC/mL durante los primeros 2 - 3 días de fermentación y a partir del estadio medio de la misma sus poblaciones comienzan a declinar hasta desaparecer, debido a que la concentración de alcohol se vuelve tóxica para ellas. A partir de ese momento, cepas de levaduras con alto poder fermentativo pertenecientes al género *Saccharomyces*, y mayoritariamente de la especie *S. cerevisiae* (más tolerantes a etanol y más competitivas para el crecimiento en medios con alta concentración de azúcar), se convierten en las levaduras dominantes (1×10^7 - 1×10^8 UFC/mL) y conducen la fermentación hasta su finalización.

Las levaduras del género *Saccharomyces* se pueden aislar tanto de ambientes naturales como de procesos industriales. Este género se compone de nueve especies naturales, dos de ellas asociadas a procesos de fermentación industrial (*S. uvarum* y *S. cerevisiae*) y siete aisladas de hábitats naturales (*S. arboricolus*, *S. cariocanus*, *S. eubayanus*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* y *S. paradoxus*) (Kurtzman y Robnett, 2003; Wang y Bai, 2008; Libkind *et al.*, 2011). De las dos especies aisladas en ambiente de fermentación, *S. cerevisiae* es la especie más ampliamente difundida en procesos de fermentación alcohólica. Por su parte, la especie *S. uvarum* está presente en fermentaciones de vinos y sidras de las regiones frías de Europa y en otras partes del mundo (Demuyter *et al.*, 2004; Naumov *et al.*, 2001).

Numerosos factores como la localización geográfica, condiciones climáticas, calidad de la materia prima y prácticas culturales del campo (Poulard *et al.* 1985; Piyasena *et al.*, 2002; Morrissey *et al.*, 2004), así como también la tecnología de la sidrera (Mangas *et al.*, 1994; del Campo *et al.*, 2003; Suárez Valles *et al.*, 2007a) afectan la extensión y diversidad de las levaduras participantes del proceso, la variedad y concentración de los metabolitos primarios y secundarios formados durante la fermentación alcohólica y por lo tanto de la calidad del producto final. También factores propios del proceso fermentativo como la disponibilidad de nutrientes, la producción de etanol y las interacciones antagónicas determinadas por la presencia de levaduras productoras de toxinas *killer* (Fleet, 2003) pueden afectar la biota inicial y la evolución de las distintas especies y cepas de levaduras durante el transcurso de la fermentación natural. Dichas interacciones antagónicas son relevantes en zonas geográficas donde la aparición del carácter *killer* en levaduras es significativo, tal como sucede en la región del Comahue (Sangorrín *et al.*, 2001, y 2007; Zajonskovsky *et al.*, 2004).

El fenotipo killer

La naturaleza ha seleccionado sofisticados mecanismos biológicos para la regulación de la dinámica de población en los diversos ecosistemas microbianos (Cassone *et al.*, 1997). Uno de esos mecanismos es la producción de toxinas fúngicas que matan a otros microorganismos taxonómicamente relacionados o no con las cepas productoras de las mismas. Estas exotoxinas con actividad antimicrobiana, mediada por receptores específicos de la pared celular del microorganismo susceptible, se denominan toxinas o factores *killer* (Magliani *et al.*, 1997).

El carácter *killer* en levaduras, reportado por primera vez en la década del 60 (Bevan y Makower, 1963), radica en la capacidad de ciertas cepas de sintetizar y secretar una toxina proteica o glicoproteica (factor *killer*) que resulta letal para otras cepas de levaduras, de su mismo género y especie y/o de otros géneros y especies. Si bien la ocurrencia natural del factor *killer* ha generado algunos factores negativos en las fermentaciones (Carrau *et al.*, 1993; Medina *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 2001), su utilización en cultivos iniciadores de fermentación ha sido propuesta (Shimizu, 1993; Nally, 2005). El uso de cepas de *S. cerevisiae* con carácter *killer* o neutras adecuadamente seleccionadas mejoraría la capacidad de competencia de las mismas frente al cepaje nativo, asegurando su dominancia en la fermentación (Martini y Martini, 1990; Longo *et al.*, 1992; Shimizu, 1993; Franken *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2001) y disminuyendo el riesgo de efectos negativos ocasionados por ciertas cepas silvestres, como las paradas de las fermentaciones y la producción de aromas indeseables (*off flavours*) (Palpacelli *et al.*, 1991; Lowes *et al.*, 2000).

2.2. Las levaduras y el aroma de las bebidas fermentadas

Durante la fermentación alcohólica las levaduras no sólo producen etanol y CO₂, como se mencionó previamente, sino también otros metabolitos que influyen significativamente en las características organolépticas de la bebida fermentada (Figura 4) (Swieger *et al.*, 2005). Entre estos metabolitos, los de mayor importancia son el glicerol, que contribuye a la sensación en boca; el ácido succínico y el ácido acético que aportan a la acidez (Swiegers *et al.*, 2005). Otros metabolitos secundarios importantes sintetizados durante la fermentación del mosto de manzana son los ésteres, los alcoholes superiores y los compuestos carbonílicos (Durieux *et al.*, 2005). Si bien ellos representan solamente un pequeño porcentaje (1,0 %) de la composición total de la bebida fermentada, tienen un efecto determinante sobre la calidad sensorial del producto, en particular sobre el aroma, debido a sus bajos umbrales de percepción del orden de los µg - mg (Pretorius, 2000; Eglinton *et al.*, 2002; Swiegers *et al.*, 2005).

Los ésteres son los responsables del aroma frutal de la sidra (Lafon – Lafourcade, 1983). Cuantitativamente el más importante es el acetato de etilo; contrariamente a lo que ocurre con otros ésteres de acetato como los de isoamilo (aroma a banana) y 2-feniletilo (aroma floral), los cuales son componentes deseables para el aroma, concentraciones de acetato de etilo

superiores a 200 mg/L afectan de manera negativa la calidad de la bebida otorgándole un aroma y gusto avinagrado y/o a solvente (Amerine *et al.*, 1982; de la Roza *et al.*, 2003).

Los alcoholes superiores agrupan a todos aquellos alcoholes que poseen más de dos átomos de carbono y mayor peso molecular y punto de ebullición que el etanol. La contribución al aroma y gusto de las bebidas alcohólicas de estos compuestos, depende de su concentración. Tanto en sidra como en vino, la concentración de alcoholes superiores totales considerada óptima para el aroma es de 400-500 mg/L. Concentraciones por encima de 1 g/L producen defectos en el producto obtenido (Bayonove *et al.*, 2000). Otros productos secundarios en la formación de algunos aminoácidos son los compuestos carbonílicos como el diacetilo, de mayor importancia aromática, (Figura 4) y la pentadiona. Concentraciones de estos compuestos superiores a 1-4 mg/L pueden causar defectos (*off flavours*) en el aroma de la bebida fermentada (Durieux *et al.*, 2005).

El *flavour* es la característica organoléptica distintiva de una bebida fermentada, y en un sentido amplio, es la impresión sensorial que brindan compuestos que aportan tanto al aroma como al sabor, y puede también incluir aspectos tales como acidez, dulzura, astringencia, entre otros (Robinson, 1994). La percepción del *flavour* es el resultado de una multitud de interacciones entre numerosos compuestos químicos volátiles y de receptores sensoriales. La influencia que un compuesto tendrá en el aroma final depende, inicialmente, de su concentración y umbral de percepción. Sin embargo, los compuestos aromáticos pueden interactuar en forma sinérgica (*i.e.*, la presencia de un compuesto mejora la percepción de otros) o antagónica (un compuesto suprime la percepción de otros). Por lo tanto, aun cuando un compuesto está presente en una concentración mucho menor a la de su umbral de percepción, éste puede impactar significativamente en la percepción del aroma de la mezcla.

Los aromas de las bebidas sidra o vino se agrupan en cuatro grandes categorías:

-*Primario o varietal*: proviene de la materia prima, en este caso de las manzanas utilizadas en la elaboración. Los compuestos volátiles más significativos en la manzana son los aldehídos, los alcoholes y los ésteres. Los ésteres como el propionato de etilo, acetato de butilo y 2-metilbutirato de etilo proporcionan un aroma típico de manzana y, en particular, este último presenta un fuerte impacto aromático con un umbral de detección, en jugo de manzana, de 0,1 µg/L (Lea, 1990). Otros compuestos volátiles como el acetato de hexilo y 1-butanol aportan notas dulces y afrutadas.

-*Pre-fermentativo*: contempla el aroma producto de los tratamientos realizados a las manzanas desde el momento de la cosecha hasta el inicio de la fermentación alcohólica (recolección, transporte, prensado, entre otros). Está constituido principalmente por alcoholes y aldehídos de seis átomos de carbono responsables de aromas herbáceos y a veces amargos.

-*Fermentativo o secundario*: formado durante la fermentación, está constituido por compuestos derivados del metabolismo de las levaduras durante la fermentación alcohólica y Maloláctica (llevada a cabo por bacterias lácticas), en el caso que ésta se realice. Cuantitativamente son los compuestos más abundantes del aroma de una sidra y los más relevantes en este trabajo debido a que son producidos por las levaduras. En cuanto a los umbrales de percepción y los rangos de concentraciones óptimas de cada compuesto, no se encuentran formalmente definidos en sidras, por ende se utilizan los datos medidos en cerveza debido a que las concentraciones de etanol varían la cuantificación de los compuestos, por ende es más apropiado utilizar las concentraciones óptimas en cerveza que las de vinos, los cuales presentan graduaciones alcohólicas mucho mayores que la sidra (Williams, 1974). En la Tabla 2 se describen los principales compuestos que forman el aroma fermentativo, junto con las concentraciones medidas en una sidra tipo y los umbrales óptimos (medidos en cerveza) para una bebida con buen *flavour*, además se describen los umbrales de percepción (concentración mínima que se requiere para ser detectado por el comensal), junto con los descriptores de los aromas del compuesto.

En cuanto a las concentraciones de estos compuestos aromáticos que producen defectos en las sidras, se toman los valores caracterizados en vinos. Una concentración de alcoholes superiores totales por encima de 1 g/L se percibe como un defecto aromático. El olor de los alcoholes superiores es generalmente juzgado como desagradable, excepto el olor a rosas del 2-feniletanol (Bayonove *et al.*, 2000). Por el contrario, los ésteres presentan aromas agradables, a excepción del acetato de etilo cuyo aroma es desagradable cuando sus concentraciones son superiores a 100 mg/L (Amerine y Roessler, 1976). Respecto del ácido acético, representa más del 95 % de la acidez volátil producida por las levaduras y a pesar de su “reputación” negativa ligada al vinagre, es necesario en el aroma a concentraciones entre 200 y 700 mg/L, concentraciones mayores causan defectos graves (Bayonove *et al.*, 2000). Respecto de los fenoles volátiles el 4-vinifenol, el 4-viniguayacol, el 4-etilfenol y el 4-etilguaiacol son los más significativos como componentes clásicos del aroma de las bebidas fermentadas (Etievant, 1981). Cuando sus concentraciones superan el umbral de percepción

producen el típico aroma a sudor de caballo o medicinal (*off flavours*) (Chatonnet *et al.*, 1992).

Tabla 2: Compuestos volátiles más representativos del aroma secundario, concentraciones en sidra, umbrales de percepción y características aromáticas.

COMPONENTE	CONCENTRACION EN SIDRA (mg/L) ^a	UMBRALES ÓPTIMOS (mg/L) ^b	UMBRALES DE PERCEPCIÓN (mg/L) ^c	DESCRIPCIÓN DEL AROMA ^d
Acetaldehído	50	16-50	1,7	Jerez, manzana, nuez
Ácidos orgánicos				
Ácido acético	20	20-100	2	Vinagre, picante
Ácido cítrico	65	85-317	0,28	-
Ácido láctico	30	47-252	2	-
Ácido málico	50	87-208	30	-
Alcoholes superiores				
Alcohol isoamílico	-	6-400	30*	Crema de almendras
Alcohol isobutílico	25	1-20	0,2	solvente, amargo
1-propanol	5	1,5-8	0-0,01	Acre, áspero
1-butanol	5	50	0-0,16	Solvente
1-hexanol	5	-	1	Resina, flores
2-feniletanol	50	4-120	10	Rosa, lila, miel
Ésteres				
Acetato de etilo	15	25-94	12,3	Barniz o solvente
Acetato de hexilo	0,1	-	0-0,5	Perfume, dulce
Acetato de isoamilo	-	0,1-3,4	0,26*	Banana, ananá
Acetato de isobutilo	0,1	1	1,6*	Banana
Acetato de 2-feniletilo	0,2	0,02-0,05	0,25*	Flores, rosa, frutal
Butirato de etilo	0,04	0,01	0,02*	Floral, frutal
Hexanoato de etilo	0,5	0,5	0,05*	Manzana
Octanoato de etilo	0,4	1	0,02*	Ananá, pera
Decanoato de etilo	0,2	-	0,18*	Floral, jabón
Lactato de etilo	4	5	0,12*	Leche agria
Terpenos				
Linalool	-	0,0017-0,010 ^b	0,0015***/0,025** ^b	Rosa
Geraniol	-	0,001-0,044 ^b	5***/30* ^b	Rosa
Fenoles volátiles				
4-etilfenol	2	1	2	Sudor de caballo
4-etilguaiacol	1	0,05	2	Caramelo, quemado

^a: Williams, 1974; ^b: Dato óptimo en vino (Swiegers *et al.*, 2005); ^c: Williams, 1974 medidos en cerveza- excepto que se indique otra categoría; * 10 % etanol; ** Vino sintético; *** Agua. ^d: Descriptores aromáticos extraídos de Swiegers *et al.*, 2005.

-*Post-fermentativo*: incluye todos los compuestos volátiles que se forman durante la conservación y añejamiento.

2.3. Selección de levaduras para cultivos iniciadores de sidra

El proceso de elaboración de sidras por las poblaciones mixtas de levaduras indígenas presentes en la fermentación natural, aportan características organolépticas de gran complejidad aromática. Sin embargo, debido a que las contribuciones individuales y colectivas que las diferentes especies y cepas nativas son difíciles de predecir, las características sensoriales de la bebida obtenida también lo son. Ante un mercado de ventas que exige calidad constante, esta falta de reproducibilidad de las fermentaciones naturales representa un serio problema industrial. Por esta razón, las prácticas enológicas tradicionales han sido modificadas introduciendo el uso de cultivos iniciadores que permite realizar un control microbiológico del proceso, mediante la normalización de la biota participante. Indudablemente, el cultivo iniciador no puede ser cualquier levadura, sino que debe tratarse de una levadura seleccionada que no sólo permita controlar el proceso sino que además genere en el producto final cambios organolépticos favorables.

Los cultivos iniciadores son generalmente cultivos puros de cepas seleccionadas de *S. cerevisiae* (que como se dijo anteriormente es una especie altamente tolerante al alcohol, de gran poder fermentativo y de fácil desarrollo). Las levaduras seleccionadas, liofilizadas o secas y activas, se añaden al mosto fresco para conducir la fermentación, asegurando que ésta sea más rápida y completa.

El uso de levaduras seleccionadas ha resuelto el problema no sólo de falta de reproducibilidad en la calidad final de las sidras sino también los de contaminación de los caldos y de detenimiento de las fermentaciones observadas con cierta frecuencia en las fermentaciones naturales (Cuinier, 1986; Querol, 1992b). Este tipo de tecnología se comenzó a desarrollar en los años cincuenta del siglo pasado en laboratorios europeos (Ulbrich y Saller, 1951), canadienses (Adams, 1953; 1954) y americanos (Castor, 1953) y es hoy en día la práctica más común en el mundo, obteniéndose un producto final de mejor calidad que el producido vía fermentación espontánea tradicional (Riberau-Gayon, 1985; Giudici y Zambonelli, 1992; Fleet y Heard, 1993).

No obstante, aun cuando la inoculación de mostos con levaduras seleccionadas es hoy de uso corriente en muchas regiones del mundo, existen opiniones controvertidas respecto del uso de

levaduras comerciales. La crítica más importante es que la fermentaciones alcohólicas conducidas con cultivos puros comerciales de *S. cerevisiae* producen bebidas de calidad sensorial estándar, con perfiles aromáticos planos, que pierden muchas, sino todas, de las características distintivas propias de cada varietal y *terroir* otorgada por la compleja biota de levaduras indígenas presente en las fermentaciones naturales (Pretorius, 2000). Con el fin de resolver estos problemas, en los últimos años han surgido modalidades fermentativas nuevas que hacen uso del empleo de cultivos iniciadores formados con levaduras seleccionadas indígenas de cada región productiva particular (Querol y Ramón, 1996).

La inoculación de mostos con cepas regionales seleccionadas (mejor adaptadas a las características agro-ecológicas de cada región) permitiría obtener sidras con las características propias y específicas de cada región, similares a las obtenidas por fermentaciones espontáneas pero de calidad controlada (Querol *et al.*, 1992 b; Rainieri y Pretorius, 2000). Usualmente la selección ha estado orientada a cepas de la especie *S. cerevisiae*. Sin embargo, la imposibilidad de reunir en una sola cepa todas las propiedades deseables ha planteado la necesidad de desarrollar cultivos iniciadores mixtos constituidos por cepas de diferentes especies, muchas de las cuales son capaces de producir ciertas enzimas (esterasas, proteasas, pectinasas, glucosidasas, entre otras) cuyas actividades pueden influir en las características aromáticas del producto o en ciertas etapas del proceso de elaboración (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1998; Jolly *et al.*, 2006).

Tanto *S. cerevisiae* como *S. uvarum* son capaces de crecer en sustratos con altas concentraciones de azúcares y elevado contenido de etanol, bajo pH, y alta concentración de dióxido de azufre. Sin embargo, ciertas características tecnológicas asociadas con *S. uvarum* difieren significativamente de aquellas presentadas por cepas de *S. cerevisiae* (Sipiczki, 2002; Masneuf-Pomerède *et al.*, 2010).

La especie *S. uvarum* es reportada como una especie criotolerante con propiedades fermentativas destacables para ser usada como cultivo iniciador, se destaca principalmente por una mayor velocidad de consumo de fructosa, menor producción de acidez volátil, por producir una alta concentración de glicerol, alcoholes superiores y ésteres al igual que los híbridos artificiales entre esta especie y *S. cerevisiae* (Gamero *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014), y por presentar sus productos fermentados mayor intensidad aromática que cepas de *S. cerevisiae* (Coloretti *et al.*, 2006; Eglinton *et al.*, 2000). Es muy abundante en sidras (Coton *et*

al., 2006; Suárez Valles *et al.*, 2007), en vinos realizados a bajas temperaturas (Sipiczki, 2002) y en determinados ambientes naturales (Rodríguez *et al.*, 2014).

Criterios de selección de cepas

La selección de la cepa que constituirá un cultivo iniciador se realiza siguiendo ciertos criterios que pueden ser generales (Degré, 1993) o específicos de determinadas regiones vitivinícolas como Roussillon (Guittard, 1980), Alsace (Meyer, 1979), Champagne (Valade *et al.*, 1984) o Côte de Rhône (Colas *et al.*, 1984). Los criterios generales establecidos para cepas de *S. cerevisiae* se basan en la evaluación de ciertas características metabólicas y fisiológicas de las mismas que les otorgan propiedades interesantes desde el punto de vista cualitativo y ventajoso desde el punto de vista tecnológico (Tabla 3). Recientemente algunos autores han considerado relevante incorporar algunos criterios ecológicos, como la evaluación de la conducta *killer*, sobre todo en aquellas áreas vitivinícolas donde el fenómeno *killer* está ampliamente difundido (Lopes, 2004). El uso de starters de cepas *killer* adecuadamente seleccionadas ofrecería tres ventajas comparativas: eliminar determinado tipo de cepas nativas que producen efectos negativos en el proceso de productivo, resultar inmune a las toxinas *killer* producidas por cepas nativas garantizando su dominancia en la fermentación y proteger el producto de infecciones producidas por cepas de levaduras contaminantes (Martini y Martini, 1990; Longo *et al.*, 1992; Shimizu, 1993; Franken *et al.*, 1998).

Tabla 3: Criterios de selección de levaduras vínicas.

PROPIEDADES CUALITATIVAS	PROPIEDADES TECNOLÓGICAS
<ul style="list-style-type: none"> • Baja formación de sulfhídrico, tioles y dimetilsulfóxido. • Baja producción de acidez volátil. • Alta producción de glicerol. • β-glucosidasas. • Proteasas. • Producción diferencial de ésteres. • Autólisis. 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta eficiencia fermentativa. • Rápida iniciación de la fermentación. • Alta tolerancia al etanol. • Baja temperatura de fermentación (10-18°C). • Alta osmotolerancia. • Alta estabilidad genética. • Alta tolerancia al bisulfito. • Baja formación de espuma. • Factor <i>killer</i>.

2.4. Perspectiva en la región del Comahue

Como ya se mencionó, en la región Norpatagónica, la elaboración de sidra se realiza por fermentación espontánea de los mostos de manzana, y en menor grado de pera, con la consecuente variabilidad de calidad del producto. El uso de cultivos iniciadores de la fermentación alcohólica desarrollados a partir de cepas de levaduras nativas de la región y seleccionadas para tal fin, constituye una herramienta estratégica para la elaboración de productos de calidad controlada y diferencial. Además, siendo las fermentaciones conducidas a bajas temperaturas se obtienen perfiles aromáticos característicos y mejorados ya que se retienen compuestos relacionados con el *flavour* (Lambrecht y Pretorius, 2000).

Es importante resaltar que existen pocas levaduras criotolerantes en el mercado, con lo cual las bebidas obtenidas con ellas en diferentes lugares del mundo presentan características similares en los compuestos derivados del metabolismo de la levadura. Esto motiva a evaluar la potencialidad de cepas nativas seleccionadas de *S. uvarum* y *S. eubayanus*, para ser utilizadas en la elaboración de sidras a bajas temperaturas con características organolépticas diferenciales.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar las características fisiológicas de cepas criotolerantes de *Saccharomyces uvarum* y *Saccharomyces eubayanus* aisladas de la región patagónica de relevancia para el desarrollo de cultivos iniciadores destinados a la elaboración de sidras a bajas temperaturas y con características organolépticas diferenciales.

Objetivos específicos:

- Estudiar el comportamiento fermentativo de cepas de *Saccharomyces uvarum* y *Saccharomyces eubayanus* aisladas de la Patagonia y conservadas en la colección de cultivos del PROBIEN en ensayos de laboratorio con mosto de manzana a baja temperatura.
- Aplicar y seleccionar modelos para el ajuste de las cinéticas de fermentación y la obtención de parámetros cinéticos que permitan comparar de manera apropiada el comportamiento fermentativo de las cepas en estudio.
- Evaluar en los productos fermentados los principales parámetros fisicoquímicos de relevancia para la elaboración de bebidas fermentadas (etanol, azúcares residuales, glicerol) y seleccionar cepas con las mejores características.
- Evaluar el comportamiento fermentativo y la producción de compuestos aromáticos de las cepas seleccionadas en dos mostos de manzana diferentes a baja temperatura.
- Conservar las levaduras con las mejores características en la colección de cultivos del PROBIEN para su evaluación a escala piloto en futuros ensayos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se emplearon 19 cepas de *Saccharomyces uvarum* y 13 cepas de *Saccharomyces eubayanus* previamente aisladas, identificadas y molecularmente caracterizadas en el laboratorio donde se realizó esta tesis. Ambas especies de levaduras se obtuvieron de árboles de *Araucaria araucana* y de chicha de manzana producida tradicionalmente (Tabla 4). Una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* obtenida de vino se utilizará con fines comparativos. Todas las cepas se encuentran depositadas en la Colección de Cultivos de la Patagonia Norte (NPCC - North Patagonian Culture Collection, Neuquén, Argentina).

Tabla 4: Cepas de levaduras estudiadas y origen.

ESPECIE	CEPAS (Número NPCC)	ORIGEN	FUENTES
<i>S. eubayanus</i>	1282-1287,1291-1292,1294,1296-1297,1301-1302	<i>Araucaria araucana</i>	Rodríguez <i>et al.</i> (2014)
<i>S. uvarum</i>	1288-1290, 1293, 1298	<i>Araucaria araucana</i>	Rodríguez <i>et al.</i> (2014)
	1309,1311,1314-1317,1320-1324,1328-1330	<i>Chicha de manzana</i>	Rodríguez <i>et al.</i> (2017)
<i>S. cerevisiae</i>	1178 (MMf9)	<i>Vino</i>	Lopes <i>et al.</i> (2002)

NPCC: North Patagonian Culture Collection, Neuquén, Argentina.

Adicionalmente se utilizaron dos cepas sensibles a toxinas: *S. cerevisiae* P351 (colección de levaduras PROIMI) y *Candida glabrata* NCYC 388.

2. MEDIOS DE CULTIVO

- GPY - caldo (m/v): 0,5% extracto de levadura, 0,5% peptona, 2% glucosa.
- GPY - agar (m/v): 0,5% extracto de levadura, 0,5% peptona, 2% glucosa, 2% agar.
- Medio básico - agar para ensayos de actividad proteasa (m/v): 0,67% YNB, 0,2% glucosa, 2% agar, 1% leche desnatada.
- Medio básico - agar para ensayos de actividad pectinasa (m/v): 0,67% YNB, 0,2% glucosa, 2% agar, 1% pectina de manzana (pH 4,5).
- Medio básico - agar para ensayos de actividad glucosidasa (m/v): 0,67% YNB, 0,2% glucosa, 2% agar, 1mM pNPG.
- Medio básico - agar para ensayos de actividad xilosidasa (m/v): 0,67% YNB, 0,2% glucosa, 2% agar, 1mM pNPX.

- Medio esculina - agar para ensayos de actividad glucosidasa (m/v): 0,67% YNB, 0,5% esculina, 0,1% glucosa, 0,02% citrato de amonio férrico, 2% agar. (pH 5)
- Medio YEPD-MB - agar para ensayos de actividad antagonista (m/v): 1% extracto de levadura, 2% glucosa, 2% peptona, 2% agar, 0,0003% azul de metileno. (pH 4,6)

3. SOLUCIONES

- Solución de NaOH: 0,1 N (Para determinación de acidez volátil y total)
- Solución de yodo: 0,02 N (Para determinación de SO₂ libre y total)
- Solución de KOH: 1 N (Para determinación de SO₂ total)
- Solución de Lugol (Para determinación de actividad pectinasa)
- Solución pNPG 1mM (Para determinación de actividad glucosidasa)
- Solución pNPX 1mM (Para determinación de actividad xilosidasa)
- Solución tampón Citrato - Fosfato: 0,5 M, pH 4,6. (Para determinación de actividad antagonista).

4. EQUIPAMIENTO

- Microcentrífuga (marca Eppendorf modelo 5424)
- Centrífuga (marca Ecus)
- Agitador orbital (marca Arcano)
- Vortex/Mixer (marca Labnet)
- Microscopio Nikon Eclipse 80i
- Estufa con control de temperatura
- Heladera para refrigeración
- Autoclave tipo chamberland (marca VZ 50Lts)
- Espectrofotómetro PG Instruments T60
- Balanza (marca Radwag)
- Refractómetro
- Cámara de flujo laminar vertical
- Equipo de destilación para medir etanol y acidez volátil
- pH-metro (marca Oakton)

5. MOSTOS

Se emplearon dos mostos: Granny Smith (°Brix: 12,5; azúcares totales: 132,3 g/L; acidez total: 5,58 g/L; SO₂ total: 90 mg/L, SO₂ libre: 58 mg/L, pH: 3,54) y Royal Gala (°Brix: 11,9; azúcares totales: 125,7 g /L; acidez total: 4,73 g /L, SO₂ total: 112 mg/L; SO₂ libre: 70 mg/L, pH: 3,56). Para las microfermentaciones el mosto Royal Gala se esterilizó a 120 °C durante 15 minutos en autoclave y para las fermentaciones en 1L, el mosto se sometió a vapor fluyente (100°C durante 15 minutos) a fin de reducir la carga microbiana sin modificar los compuestos precursores de aromas de la sidra.

6. MICROFERMENTACIONES

Las fermentaciones a escala de laboratorio se llevaron a cabo en frascos de 50 mL conteniendo 35 mL de jugo de manzana Royal Gala estéril, que se inocularon individualmente con 2×10^6 células/mL de la respectiva cepa de levadura y se incubaron a 13°C sin agitación. Los ensayos se realizaron por triplicado; por lo tanto, se realizaron un total de 99 microfermentaciones. La evolución de la fermentación fue seguida diariamente por pérdida de peso (desprendimiento de CO₂) hasta peso constante durante dos medidas consecutivas. Cada uno de los mostos fermentados fue centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante límpido fue almacenado a 4°C hasta su análisis.

7. ESCALADO DE LAS FERMENTACIONES

Las fermentaciones se llevaron a cabo en frascos de 1 L conteniendo 750 mL de mostos de manzana (Royal Gala o Granny Smith) , inoculados con una cepa de cada origen y especie previamente seleccionadas de manera tal de obtener una población inicial de 2×10^6 células/mL. Los ensayos se realizaron por duplicado a 13°C. La evolución de las fermentaciones se controló mediante la medición diaria de grados Brix (°Brix) por refractometría. Las fermentaciones se detuvieron en forma simultánea, y el criterio de detención fue que al menos 2 cepas lleguen a valores constantes de °Brix. Los productos fermentados fueron centrifugados a 3000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante límpido fue almacenado a 4°C hasta su análisis.

8. MODELADO DE PARÁMETROS CINÉTICOS

- **Cinéticas de fermentación a partir de liberación de CO₂**: Los parámetros cinéticos se calcularon individualmente a partir de cada fermentación usando la cantidad de CO₂ liberada diariamente por el sistema y la ecuación reparametrizada de Gompertz propuesta por Zwietering *et al.* (1990), empleando para su modelado el paquete estadístico STATISTICA 7.0 y su opción Quasi-Newton (StatSoft, Tulsa, OK, USA). El ajuste de la curva a los datos experimentales se realizó mediante una regresión no lineal, minimizando la suma de las desviaciones al cuadrado de los valores observados de la variable dependiente respecto a los predichos por el modelo. La ecuación reparametrizada de dicho modelo es:

$$Y = A * \exp \left(- \exp \left(\left(\left(\frac{\mu_{\max} * e}{A} \right) * (\lambda - t) + 1 \right) \right) \right)$$

Donde $Y = \ln(N_t/N_0)$, N_0 es el peso inicial del sistema (g) y N_t es el peso en el instante t (h); $A = \ln(N_\infty/N_0)$ es la máxima producción de CO₂ con N_∞ como máximo asintótico, μ_{\max} es la máxima velocidad de fermentación (g/h) y λ el período de tiempo necesario para iniciar la fermentación vigorosa (h). La Figura 5 muestra una curva de cinética de fermentación típica con los parámetros descriptos.

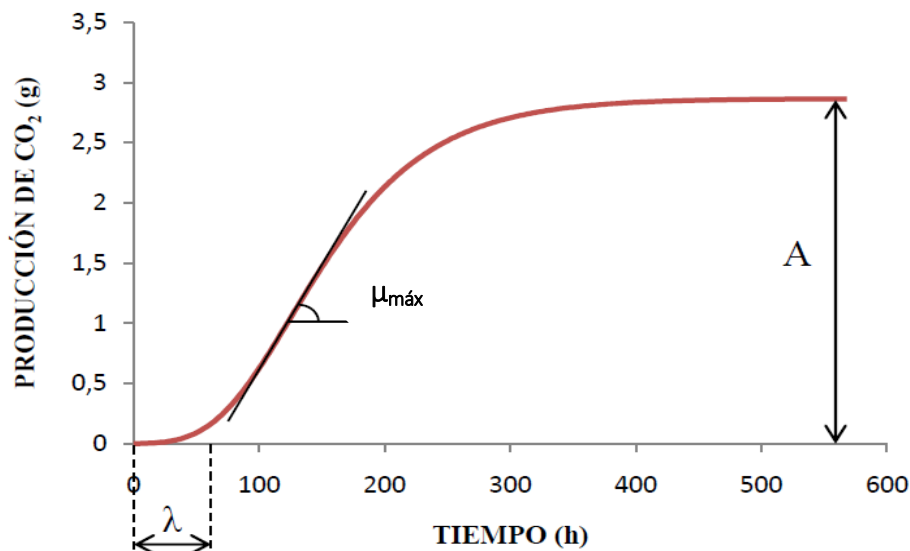


Figura 5: Parámetros cinéticos de una curva típica de fermentación.

-Cinéticas de fermentación a partir de la disminución de °Brix: La disminución de °Brix durante las fermentaciones de 1L se ajustó a la función de decaimiento exponencial previamente utilizada por Arroyo-López *et al.* (2008):

$$Y = D + S * e^{-(K*t)}$$

Donde Y es el valor final de °Brix en el tiempo, t es el tiempo (h), D es un valor específico cuando $t \rightarrow \infty$, S es el valor estimado del cambio (diferencia entre la concentración inicial y final) y K es la constante cinética (°Brix/h).

9. PARÁMETROS ENOLÓGICOS

En las sidras obtenidas tanto a partir de las microfermentaciones como de las fermentaciones a escala mayor (50 mL y 1 L, respectivamente) se evaluó el contenido de glucosa, fructosa, etanol, glicerol, acidez total, acidez volátil y pH. La mayoría de los parámetros enológicos generales se determinaron según los métodos propuestos por Ribereau-Gayon *et al.* (2003). La concentración de etanol se determinó por destilación y se expresó como grados de Gay Lussac (°GL o % v/v, solo evaluado para escala 1L). La acidez volátil se determinó por destilación por arrastre con vapor de agua seguida de titulación a la fenolftaleína con NaOH 0,1 N y se expresó como ácido acético (g/L). La acidez total se determinó por titulación con peachímetro usando NaOH 0,1 N y expresada como ácido tartárico (g/L). El SO₂ libre se determinó por titulación directa con yodo y el SO₂ total se determinó por tratamiento con KOH (1 N) seguido de titulación con yodo. Las concentraciones de glucosa, fructosa y glicerol se determinaron enzimáticamente utilizando kits comerciales de Megazyme.

10. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES

En las sidras obtenidas a partir de las fermentaciones de 1L se evaluaron los compuestos volátiles producto del metabolismo de las levaduras, incluyendo alcoholes superiores, ésteres, acetaldehído, terpenos, fenoles volátiles, y ácidos orgánicos.

La determinación de alcohol isobutílico, acetato de etilo, 1-butanol, lactato de etilo y alcohol isoamílico se realizó mediante cromatografía gaseosa en equipo GC 7890^a (HS-GC-FID), equipado con detector de ionización por llama (FID).

La determinación de 2-feniletanol, 1-propanol, butirato de etilo, 1-hexanol, hexanoato de etilo, acetato de hexilo, alcohol alfa-terpineol, 4-etilfenol, 4-etilguaiacol, limoneno, linalol, nerol, geraniol, acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, acetato de 2 feniletilo, acetato de bencilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo, succinato de dietilo, alcohol bencílico y acetaldehído se realizó mediante cromatografía gaseosa con microextracción en fase sólida y detector de espectrometría de masas (SPME-GC-MS).

La determinación de ácidos orgánicos se realizó mediante análisis cromatográfico por HPLC con detector UV-Visible, según Métodos Oficiales de Análisis de la AOAC Internacional. Para ello se utilizó un Sistema de Cromatografía Líquida Shimadzu compuesto por: Bomba LC 20AT, Horno de columna CTO 6A, Controlador CBM 20A, Autoinyector SIL 10 A, Detector de Arreglo de Diodos SPD-M10A con computadora con software de adquisición de datos LC Solution. Las muestras se filtraron a través de filtros de nylon de 0,45 μm y se inyectaron directamente (10 μl) en la columna cromatográfica.

11. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Se realizaron ensayos cualitativos de detección de actividad enzimática en medios sólidos usando cultivos de levadura jóvenes (cultivos de 24-48 h en GPY).

Actividad proteasa: Las placas de agar - leche desnatada, que contenían medio de agar básico (m/v: 0,67% YNB, 0,2% glucosa y 2% agar) se suplementaron con leche desnatada en polvo al 1% m/v, se inocularon con cultivos de levadura frescos y se incubaron a 26°C durante 3 días. La aparición de halos claros alrededor de las estrías de levaduras fue indicativa de actividad proteolítica (González *et al.*, 2004).

Actividad pectinasa: La actividad pectinasa se evaluó utilizando medio básico suplementado con pectina de manzana al 1% m/v (pH 4,5). Las placas se incubaron a 26°C durante 5 días. La actividad enzimática se evidenció mediante la formación de una zona clara alrededor de las colonias en contraste con un fondo marrón púrpura sobre placa de pectina después de la adición de solución de Lugol (Fernandes-Salomão *et al.*, 1996).

Actividades glucosidasa: A tubos (1,5 ml) que contenían 500 μl de agar de medio básico se les adicionó una solución de P-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG) y p-nitrofenil- β -D-xilosido (pNPX) 1 mM, para evaluar las actividades de β -glucosidasa (βGl) y β -xilosidasa

(β Xy), respectivamente (Rodríguez *et al.*, 2004). Los cultivos se incubaron a 26 °C durante 5 días. Las cepas de levadura que presentan actividades enzimáticas desarrollaron una coloración amarilla en el medio de cultivo después de la adición de solución buffer de Na₂CO₃ 250 mM (100 μ l). También se ensayó el medio esculina - agar (m/v: 0,67% YNB, 0,5% esculina, 0,1% glucosa, 0,02% citrato de amonio férrico, 2% agar, pH 5) para confirmar la actividad de β Gl. En este caso, las cepas que muestran actividad β Gl produjeron un halo de color marrón oscuro alrededor de la colonia (Hernández *et al.*, 2003).

12. ACTIVIDAD ANTAGONISTA

La actividad antagonista se evaluó utilizando la técnica en placa en medio YEPD - MB (m/v: 1% extracto de levadura, 2% glucosa, 2% peptona, 2% agar, 0,0003% azul de metileno) bufferizada a pH 4,6 con una solución de fosfato - citrato 0,5 M. Esta técnica se utilizó tradicionalmente para evaluar el comportamiento *killer* en levaduras (Sangorrín *et al.*, 2002). Las cepas de colección *S. cerevisiae* P351 (colección de levaduras PROIMI) y *Candida glabrata* NCYC 388 se usaron como levaduras sensibles al factor *killer*.

13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se efectuó un ANOVA-análisis Post Hoc de Tukey (HSD - honest significant difference-) con un nivel de significancia del 5% ($\alpha=0,05$), para determinar si las diferencias en los parámetros fisiológicos y cinéticos son estadísticamente significativas (utilizando el paquete estadístico STATISTICA 7.0). La normalidad de los datos y la homogeneidad de la varianza en los residuos se verificaron por los ensayos de Lilliefors y Bartlett, respectivamente. Asimismo se realizó un análisis multivariado o análisis de componentes principales (PCA -Principal component analysis-) y un análisis de *clusters* (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA) sobre variables cinéticas y fisicoquímicas usando el programa NTSYS (Numeral Taxonomic System, versión 2.11) (Rohlf, 2000); para evaluar las relaciones entre las cepas en estudio y detectar las principales variables que caracterizan su actividad fermentativa (Rohlf, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. EVALUACIÓN DE LAS LEVADURAS EN MICROFERMENTACIONES

Con el propósito de conocer el comportamiento fermentativo de cepas de *Saccharomyces*, se llevaron a cabo microfermentaciones (50 ml) en mosto de manzana Royal Gala estéril. Se utilizaron 19 cepas de *S. uvarum* y 13 cepas de *S. eubayanus* aisladas de chicha de manzanas silvestres y de ambientes naturales como corteza y semillas de *Araucaria araucana*; junto a una cepa vínica de *S. cerevisiae*. Las fermentaciones se llevaron a cabo a 13°C por triplicado. Se evaluaron las cinéticas de dichas fermentaciones y se determinaron los principales parámetros fisicoquímicos de las sidras obtenidas.

1.1. Cinéticas de fermentación

Las fermentaciones se siguieron mediante medición del peso de los fermentadores a lo largo del tiempo. Debido a que el metabolismo de las levaduras produce CO₂, el peso total de los fermentadores disminuye y esta pérdida de peso puede representarse para obtener las cinéticas de fermentación de cada cepa. Las cinéticas obtenidas de este modo se ajustaron empleando el modelo de Gompertz modificado. Para todos los casos el ajuste fue adecuado debido a que siempre la proporción de la variancia respecto de los datos experimentales explicada por el modelo (r^2) resultó ser mayor a 0,99. Del modelado de cada curva se obtuvieron los siguientes parámetros cinéticos: producción total de CO₂ (A), velocidad máxima de fermentación ($\mu_{\text{máx}}$) y tiempo necesario para comenzar la fermentación tumultuosa (λ). A modo de ejemplo se muestran la curva que modela la cinética de fermentación de la cepa NPCC 1296 junto con los datos experimentales y los parámetros obtenidos del ajuste (Figura 6).

Se calculó el valor promedio y su respectivo desvío estándar para cada uno de los parámetros cinéticos (Tabla 5) y con ellos se graficaron las curvas modeladas del comportamiento cinético medio para cada cepa (Figura 7).

Todas las microfermentaciones presentaron cinéticas normales y como regla general, todas las cepas evidenciaron cantidades residuales de azúcares reductores totales (glucosa + fructosa) menores a 0,6 g/L. Las fermentaciones alcohólicas realizadas a 13°C se dieron por concluidas en promedio luego de 595 horas (aproximadamente 25 días). Las principales diferencias entre las cepas se observaron en los parámetros cinéticos A (producción máxima de CO₂) y λ

(tiempo requerido, en horas, para iniciar la fermentación vigorosa). Dichas diferencias se pueden ver en las gráficas de las cinéticas modeladas para cada cepa (Figura 7).

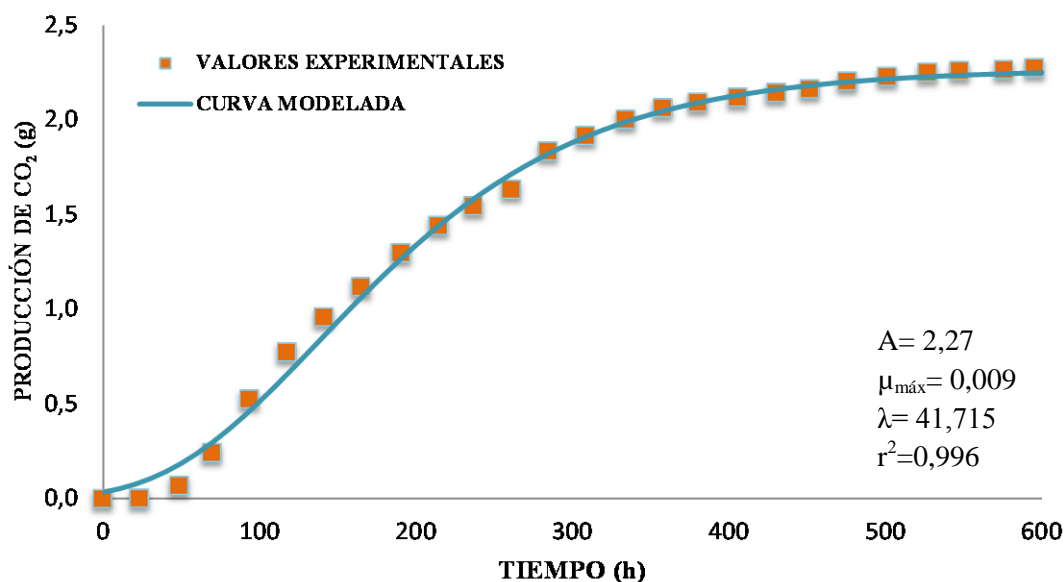


Figura 6: Cinética de fermentación obtenida con la función de Gompertz modificada a partir del modelado de los valores experimentales para la cepa NPCC 1296. Siendo A: producción total de CO₂ (g), $\mu_{\text{máx}}$: velocidad máxima de fermentación (g/h), λ : tiempo necesario para comenzar la fermentación tumultuosa (h), r^2 : coeficiente de correlación.

Los valores más bajos del parámetro cinético λ se observaron en las microfermentaciones conducidas por *S. uvarum* y *S. eubayanus*, mientras que aquellas conducidas con *S. cerevisiae* mostraron el valor más elevado de este parámetro cinético ($71,97 \pm 0,58$ h). Esta diferencia podría estar relacionada con la dificultad de *S. cerevisiae* de fermentar a baja temperatura y su dificultad de crecer en un mosto con una proporción de fructosa más elevada, típica en mosto de manzana pero no del mosto de uva de donde se aisló esta levadura. Se han señalado diferentes explicaciones para una utilización mejorada de la fructosa para diferentes especies de *Saccharomyces*. En *S. cerevisiae*, se reportó que la elevada utilización de fructosa se debía a la presencia de un transportador de hexosa mutado (Guillaume et al., 2007). En las especies *S. bayanus* y *S. pastorianus*, se propuso la existencia de un simporte fructosa / H⁺ en coexistencia con el sistema de difusión facilitada para las hexosas normalmente presente en las levaduras del género, como causa del eficaz transporte de fructosa (Gonçalves et al.,

2000). Llamativamente, Tronchoni *et al.*, (2009) evidenciaron que *S. uvarum*, así como *S. kudriavzevii*, muestran una ligera preferencia por fructosa en relación con *S. cerevisiae*, al inicio de la fermentación. Esta preferencia también podría estar ocurriendo en los ensayos de este trabajo, siendo una posible explicación para el λ inferior de *S. uvarum* y *S. eubayanus*.

Tabla 5: Parámetros cinéticos de las microfermentaciones en mosto de manzana Royal gala.

Especie	Origen	Cepa (n° NPCC) ^a	Parámetros cinéticos		
			A (g)	$\mu_{\text{máx}}$ (g/h)	λ (h)
<i>S. eubayanus</i>	Araucaria araucana	1282	2,30±0,01 ^{bc}	0,0060±0,0001 ^{ab}	46,20±0,01 ^{bc}
		1283	2,26±0,01 ^{bc}	0,0080±0,0001 ^{bc}	46,02±2,41 ^{ab}
		1284	2,28±0,05 ^{bc}	0,0070±0,0001 ^{abc}	45,31±2,60 ^{ab}
		1285	2,30±0,12 ^{bc}	0,0070±0,0001 ^{abc}	43,09±2,15 ^{ab}
		1286	2,16±0,05 ^a	0,0060±0,0001 ^{ab}	47,35±8,82 ^{ab}
		1287	2,07±0,04 ^a	0,0070±0,0001 ^{abc}	36,45±3,19 ^{ab}
		1291	2,16±0,01 ^a	0,0080±0,0001 ^{bc}	43,19±0,09 ^{ab}
		1292	2,41±0,03 ^c	0,0070±0,0001 ^{abc}	39,09±1,98 ^{ab}
		1294	2,34±0,07 ^c	0,0070±0,0010 ^{abc}	49,61±5,01 ^{ab}
		1296	2,21±0,08 ^{bc}	0,0080±0,0001 ^{bc}	43,18±2,08 ^{ab}
		1297	2,27±0,01 ^{bc}	0,0090±0,0001 ^c	47,94±0,01 ^{ab}
		1301	1,99±0,07 ^a	0,0070±0,0010 ^{abc}	46,88±4,09 ^{ab}
		1302	2,06±0,02 ^a	0,0070±0,0001 ^{abc}	38,68±10,04 ^{ab}
<i>S. uvarum</i>		1288	2,16±0,02 ^a	0,0070±0,0001 ^{abc}	35,06±10,21 ^{ab}
		1289	2,26±0,14 ^{bc}	0,0070±0,0001 ^{abc}	52,90±0,03 ^b
		1290	2,21±0,01 ^{bc}	0,0090±0,0010 ^c	55,02±0,71 ^b
		1293	2,21±0,42 ^{bc}	0,0070±0,0010 ^{abc}	48,17±4,13 ^{ab}
		1298	2,26±0,03 ^{bc}	0,0070±0,0010 ^{abc}	47,94±0,001 ^{ab}
		1309	2,06±0,01 ^a	0,0080±0,0001 ^{bc}	32,55±0,11 ^{ab}
		1311	1,94±0,03 ^a	0,0070±0,0001 ^{abc}	43,79±2,22 ^{ab}
	Chicha	1314	2,07±0,02 ^a	0,0070±0,0001 ^{abc}	27,70±4,20 ^a
		1315	2,00±0,01 ^a	0,0070±0,0001 ^{abc}	28,26±2,73 ^a
		1316	1,98±0,01 ^a	0,0080±0,0010 ^{bc}	37,33±0,98 ^{ab}
		1317	2,19±0,05 ^a	0,0050±0,0001 ^a	22,80±0,44 ^a
		1320	1,98±0,01 ^a	0,0070±0,0001 ^{abc}	29,91±7,13 ^a
		1321	1,86±0,13 ^a	0,0090±0,0010 ^c	35,36±3,96 ^{ab}
		1322	1,95±0,02 ^a	0,0090±0,0001 ^c	37,97±0,71 ^{ab}
		1323	1,84±0,01 ^a	0,0070±0,0001 ^{abc}	47,99±5,45 ^{ab}
		1324	1,97±0,02 ^a	0,0070±0,0001 ^{abc}	38,27±2,54 ^{ab}
		1328	1,96±0,01 ^a	0,0070±0,0010 ^{abc}	29,42±0,81 ^a
1329	2,04±0,03 ^a	0,0070±0,0001 ^{abc}	38,76±1,66 ^{ab}		
1330	1,99±0,01 ^a	0,0070±0,0001 ^{abc}	29,43±3,18 ^a		
<i>S. cerevisiae</i>	Vino	1178	1,82±0,01 ^a	0,0090±0,0010 ^c	71,97±0,58 ^c

^a NPCC: North Patagonian Culture Collection, Neuquén, Argentina.

A: Producción máxima de CO₂, $\mu_{\text{máx}}$: Máxima velocidad de fermentación, λ : Tiempo necesario para el comienzo de la fermentación tumultuosa. R² mayor a 0,99 para todos los casos. Letras diferentes en los superíndices en una misma columna indican diferencias significativas (ANOVA y Test de Tukey, n=2).

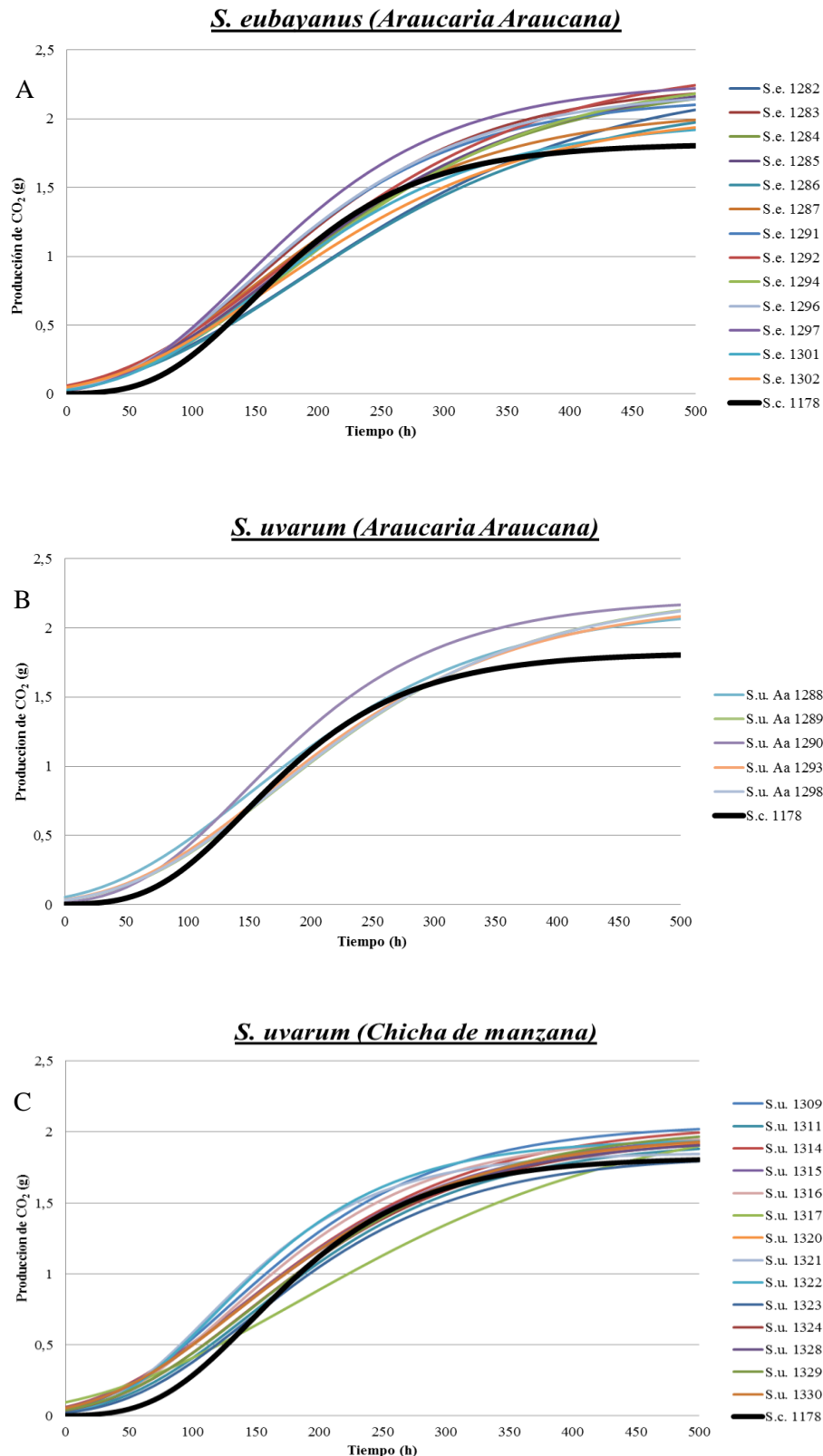


Figura 7: Cinéticas de fermentación modeladas de las cepas a 13°C (como referencia se utilizó *S. cerevisiae* NPCC 1178 en todas las gráficas). A: *S. eubayanus* (A. a.), B: *S. uvarum* (A. a.), C: *S. uvarum* (chicha).

En lo que se refiere a la producción de CO₂, que se refleja en el valor del parámetro A, los más elevados se evidenciaron para las cepas de *S. uvarum* y *S. eubayanus* de hábitats naturales (Figura 7A y B). Como dato llamativo se observa que el valor más bajo de $\mu_{\text{máx}}$ correspondió a la cepa *S. uvarum* NPCC 1317, que a su vez presentó también el valor más bajo del parámetro λ (Tabla 5).

Los parámetros cinéticos analizados son de gran importancia desde el punto de vista industrial. Un mayor tiempo para comenzar la fermentación tumultuosa (λ) y una menor velocidad de fermentación ($\mu_{\text{máx}}$) implican mayores costos económicos dado que ambos factores impactan finalmente en el tiempo total de fermentación. No obstante, en casos especiales resulta necesario modificar el proceso tecnológico a fin de alterar los parámetros cinéticos, como por ejemplo, bajando la temperatura se bajan las velocidades de fermentación y así se evita la pérdida de compuestos aromáticos por arrastre con el CO₂ desprendido durante el proceso (Henschke, 1997; Pretorius, 2000). Por lo expuesto, existe un compromiso entre el costo derivado del tiempo necesario para completar el proceso y los factores que determinan la calidad resultante del producto.

1.2. Análisis fisicoquímico

Resulta indispensable determinar las principales características fisicoquímicas de los productos fermentados para poder comparar los perfiles fermentativos de las diferentes cepas. Los parámetros fisicoquímicos obtenidos se muestran en la Tabla 6.

Aunque diversas publicaciones científicas resaltan la capacidad fructofílica de *S. uvarum*, la concentración de fructosa residual en las sidras elaboradas con esta especie, y también con su especie hermana *S. eubayanus*, no fueron diferentes de las obtenidas con *S. cerevisiae*. Como se mencionó anteriormente, todos los mostos alcanzaron la sequedad, evidenciando concentraciones de azúcares residuales (glucosa + fructosa) menores a 0,6 g/L. Quizás sería bueno a futuro evaluar la cinética de consumo de fructosa y glucosa durante la fermentación a fin de poner en evidencia esta posible fructofilia por parte de las cepas criotolerantes.

En base a la estequiometría de la fermentación alcohólica (Figura 8) y teniendo en cuenta que: i) la concentración de azúcar inicial presente en el mosto de manzana Royal Gala fue de 125,7 g/L (ver materiales y métodos, sección 5), ii) todas las cepas consumieron completamente el azúcar y iii) suponiendo que todo el azúcar se convierte en etanol y CO₂ (de acuerdo con la

estequiometría de la reacción, cosa que no es del todo cierta ya que parte se destina a la producción de metabolitos minoritarios), se esperaría obtener una sidra con una concentración final de etanol de 64,25 g/L y que la cantidad total de CO₂ liberado sea igual a 61,45 g/L. Estos valores estequiométricos esperados sirven como referencia para calcular la cantidad estimada de etanol a partir del valor de CO₂ producido por cada cepa (Tabla 6).

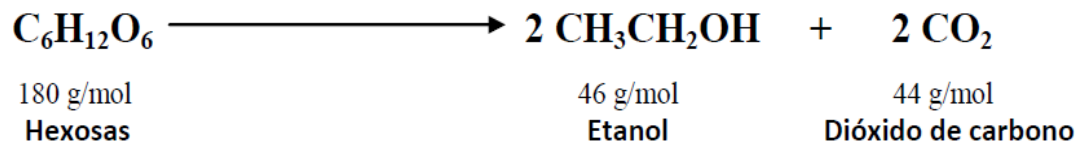


Figura 8: Estequiometría de la fermentación alcohólica. Se desprecia la formación de productos minoritarios tales como glicerol, ácidos orgánicos, ésteres, alcoholes superiores, entre otros.

Aunque no se encontraron diferencias significativas claras en la producción de etanol entre cepas de diversos orígenes y especies, se pudo observar una mayor producción de etanol (basados en los datos estequiométricos obtenidos) en las cepas de ambientes naturales. El valor más bajo ($7,01 \pm 0,07\%$ v/v) fue encontrado para *S. uvarum* NPCC 1323 (chicha) y el más elevado ($8,90 \pm 0,23\%$ v/v) para *S. eubayanus* NPCC 1292 (*Araucaria araucana*).

Diversos investigadores (Castellari *et al.*, 1994; Giudici *et al.*, 1995; Eglinton *et al.*, 2000; Masneuf-Pomarède *et al.*, 2010) han reportado que especies criotolerantes, tales como *Saccharomyces bayanus* y *S. uvarum*, se caracterizan por producir mayor cantidad de glicerol y menor cantidad de ácido acético y etanol que *S. cerevisiae*. Los resultados obtenidos coinciden parcialmente con estos reportes, dado que las cepas criotolerantes produjeron cantidades menores de ácido acético que *S. cerevisiae* (Tabla 6). Las cepas de *S. uvarum* presentaron valores de ácido acético entre $0,17 \pm 0,01$ g/L y $0,43 \pm 0,02$ g/L y las cepas de *S. eubayanus* presentaron valores entre $0,19 \pm 0,01$ g/L y $0,31 \pm 0,02$ g/L, valores muy por debajo del umbral de percepción de este compuesto volátil que corresponde a 0,7 g/L.

Tabla 6: Parámetros fisicoquímicos de las microfermentaciones en mosto de manzana Royal gala.

Especie	Origen	Cepa (n° NPCC) ^a	Parámetros fisicoquímicos						
			Etanol* (%v/v)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)	Glicerol (g/L)	Acidez volátil (g/L)	Acidez total (g/L)	pH
<i>S. eubayanus</i>	Araucaria araucana	1282	8,36±0,03 ^{cde}	<0,1	<0,5	2,97±0,01 ^{ab}	0,23±0,04 ^{abc}	5,13±0,09 ^{bc}	3,2±0,1 ^a
		1283	8,55±0,06 ^{cde}	<0,1	<0,5	2,93±0,04 ^{ab}	0,26±0,01 ^{abc}	5,22±0,04 ^{bc}	3,3±0,1 ^{ab}
		1284	8,61±0,15 ^{cde}	<0,1	<0,5	3,55±1,02 ^{bc}	0,30±0,01 ^{abcd}	5,25±0,01 ^{bc}	3,2±0,1 ^a
		1285	8,43±0,28 ^{cde}	<0,1	<0,5	4,58±0,14 ^{cd}	0,19±0,01 ^{ab}	5,22±0,04 ^{bc}	3,3±0,1 ^{ab}
		1286	8,01±0,19 ^{abc}	<0,1	<0,5	4,13±0,66 ^{cd}	0,26±0,01 ^{abc}	4,93±0,37 ^{ab}	3,3±0,1 ^{ab}
		1287	7,74±0,13 ^{abc}	<0,1	<0,5	4,77±0,77 ^d	0,25±0,01 ^{abc}	5,19±0,01 ^{bc}	3,2±0,2 ^a
		1291	8,23±0,01 ^{abc}	<0,1	<0,5	2,34±0,13 ^{ab}	0,29±0,01 ^{abc}	4,45±0,13 ^{ab}	3,3±0,1 ^{ab}
		1292	8,90±0,23 ^e	<0,1	<0,5	2,02±0,06 ^{ab}	0,29±0,01 ^{abc}	5,26±0,09 ^{ab}	3,2±0,1 ^a
		1294	8,73±0,01 ^{de}	<0,1	<0,5	3,32±0,23 ^{abc}	0,29±0,01 ^{abc}	4,48±0,09 ^{ab}	3,2±0,1 ^a
		1296	8,42±0,27 ^{cde}	<0,1	<0,5	4,65±0,47 ^d	0,25±0,02 ^{abc}	4,86±0,18 ^{ab}	3,2±0,1 ^a
		1297	8,53±0,09 ^{cde}	<0,1	<0,5	3,14±0,21 ^{abc}	0,31±0,01 ^{abc}	4,61±0,09 ^{ab}	3,2±0,1 ^a
		1301	7,52±0,32 ^{abc}	<0,1	<0,5	3,23±0,37 ^{abc}	0,22±0,02 ^{ab}	4,93±0,18 ^{ab}	3,2±0,1 ^a
		1302	7,83±0,03 ^{abc}	<0,1	<0,5	1,73±0,35 ^a	0,28±0,01 ^{abc}	4,38±0,23 ^{ab}	3,3±0,1 ^{ab}
<i>S. uvarum</i>	Araucaria araucana	1288	8,11±0,04 ^{abc}	<0,1	<0,5	3,43±0,67 ^{abc}	0,31±0,01 ^{abc}	5,00±0,09 ^{ab}	3,3±0,1 ^{ab}
		1289	8,58±0,46 ^{cde}	<0,1	<0,5	2,93±0,25 ^{ab}	0,29±0,01 ^{abc}	5,21±0,02 ^{bc}	3,2±0,1 ^a
		1290	8,43±0,05 ^{cde}	<0,1	<0,5	3,78±0,38 ^{bc}	0,29±0,01 ^{abc}	4,25±0,14 ^a	3,3±0,1 ^{ab}
		1293	8,18±1,47 ^{abc}	<0,1	<0,5	1,98±0,24 ^a	0,26±0,01 ^{ab}	4,22±0,09 ^a	3,3±0,1 ^{ab}
		1298	8,28±0,25 ^{bcd}	<0,1	<0,5	2,99±0,16 ^{ab}	0,28±0,01 ^{ab}	4,09±0,09 ^a	3,3±0,1 ^{ab}
	Chicha	1309	8,10±0,06 ^{abc}	<0,1	<0,5	3,15±0,07 ^{abc}	0,26±0,01 ^{ab}	4,89±0,03 ^{ab}	3,5±0,1 ^{bc}
		1311	7,45±0,12 ^{ab}	<0,1	<0,5	4,37±0,38 ^{cd}	0,26±0,01 ^{ab}	6,42±0,21 ^c	3,3±0,1 ^{ab}
		1314	8,04±0,15 ^{abc}	<0,1	<0,5	3,53±0,06 ^{bc}	0,26±0,01 ^{ab}	6,40±0,03 ^c	3,3±0,1 ^{ab}
		1315	7,73±0,01 ^{abc}	<0,1	<0,5	4,48±0,22 ^{cd}	0,31±0,15 ^{abc}	5,63±0,05 ^{bc}	3,4±0,2 ^b
		1316	7,79±0,06 ^{abc}	<0,1	<0,5	4,53±0,37 ^{cd}	0,30±0,01 ^{abc}	5,08±0,08 ^{ab}	3,5±0,2 ^{bc}
		1317	8,00±0,18 ^{abc}	<0,1	<0,5	4,15±0,15 ^{cd}	0,37±0,01 ^{cd}	6,41±0,08 ^c	3,2±0,1 ^a
		1320	7,66±0,01 ^{abc}	<0,1	<0,5	3,90±0,14 ^{bc}	0,43±0,02 ^{de}	5,75±0,13 ^{bc}	3,4±0,1 ^{ab}
		1321	7,51±0,14 ^{abc}	<0,1	<0,5	4,01±0,21 ^{bc}	0,32±0,01 ^{bc}	5,00±0,07 ^{ab}	3,5±0,1 ^{bc}
Vino	1322	7,56±0,03 ^{abc}	<0,1	<0,5	2,87±0,13 ^{ab}	0,36±0,09 ^{cd}	4,89±0,03 ^{ab}	3,5±0,1 ^{bc}	
	1323	7,01±0,07 ^a	<0,1	<0,5	3,79±0,21 ^{bc}	0,17±0,01 ^a	5,49±0,05 ^{bc}	3,4±0,2 ^b	
	1324	7,61±0,13 ^{abc}	<0,1	<0,5	3,32±0,13 ^{abc}	0,23±0,01 ^{ab}	5,38±0,11 ^{bc}	3,4±0,1 ^b	
	1328	7,59±0,01 ^{abc}	<0,1	<0,5	3,15±0,21 ^{abc}	0,23±0,01 ^{ab}	5,58±0,02 ^{bc}	3,4±0,1 ^b	
	1329	7,86±0,11 ^{abc}	<0,1	<0,5	4,57±0,16 ^{cd}	0,29±0,01 ^{abc}	5,49±0,05 ^{bc}	3,4±0,1 ^b	
<i>S. cerevisiae</i>	Vino	1178	7,04±0,08 ^{ab}	<0,1	<0,5	3,54±0,16 ^{bc}	0,51±0,01 ^e	4,99±0,18 ^{ab}	3,4±0,1 ^{ab}

^a NPCC: North Patagonian Culture Collection, Neuquén, Argentina.

*Valor estequiométrico calculado en base al dato de producción de CO₂.

Letras diferentes en los superíndices en una misma columna indican diferencias significativas (ANOVA y Test de Tukey, n=2).

En cuanto al pH, independientemente de la especie y origen de las cepas, los valores estuvieron acotados entre $3,2 \pm 0,1$ y $3,5 \pm 0,2$ y no se observaron diferencias significativas entre los mismos.

Debido a la gran cantidad de datos obtenidos en esta etapa, se decidió utilizar un método de análisis multivariado a partir de las variables cinéticas y fisicoquímicas anteriormente descriptas. Se utilizó el Análisis de Componentes Principales (ACP), que es una herramienta estadística útil para identificar patrones de similitud o de diferencia entre cepas cuando están involucradas muchas variables. Se graficaron los dos primeros componentes principales, que en conjunto describieron el 62% de la variabilidad total de los datos (Figura 9). En el análisis, la Componente Principal 1 (CP1) explicó el 34% de la variabilidad total y describió principalmente la variable A (producción máxima de CO_2), mientras que la CP2 explicó el 28% de la variabilidad total y describió principalmente la variable $\mu_{\text{máx}}$. (máxima velocidad de fermentación) (Figura 9A).

El análisis por grupos (o *clusters*) permitió evidenciar un grupo correspondiente a las sidras obtenidas con cepas aisladas de hábitats naturales (*A. araucana*), incluyendo tanto *S. uvarum* como *S. eubayanus*. Este grupo se separó de los que reunieron a las sidras obtenidas con cepas de ambientes artificiales (chicha de manzana para *S. uvarum* y vino para *S. cerevisiae*). La proximidad, en términos de características fisiológicas, de éstas últimas cepas, podría indicar cierto grado común de domesticación y consecuente adaptación a las fermentaciones de la especie *S. uvarum* de origen fermentativo.

Finalmente, el análisis mostró un total de cuatro grupos de sidras bien definidas. El grupo I quedó compuesto por las sidras fermentadas con cepas de *S. eubayanus* y *S. uvarum* de *A. araucana*; este grupo se caracterizó principalmente por fermentaciones con los mayores valores de λ (Figura 9A y C). El grupo II incluyó todas las sidras elaboradas con las cepas de *S. uvarum* de chicha de manzana (excepto la cepa NPCC 1317 incluida en el grupo III) y se caracterizó por las mayores concentraciones de glicerol y los mayores niveles de acidez total. El grupo III incluyó únicamente la sidra elaborada con la cepa NPCC 1317 *S. uvarum* de chicha, y evidenció una alta acidez total. Finalmente, el grupo IV sólo se conformó por la cepa NPCC 1178 *S. cerevisiae*, caracterizada por la velocidad de fermentación más alta ($\mu_{\text{máx}}$) (Figura 9A y C). Estos grupos fueron confirmados por el análisis de UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) (Figura 9B).

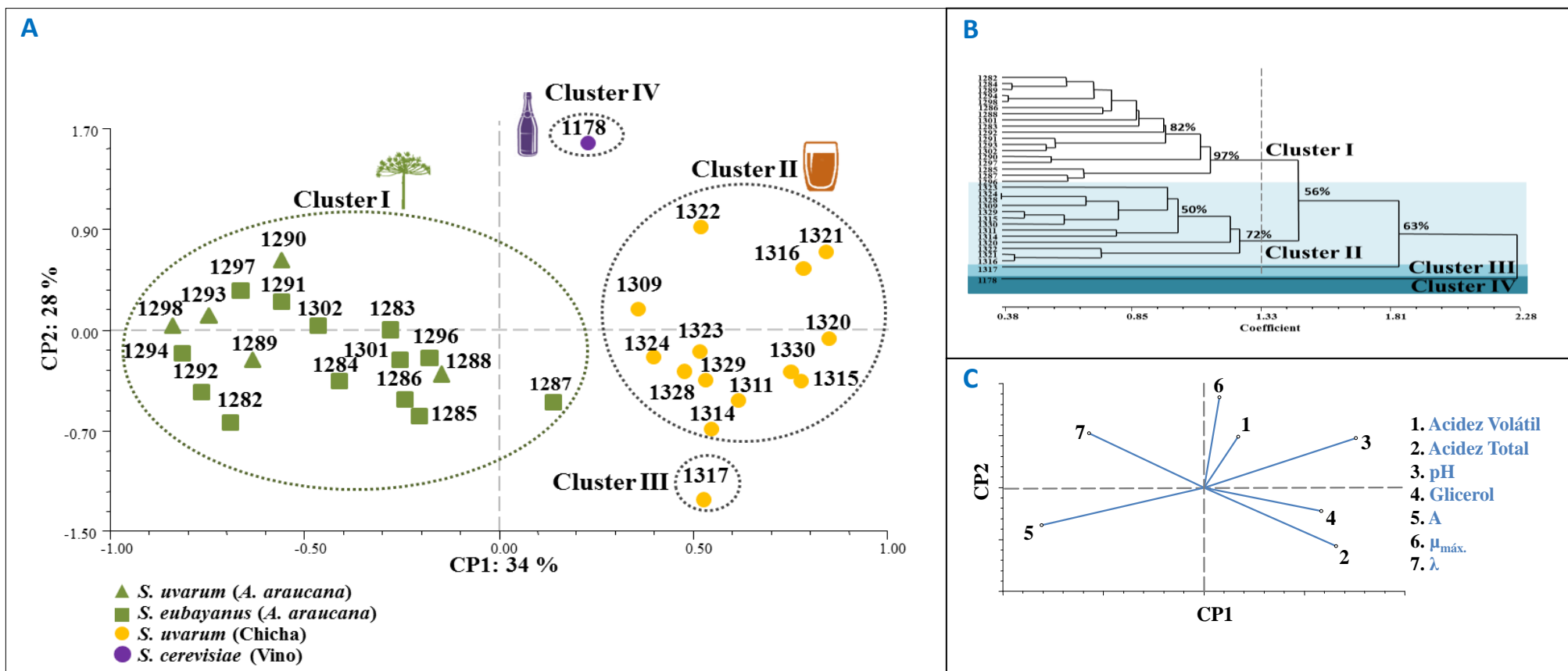


Figura 9: A: Análisis de componentes principales (ACP) y de *clusters*, B: Análisis UPGMA, ambos obtenidos de los parámetros cinéticos y fisicoquímicos de las microfermentaciones a 13°C. Los valores en los ejes de la figura A indican los porcentajes de la variabilidad total que explica cada Componente Principal (CP). C: Proyección de los autovectores en el plano CP1- CP2; la longitud de cada autovector es directamente proporcional al porcentaje de variabilidad del parámetro involucrado que es explicada por los primeros dos componentes principales.

2. EVALUACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS Y ANTAGONISTA DE LAS LEVADURAS

Otro aspecto fisiológico relevante desde el punto de vista tecnológico es la capacidad de las levaduras de presentar determinadas actividades enzimáticas relacionadas con la mejora del aroma o la estabilización de las sidras. Entre estas actividades se pueden mencionar las actividades proteasa, pectinasa, β -glucosidasa (β Gl) y β -xilosidasa (β Xy) (Pando Bedriñana *et al.*, 2012).

En particular, el uso de pectinasas es una práctica común en la industria de vino y sidra. Estas enzimas mejoran la licuefacción, el rendimiento de los zumos, la clarificación, la filtrabilidad y la liberación de compuestos de color y sabor de las pieles de los frutos (Fleet, 2008; Martín y Morata de Ambrosini, 2014; Ugliano, 2009). Las propiedades de sabor de estas bebidas pueden potenciarse también mediante la actividad de glucosidasas que incluyen β Gl y β Xy, que hidrolizan precursores glicosílicos no volátiles de los frutos liberando los compuestos volátiles (Günata *et al.*, 1988; Paillard, 1990). Por último, la turbidez causada por las proteínas se considera una causa de inestabilidad en las bebidas, particularmente en vinos blancos, pero también presente en los jugos de uva y manzana (Hsu *et al.*, 1989). La actividad proteasa hidroliza las proteínas en moléculas más pequeñas y solubles, favoreciendo la clarificación y estabilización de las bebidas, mientras ayuda a evitar fermentaciones incompletas producto de una deficiencia de nitrógeno asimilable en el mosto.

Se sabe que *S. cerevisiae* no es una especie que se caracterice por su elevada capacidad de producir enzimas extracelulares; sin embargo, sólo unos pocos reportes bibliográficos para *S. uvarum* y ninguno en el caso de *S. eubayanus* han evaluado estas actividades en las especies criotolerantes aquí estudiadas.

Por otro lado, es interesante resaltar la importancia de utilizar al menos dos tipos de sustratos para los estudios de *screening* de β Gl con el fin de minimizar el riesgo de obtener resultados falsos negativos causados por la selectividad específica del sustrato de la enzima según lo informado por Hernández *et al.*(2003).

El *screening* enzimático cualitativo evidenció, en general, las cuatro actividades ensayadas en estas especies criotolerantes con la única excepción de la ausencia de actividad proteasa en *S. eubayanus* (Tabla 7). Si bien la actividad proteasa no se detectó en las cepas de *S. eubayanus*,

se evidenció en todas las cepas de *S. uvarum* de *A. araucana* y en 12 de las 14 cepas de *S. uvarum* de chicha. Por el contrario, la actividad pectínasa se encontró en la mayoría de las cepas de ambas especies *S. eubayanus* y *S. uvarum* (Tabla 7).

Tabla7: Actividades enzimáticas y antagonista de cepas de *S. eubayanus* y *S. uvarum*.

Especie	Origen	Cepa (n° NPCC) ^a	Actividades enzimáticas (sustrato) ^b					Actividad antagonista ^c	
			Proteasa (leche desnatada)	Pectinasa (pectina cítrica)	β GI (pNPG)	β GI (esculina)	β Xy (pNPX)	Cg	Sc
<i>S. eubayanus</i>	<i>A. araucana</i>	1282	-	+	+	+	+	-	-
		1283,1284,1286,1287,1296	-	+	+	-	+	-	-
		1285	-	+	+	-	+	-	+
		1291,1292,1294	-	+	+	+	+	-	+
		1297,1302	-	+	+	-	+	+	+
		1301	-	-	+	+	+	-	-
<i>S. uvarum</i>	<i>A. araucana</i>	1289	+	+	+	-	+	-	-
		1288,1290	+	+	+	+	+	-	-
		1293,1298	+	-	+	-	+	-	-
	Chicha	1309	-	+	+	+	+	-	+
		1316	+	+	+	-	+	-	-
		1320,1321,1330	+	+	+	+	+	-	-
		1317,1328,1329	+	-	+	+	+	-	-
		1311,1314,1324	+	+	+	+	+	-	+
		1323	+	+	+	-	+	-	+
		1315	+	+	+	+	-	-	-
		1322	-	+	+	+	-	-	-

^a: NPCC: North Patagonian Culture Collection, Neuquén, Argentina.

^b: **pNPG**: *p*-nitrofenil-glucosídico, **pNPX**: *p*-nitrofenil-xilosídico; **β GI**: β -glucosidasa, **β Xy**: β -xilosidasa.

^c: **Cg**: *Candida glabrata*, cepa de control sensible al factor killer; **Sc**: *Saccharomyces cerevisiae* cepa de control sensible al factor killer

Independientemente de la especie y el origen, todas las cepas exhibieron actividad β GI en el sustrato sintético *p*-nitrofenil-glucopiranosido (pNPG); dicha actividad no se detectó en el mismo número de cepas cuando se utilizó esculina como sustrato (Tabla 7). Con excepción de dos cepas de *S. uvarum* de chicha (NPCC 1315 y 1322), todas las cepas fueron capaces de hidrolizar el sustrato sintético pNPX evidenciando actividad β -Xilosidasa (Tabla 7).

Finalmente, la actividad antagonista de una levadura que se utilizará como cultivo iniciador también se considera un atributo tecnológico relevante (Rainieri y Pretorius, 2000). Las cepas que poseen esta característica serán capaces de inhibir el crecimiento de levaduras de *S. cerevisiae* nativas, presentes en las fermentaciones espontáneas, mejorando su capacidad de implantación. En las cepas de levadura evaluadas, sólo algunas cepas de *S. eubayanus* y *S. uvarum* fueron capaces de inhibir el crecimiento de la cepa sensible de referencia de *S. cerevisiae* (seis cepas de *S. eubayanus* y cinco de *S. uvarum*). Sin embargo, dos de ellas, *S.*

eubayanus NPCC 1297 y 1302, también fueron activas contra la cepa sensible de *Candida glabrata* (Tabla 7). Es importante resaltar que en este trabajo, se observó por primera vez en *S. eubayanus*, la actividad antagonista particularmente eficaz contra *S. cerevisiae*, lo que constituye una característica relevante adicional de esta especie para considerar en la elaboración de sidra dado que como se mencionó en la introducción general, la mayor parte de las levaduras presentes en fermentaciones espontáneas corresponden a este especie.

En base a los resultados anteriores, se seleccionó una cepa de cada especie y origen, con la mejor combinación de características fisiológicas, para llevar a cabo un nuevo conjunto de fermentaciones con el propósito de evaluar tanto su capacidad para conducir fermentaciones exitosas utilizando diferentes mostos de manzana como su capacidad para producir compuestos aromáticos volátiles deseables. Las cepas *S. eubayanus* NPCC 1292 de *A. araucana* y *S. uvarum* NPCC 1314 de chicha se seleccionaron principalmente debido a su combinación de actividades enzimáticas y antagonistas, ya que presentaban características enológicas similares. La cepa *S. uvarum* NPCC 1290 aislada de *A. araucana* igualmente fue seleccionada por su perfil enzimático, así como también por sus notables características cinéticas y fisicoquímicas en comparación con las demás cepas del mismo origen (velocidad de fermentación rápida y mayor producción de glicerol).

3. EVALUACIÓN DE LAS LEVADURAS SELECCIONADAS A MAYOR ESCALA CON ÉNFASIS EN LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS

Como se expuso previamente, la cepa de levadura que lleva a cabo la fermentación no influye únicamente en las características cinéticas del proceso y en los parámetros fisicoquímicos de la sidra obtenida, sino que también afecta significativamente el aroma y el sabor de la misma mediante la producción de compuestos volátiles resultantes de su metabolismo secundario. En esta etapa se analizó la influencia de las cepas seleccionadas principalmente sobre la composición de la fracción de compuestos volátiles de las sidras con ellas obtenidas.

3.1. Cinéticas de fermentación

Se realizaron fermentaciones en 1L a 13°C usando dos mostos de manzana diferentes: Granny Smith (GS) y Royal Gala (RG). Todas las fermentaciones se inocularon individualmente con

las tres cepas de levadura previamente seleccionadas, en ensayos por duplicado y la evolución de las fermentaciones se controló diariamente mediante la disminución de °Brix a lo largo de la experiencia. La cepa *S. cerevisiae* NPCC 1178 aislada de una fermentación de vino regional, se utilizó como referencia en estos ensayos.

De acuerdo con los datos obtenidos de las mediciones de °Brix durante el proceso, todas las cepas fueron capaces de completar el proceso fermentativo en un tiempo estimado de 15 días. En este caso, el ajuste con el modelo de Gompertz modificado para dichos datos no fue apropiado, ya que las levaduras metabolizaron a mayor velocidad el azúcar. Así, las curvas de disminución de °Brix se ajustaron mejor a un modelo de decaimiento exponencial, obteniéndose valores de R^2 entre 99,2 - 99,8%. Los parámetros correspondientes a este ajuste son: D, valor mínimo de °Brix, S, diferencia entre los °Brix finales e iniciales y K, velocidad de consumo del sustrato (Tabla 8).

Como cada experiencia se realizó por duplicado, se calculó el valor promedio y su respectivo desvío estándar para cada uno de los parámetros cinéticos (Tabla 8) y con ellos se graficaron las curvas modeladas del comportamiento cinético medio para cada cepa (Figura 10).

Tabla 8: Parámetros cinéticos obtenidos en las fermentaciones de 1L mediante la función de decaimiento exponencial (Arroyo-López *et al.* 2008) en ambos mostos de manzana.

Parámetros cinéticos	Mosto de manzana Royal Gala			
	<i>S. cerevisiae</i> NPCC 1178	<i>S. eubayanus</i> NPCC 1292	<i>S. uvarum</i> NPCC 1290	<i>S. uvarum</i> NPCC 1314
D (°Brix)	3,33±0,03 ^a	3,93±0,01 ^c	3,68±0,04 ^b	3,60±0,01 ^b
S	9,42±0,04 ^c	8,81±0,04 ^a	9,30±0,05 ^b	9,24±0,03 ^b
K (°Brix/h)	0,0050±0,0005 ^a	0,0070±0,0003 ^b	0,0080±0,0002 ^c	0,0080±0,0008 ^c
	Mosto de manzana Granny Smith			
D (°Brix)	4,02±0,05	3,90±0,22	3,93±0,03	3,93±0,04
S	8,65±0,06	8,70±0,06	8,90±0,05	8,68±0,12
K (°Brix/h)	0,0080±0,0001 ^b	0,0060±0,0005 ^a	0,0080±0,0003 ^b	0,0080±0,0006 ^b

D es el valor cuando t tiende a ∞ (valor mínimo de °Brix), S es el valor estimado de cambio (diferencia entre °Brix finales e iniciales), y K es la constante cinética (velocidad de consumo de sustrato). Los ajustes para todos los casos tratados presentaron R^2 entre 99.2 y 99.8%. Letras diferentes en los superíndices en una misma fila indican diferencias significativas para cada mosto (ANOVA y Test de Tukey, n=2).

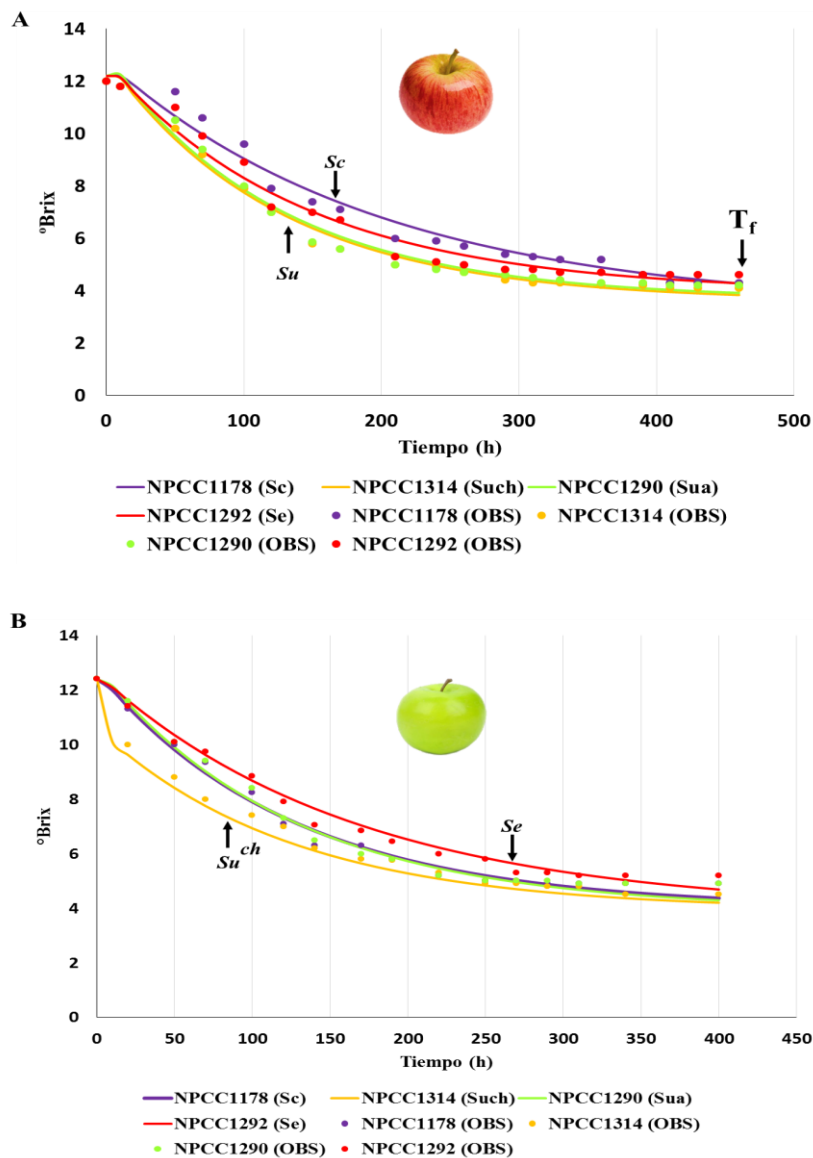


Figura 10: Cinéticas de fermentaciones en IL modeladas con la función de decaimiento exponencial. **A:** Mosto Royal Gala. **B:** Mosto Granny Smith. (Los valores experimentales se muestran con puntos y los modelados con línea continua)

La diferencia más importante en los parámetros cinéticos entre las cepas fue la velocidad de consumo del sustrato (K). En el mosto de RG, ambas cepas de *S. uvarum* (NPCC 1290 de *A. araucana* y NPCC 1314 de chicha de manzana) mostraron un valor K significativamente mayor que el resto, mientras que la cepa *S. cerevisiae* NPCC 1178 mostró el valor más bajo (Tabla 8). Por el contrario, en el mosto de GS, *S. eubayanus* fue la cepa con el valor de K significativamente más bajo (Tabla 8). Con respecto a los dos parámetros restantes del modelo, no se observaron diferencias significativas de los mismos en ninguno de los mostos.

3.2. Composición química de las sidras

Las levaduras contribuyen al perfil aromático de las bebidas fermentadas, sintetizando *de novo* un gran número de metabolitos volátiles y transformando compuestos aromáticamente neutros presentes en el mosto en otros aromáticamente activos. Por esta razón, el uso de levaduras seleccionadas es una herramienta fundamental para obtener sidras con perfiles aromáticos específicos y diferenciales (Swiegers *et. al.*, 2005).

El análisis fisicoquímico y de compuestos aromáticos permitió caracterizar las sidras obtenidas con las levaduras estudiadas en función de las diferencias metabólicas entre las mismas (Tabla 9). Además, al no existir diferencias entre réplicas biológicas se puede atribuir la variabilidad observada a diferencias metabólicas entre las cepas. Para examinar los principales grupos de compuestos se realizaron gráficos de barra que permitieron comparar más claramente el desempeño de las cepas por mosto (Figura 11).

Nuevamente, la concentración de fructosa residual en las sidras elaboradas con *S. uvarum* y también con su especie hermana *S. eubayanus*, no fueron muy diferentes de las obtenidas con *S. cerevisiae*. De hecho, al analizar la composición química general de las sidras fermentadas con las cepas de levadura seleccionadas, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de la mayoría de los parámetros, incluidos acetaldehído, etanol y azúcares residuales (glucosa y fructosa) (Tabla 9). Las excepciones fueron los elevados niveles de fructosa residual observados sólo en mosto GS fermentado con *S. eubayanus* (Figura 11) y los altos valores de glicerol obtenidos con *S. uvarum* (en ambos mostos de manzana y con las dos cepas evaluadas) y *S. eubayanus* sólo en mosto RG (Figura 11).

De acuerdo con reportes bibliográficos en vino, *S. uvarum* produce concentraciones más bajas de etanol y más altas de glicerol que *S. cerevisiae* (Castellari *et al.*, 1994; Magyar y Tóth, 2011; Sipiczki, 2002). No se ha reportado un comportamiento similar en *S. eubayanus*, pero teniendo en cuenta su relación filogenética con *S. uvarum*, junto con los estudios sobre *S. bayanus* (híbrido entre *S. uvarum* y *S. eubayanus*) y *S. pastorianus* (híbrido entre *S. eubayanus* y *S. cerevisiae*), es esperable que se encuentren características metabólicas similares entre *S. uvarum* y *S. eubayanus*. Como se mencionó, si bien no se encontraron diferencias significativas en la concentración de etanol en las microfermentaciones; en las fermentaciones en mosto GS de 1L sí se observó una menor producción de este compuesto para las tres cepas no-*S. cerevisiae*. El etanol es un componente importante del sabor y un

producto de la vía glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas cuya función principal es la producción de energía. Esta vía también da lugar al ácido pirúvico, un precursor del ácido acético y una serie de diferentes moléculas que están relacionadas con la complejidad aromática de las bebidas fermentadas.

El glicerol es también un producto derivado de la vía glicolítica y se forma principalmente en la fase temprana de fermentación como respuesta al estrés osmótico (Nevoigt y Stahl, 1997) y para mantener el balance redox en la célula durante el proceso fermentativo (Albers *et al.*, 1998, Valadi *et al.*, 2004). También se ha asociado con una adaptación de la levadura al crecimiento a baja temperatura. En las bebidas fermentadas, este metabolito contribuye positivamente a la calidad, proporcionando un ligero dulzor, suavidad, integridad y reduciendo la astringencia del vino (Ishikawa y Noble, 1995, y Swiegers *et al.*, 2005). Se ha señalado que la producción de altos niveles de glicerol es una característica típica de *S. uvarum* (Antonelli *et al.*, 1999, Bertolini *et al.*, 1996, Castellari *et al.*, 1994, Gamero *et al.*, 2013, Giudici *et al.*, 1995, López-Malo *et al.*, 2013, Rainieri *et al.*, 1999). Sin embargo, algunos autores han encontrado que esta propiedad es muy variable entre las cepas de *S. uvarum* (Magyar y Tóth, 2011). Además, utilizando un medio sintético, Masneuf-Pomarède *et al.* (2010) encontró alta variación intraespecífica de la producción de glicerol dentro de *S. uvarum*, sin diferencias significativas interespecíficas comparadas con *S. cerevisiae*. Los resultados obtenidos en esta tesis confirman parcialmente estos informes; evidenciando una alta variación en la producción de este compuesto entre las cepas, independientemente de su origen. Un comportamiento similar se observó aquí por primera vez entre las cepas de *S. eubayanus*, algunas de ellas produciendo las concentraciones más altas y otras produciendo las concentraciones más bajas de glicerol en las sidras analizadas.

En cuanto al equilibrio entre el etanol y el glicerol en los productos fermentados, se encontró que incluso con diferencias en la producción de etanol entre cepas, las cepas preseleccionadas de *S. eubayanus* y *S. uvarum* produjeron mayores cantidades de glicerol que *S. cerevisiae*, haciendo que estas cepas sean enológicamente interesantes. Una posible explicación para una alta producción de glicerol sin disminución de la generación de etanol es la síntesis de concentraciones bajas de ácido acético (como se puede evidenciar experimentalmente en los bajos niveles de acidez volátil en las fermentaciones de las no- *S. cerevisiae* en ambos volúmenes de 50 mL y 1L) con el fin de mantener el balance de masa en la célula.

Tabla 9: Composición química de las sidras (1L) fermentadas utilizando diferentes cepas de levaduras y diferentes mostos de manzana.

COMPUESTO	Mosto de manzana Royal Gala				Mosto de manzana Granny Smith			
	<i>S. cerevisiae</i> NPCC 1178	<i>S. eubayanus</i> NPCC 1292	<i>S. uvarum</i> NPCC 1290	<i>S. uvarum</i> NPCC 1314	<i>S. cerevisiae</i> NPCC 1178	<i>S. eubayanus</i> NPCC 1292	<i>S. uvarum</i> NPCC 1290	<i>S. uvarum</i> NPCC 1314
<i>Compuestos generales</i>								
Glucosa (g/L)	0,02±0,01	0,23±0,02	0,08±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01	0,45±0,07	0,16±0,08	0,02±0,01
Fructosa (g/L)	1,00±0,04	0,85±0,01	0,11±0,01	0,05±0,00	3,5±0,34 ^a	7,01±0,97 ^b	3,2±0,98 ^a	2,47±0,52 ^a
Etanol (% v/v)	7,83±0,07	7,66±0,17	7,91±0,03	7,98±0,01	7,44±0,01 ^b	6,62±0,30 ^{ab}	7,24±0,01 ^{ab}	6,32±0,44 ^a
Glicerol (g/L)	3,73±0,21 ^a	4,37±0,39 ^{ab}	4,76±0,05 ^c	4,15±0,45 ^{bc}	3,48±0,28	3,55±0,33	4,17±0,26	4,29±0,39
Acetaldehído (g/L)	17,15±2,05	9,85±0,77	12,1±6,08	12,05±0,35	16,30±2,26	15,15±4,45	12,50±0,71	8,80±0,57
SO ₂ Libre (g/L)	35,0±4,2	45,0±0,1	35,0±4,2	43,0±7,1	11,5±2,1	13,0±0,1	13,0±0,1	13,0±0,1
SO ₂ Total (g/L)	73,5±4,9 ^a	101,5±2,1 ^b	80,0±4,2 ^a	80,0±4,2 ^a	38,0±0,1	33,5±2,1	30,5±2,1	32,0±0,1
pH	3,46±0,01	3,33±0,01	3,38±0,05	3,44±0,06	3,29±0,01	3,14±0,03	3,31±0,09	3,21±0,01
<i>Ácidos orgánicos</i>								
Ácido acético (g/L)	0,20±0,01	0,10±0,01	0,10±0,01	0,20±0,02	0,10±0,01	0,10±0,02	0,10±0,01	0,15±0,07
Ácido láctico (g/L)	0,10±0,01	0,10±0,01	0,30±0,01	0,20±0,01	ND	ND	ND	ND
Ácido málico (g/L)	6,75±0,07	6,50±0,01	6,95±0,21	6,85±0,07	7,60±0,42 ^a	9,50±0,14 ^b	9,25±0,07 ^b	8,85±0,35 ^b
Ácido shikímico	9,05±0,21 ^{ab}	5,70±0,42 ^a	13,05±0,07 ^b	13,30±2,40 ^b	3,00±0,01 ^a	3,00±0,01 ^a	4,60±0,57 ^b	6,35±0,21 ^c
Total Ácidos orgánicos (g/L)	7,06±0,09	6,71±0,11	7,36±0,23	7,26±0,10	7,70±0,42 ^a	9,60±0,16 ^b	9,35±0,08 ^{ab}	9,00±0,42 ^{ab}
<i>Alcoholes superiores</i>								
1- Propanol	12,28±0,58	10,97±0,16	14,71±1,10	15,15±1,86	10,63±1,08	8,68±0,45	10,04±0,13	6,72±4,16
1- Butanol	2,17±0,23	2,14±0,04	2,32±0,13	2,30±0,04	1,52±0,68	1,24±0,13	1,22±0,07	1,12±0,06
1- Hexanol	1,35±0,07	1,26±0,01	1,33±0,16	1,39±0,08	0,95±0,09	1,39±0,47	0,97±0,07	1,28±0,40
2-Feniletanol	3,09±0,31 ^a	9,31±0,52 ^b	10,89±1,83 ^b	7,98±2,28 ^{ab}	4,08±0,11 ^a	12,77±0,27 ^b	15,92±0,86 ^b	11,29±0,26 ^b
Alcohol bencílico	0,17±0,01 ^b	0,07±0,01 ^a	0,13±0,01 ^{ab}	0,11±0,03 ^{ab}	0,03±0,006 ^{ab}	0,02±0,01 ^a	0,02±0,003 ^{ab}	0,03±0,0001 ^b
Alcohol isoamílico	91,2±8,63 ^a	133,70±4,24 ^{ab}	165,35±17,47 ^b	119,05±15,91 ^{ab}	108,05±5,30 ^a	165,85±7,28 ^b	163,50±9,05 ^b	165,30±14,28 ^b
Alcohol isobutilico	24,70±1,13 ^a	20,3±1,41 ^a	30,95±1,34 ^b	23,75±1,63 ^a	16,00±0,01	19,80±1,84	18,3±0,14	22,45±6,86
Alcoholes superiores totales	134,96±10,94 ^a	177,75±5,33 ^b	225,67±19,25 ^b	169,71±18,05 ^{ab}	141,25±3,33 ^a	209,75±8,74 ^b	209,96±10,33 ^b	208,17±17,05 ^b

(Continúa en la próxima página)

Tabla 9: (Continuación)

<i>Ésteres</i>									
Acetato de etilo	6,37±1,51 ^a	6,00±0,11 ^a	7,09±0,71 ^a	14,12±1,63 ^b	7,49±0,36	7,32±1,02	8,19±0,10	29,63±10,93	
Acetato de 2-feniletilo	0,041±0,001	0,094±0,005	0,084±0,024	0,226±0,095	0,013±0,003 ^a	0,11±0,01 ^a	0,21±0,03 ^{ab}	0,41±0,12 ^b	
Acetato de bencilo (µg/L)	1,40±0,01 ^{ab}	0,74±0,03 ^a	0,86±0,07 ^a	2,0±0,2 ^b	2,0±0,9	0,60±0,07	0,40±0,03	0,80±0,07	
Acetato de hexilo (µg/L)	13,5±6,36	7,5±0,7	4,5±0,7	22,0±6,0	4,0±1,0	3,0±0,7	10,0±1,0	4,0±0,9	
Acetato de isoamilo	0,095±0,007 ^b	0,025±0,001 ^a	0,025±0,001 ^a	0,11±0,014 ^b	0,060±0,001	0,05±0,007	0,05±0,01	0,06±0,03	
Acetato de Isobutilo (µg/L)	5,4±0,4 ^a	5,13±0,07 ^a	5,0±0,3 ^a	7,0±0,5 ^b	4,0±0,2	5,0±0,1	5,0±0,3	7,0±2,0	
Butirato de etilo	0,041±0,004	0,046±0,002	0,048±0,001	0,045±0,005	0,028±0,005 ^a	0,036±0,002 ^b	0,042±0,002 ^b	0,039±0,008 ^b	
Decanoato de etilo (µg/L)	13,5±3,1 ^{cd}	2,25±0,01 ^a	7,0±1,0 ^{ab}	21,0±0,3 ^d	13,0±0,8 ^b	3,0±0,7 ^a	15,0±0,8 ^b	10,0±0,4 ^{ab}	
Hexanoato de etilo	0,047±0,006 ^{ab}	0,032±0,001 ^a	0,045±0,003 ^{ab}	0,056±0,004 ^b	0,042±0,003	0,019±0,001	0,040±0,012	0,039±0,001	
Lactato de etilo	1,41±0,08 ^a	1,78±0,08 ^{ab}	3,32±0,45 ^b	2,41±0,78 ^{ab}	1,11±0,28	1,72±0,65	1,49±0,03	1,89±0,02	
Octanoato de etilo (µg/L)	48,0±24,0	14,0±0,1	30,0±12,0	73,0±6,0	25,0±3,0 ^c	2,0±0,2 ^a	15,0±0,6 ^b	12,0±2,0 ^b	
Succinato de dietilo	0,015±0,003	0,020±0,003	0,036±0,011	0,044±0,009	0,018±0,004	0,031±0,001	0,047±0,007	0,021±0,024	
Ésteres totales	8,11±1,54^a	8,03±0,02^a	10,71±1,09^a	17,13±0,74^b	8,82±0,07^a	9,30±1,65^a	10,11±0,09^a	32,12±11,02^b	
<i>Terpenos (µg/L)</i>									
α- Terpineol	0,72±0,04	0,55±0,05	0,70±0,09	0,70±0,10	0,70±0,04	0,60±0,10	3,00±2,00	0,60±0,04	
Limoneno	0,035±0,003	0,018±0,002	0,040±0,009	ND	0,040±0,002	0,188±0,020	ND	0,018±0,002	
Linalool	10,0±1,0	7,0±1,0	8,0±1,0	10,0±1,0	6,0±0,7	4,0±3,0	8,0±1,0	4,0±3,0	
Nerol	ND	ND	ND	ND	1,0±0,1	0,5±0,1	1,0±0,5	1,0±0,8	
Geraniol	10,0±1,0 ^c	6,3±0,3 ^b	3,0±0,7 ^a	10,0±1,0 ^c	10,0±1,0	5,0±1,0	9,0±0,4	3,0±1,0	
Total Terpenos	21,7±2,0^b	13,8±1,0^a	11,7±1,0^a	21,7±2,0^b	17,7±1,0^b	10,3±1,0^a	21,0±1,0^b	8,6±0,1^a	
<i>Fenoles volátiles (µg/L)</i>									
4- Etilfenol	6,0±0,4	4,0±1,0	5,0±0,4	6,0±0,8	5,0±2,0	1,0±0,2	1,0±0,1	2,0±0,2	
4- Etilguaiacol	5,0±0,1 ^b	3,0±0,3 ^a	4,0±0,4 ^{ab}	5,0±0,3 ^b	1,0±0,7 ^b	0,4±0,1 ^a	0,3±0,1 ^a	0,4±0,2 ^a	
Total Fenoles Volátiles	11,0±0,5	7,0±1,3	9,0±0,8	11,0±1,1	6,0±2,7	1,4±0,3	1,3±0,2	2,4±0,4	

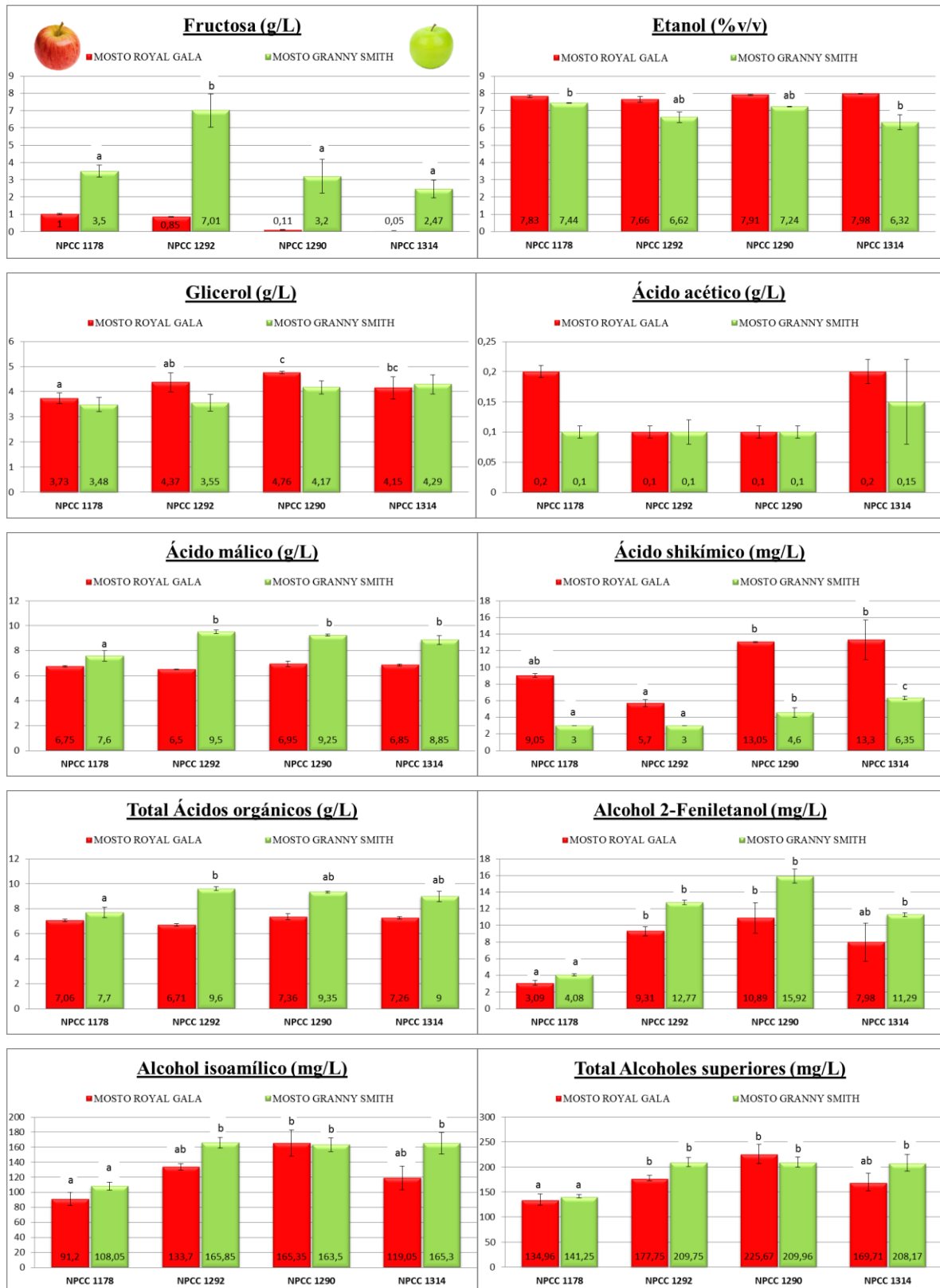
Los datos están expresados en mg/L excepto en los casos indicados. ND: No detectado. Letras diferentes en los superíndices en una misma fila indican diferencias significativas entre valores obtenidos para un mismo mosto (ANOVA y Test de Tukey, n=2).

La naturaleza y concentración de ácidos orgánicos son también factores importantes que influyen en las características organolépticas de la fruta, es decir, en su sabor. Además, los ácidos orgánicos pueden tener un papel protector contra diversas enfermedades debido a su actividad antioxidante (Silva *et al.*, 2004). El ácido orgánico principal en las sidras de manzana es L (-)-málico, pero las variedades de manzana utilizadas en sidra comúnmente contienen otros ácidos como los ácidos shikímico, quínico, clorogénico y p-cumarilquínico (Beech, 1972). Los ácidos quínico y shikímico son muy importantes en el balance de sabor de las sidras, afectando directamente la acidez y, como precursores, afectando también la fracción fenólica. Los resultados obtenidos indican que el ácido málico fue el más abundante en las sidras analizadas, aunque también se encontraron cantidades importantes de ácido shikímico. El contenido de ácido málico fue significativamente mayor en las sidras fermentadas con *S. uvarum* y *S. eubayanus* en mosto de manzana GS (Figura 11); éste fenómeno podría relacionarse con la capacidad descrita de *S. uvarum*, probablemente presente también en *S. eubayanus*, para sintetizar ácido málico en lugar de degradarlo (Castellari *et al.*, 1994; Giudici *et al.*, 1995).

Las concentraciones de ácido shikímico fueron siempre superiores en las sidras obtenidas de RG en relación con las sidras de GS, independientemente de la cepa utilizada. Interesantemente, tanto los mostos de RG como de GS fermentados con las dos cepas de *S. uvarum* presentaron las concentraciones más altas de este ácido (Figura 11). Es sabido que el ácido shikímico, participa en la síntesis de fenilalanina, y ésta es el precursor de la síntesis de 2-feniletanol y acetato de 2-feniletilo (Dietrich y Pour-Nikfardjam, 2009). Tanto el alcohol superior 2-feniletanol como el éster acetato de 2-feniletilo se encontraron, coincidentemente, en las concentraciones significativamente más altas en sidras elaboradas con las mismas dos cepas de *S. uvarum*. Los datos informados anteriormente han indicado que la producción de estos compuestos es un rasgo típico de *S. uvarum* (Antonelli *et al.*, 1999, Gamero *et al.*, 2013, Masneuf-Pomarede *et al.*, 2010, Stribny *et al.*, 2015). En conjunto, los resultados obtenidos podrían indicar que esta vía metabólica podría ser una diferencia importante entre las tres especies estudiadas en esta tesis.

Los alcoholes superiores son cuantitativamente los principales componentes volátiles de la sidra (Herrero *et al.*, 2006). Particularmente el alcohol isoamílico, es el alcohol superior más importante sintetizado por las levaduras durante la fermentación. Con umbrales de óptimos

entre 6 y 400 mg/L para sidra, otorga notas fuertes y picantes (cáusticas) y es el responsable de los defectos aromáticos a concentraciones elevadas (Rous, Snow y Kunkee, 1983).



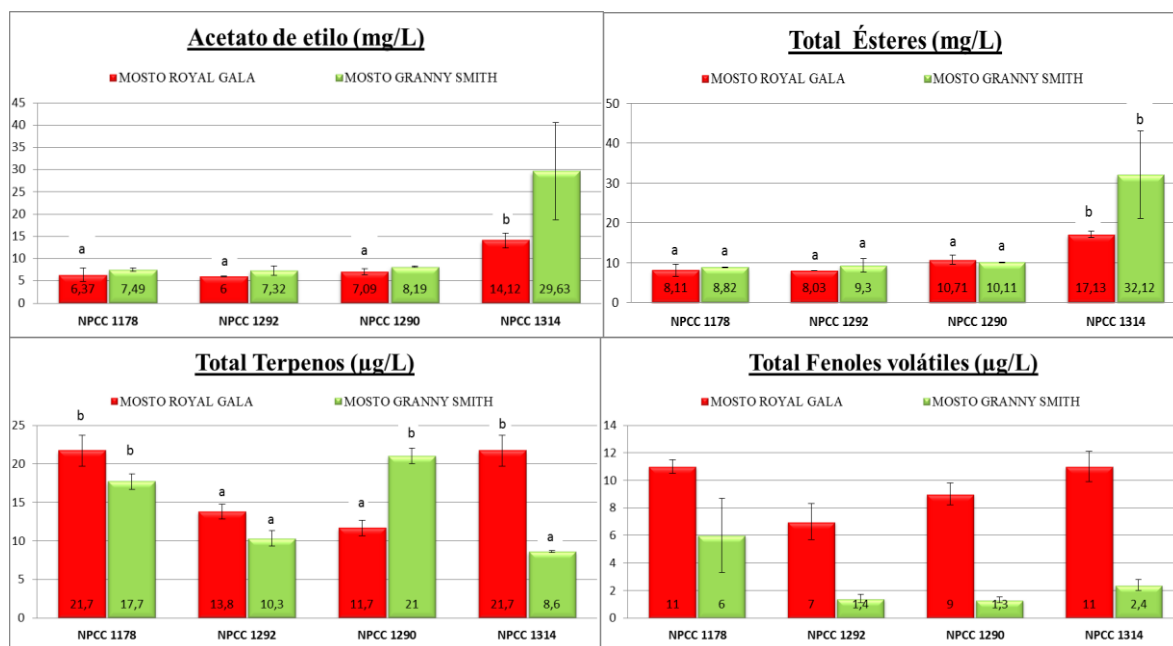


Figura 11: Comparación de parámetros fisicoquímicos y compuestos volátiles más relevantes de las sidras obtenidas con las cepas seleccionadas. Letras diferentes en el extremo superior de la barra indican diferencias significativas entre valores obtenidos para un mismo mosto (ANOVA y Test de Tukey, $n=2$).

Por otro lado, el 2-feniletanol es el responsable del aroma a rosas y miel, y se considera uno de los alcoholes aromáticos más importantes que contribuyen al sabor en bebidas fermentadas. En este trabajo, independientemente del tipo de manzana evaluada, todas las cepas de levaduras no-*S. cerevisiae* produjeron las concentraciones más altas de alcoholes superiores totales en las sidras. Estas diferencias con respecto a *S. cerevisiae* se debieron específicamente a las concentraciones elevadas de alcohol isoamílico y 2-feniletanol (Figura 11). En particular, la cantidad de 2-feniletanol producida por *S. eubayanus* y *S. uvarum* fue al menos dos veces superior a la producida por *S. cerevisiae*. Como se mencionó previamente, una de las propiedades enológicas específicas de *S. uvarum* es la alta producción de alcoholes superiores totales, específicamente del 2-feniletanol; sin embargo, este trabajo es el primer informe sobre la misma capacidad de *S. eubayanus*. La capacidad de producir altos niveles de alcohol 2-feniletílico se ha relacionado con una mayor capacidad para utilizar el nitrógeno asimilable en el mosto, característica que podría estar relacionada con la especie de levadura (Mendes-Ferreira *et al.*, 2009; Torrea *et al.*, 2003).

Cabe destacar que en ningún caso la concentración de alcoholes superiores totales superó el valor umbral óptimo de 350 mg/L, lo cual indicaría que estos compuestos han contribuido positivamente a la complejidad aromática de las sidras.

Los ésteres constituyen un grupo de compuestos volátiles que confieren principalmente aromas agradables a las bebidas fermentadas. La mayoría son ésteres de acetato de alcoholes superiores y ésteres de etilo de ácidos grasos saturados de cadena corta. Entre estos compuestos, uno de los más significativos que afectan el sabor en bebidas fermentadas es el acetato de etilo. Así como el etanol es el alcohol dominante en la sidra, el acetato de etilo (producido a partir de acetyl-CoA y etanol) es el éster más abundante; y junto con el ácido acético contribuyen a la sensación de acidez y rugosidad de esta bebida, sin embargo a altas concentraciones pueden causar defectos aromáticos (Whiting, 1976).

Aunque, como ya se expuso, la concentración de ácido acético fue baja, particularmente en las fermentaciones realizadas con *S. uvarum* y *S. eubayanus*, la producción de acetato de etilo fue siempre la más alta (dos o tres veces mayor que el resto para los mostos RG y GS, respectivamente) en sidras elaboradas con *S. uvarum* NPCC 1314 aislada de ambiente fermentativo (Figura 11), lo que le otorgó una concentración de ésteres totales significativamente mayor a las demás cepas. A su vez, fue la mayor productora de otros ésteres como acetato de 2-feniletilo y acetato de isobutilo (en ambos mostos), junto con octanoato de etilo y decanoato de etilo (particularmente en mosto de RG), (Tabla 9). Todos estos ésteres se han relacionado con notas frutales y florales en bebidas fermentadas: el acetato de isobutilo se asocia con el sabor a fruta, el octanoato de etilo con notas de manzana, el decanoato de etilo con notas de pera y el acetato de 2-feniletilo con sabor florido (Huang *et al.* 2001, Lambrechts y Pretorius, 2000). De acuerdo con estas observaciones, las sidras obtenidas con *S. uvarum* 1314 mostraron la mejor combinación de características.

Los fenoles volátiles son conocidos por contribuir al *off-flavours* y los terpenos son los compuestos más relevantes en la contribución al *flavour* de las bebidas fermentadas. En las sidras base elaboradas con la variedad de cepas seleccionadas en esta tesis, no se observaron diferencias significativas en la concentración de estos compuestos minoritarios.

De los resultados en esta Tesis, se evidencia que las cepas criotolerantes seleccionadas de *S. uvarum* y *S. eubayanus* son capaces de producir sidras con características organolépticas diferenciales, con lo cual poseen una gran potencialidad para ser utilizadas como cultivos iniciadores para la elaboración de sidras propias de la región Norpatagónica.

CONCLUSIONES

- ◆ En esta tesis, se evidenció por primera vez que el origen de las cepas influyó de manera más importante que las relaciones filogenéticas en las características enológicas de las cepas de *S. uvarum* y *S. eubayanus*. Las sidras elaboradas con cepas de *S. uvarum* y *S. eubayanus* aisladas de *A. araucana* presentaron características fisicoquímicas similares entre sí y diferentes a las presentadas por las cepas de *S. uvarum* de bebidas fermentadas.
- ◆ Se confirmaron las características metabólicas y enológicas de *S. uvarum*, evidenciadas en cepas de diferentes orígenes y caracterizadas por una alta producción de glicerol, 2-feniletanol y acetato de 2-feniletanol.
- ◆ Se demostró que *S. eubayanus* presenta características fisiológicas similares a *S. uvarum* y se comprobó por primera vez la capacidad de esta especie para fermentar los jugos de manzana produciendo sidras sin defectos, así como también su capacidad para producir moléculas antagonistas activas contra *S. cerevisiae*.
- ◆ Se seleccionaron tres cepas con una excelente combinación de propiedades, incluyendo dos *S. uvarum* y una *S. eubayanus* para ser utilizadas en la producción de sidra.
- ◆ Los resultados obtenidos indican que el ácido málico fue el ácido más abundante en las sidras analizadas, siendo mayor en las sidras fermentadas con *S. uvarum* y *S. eubayanus* en mosto de manzana GS.
- ◆ Las concentraciones de ácido shikímico fueron superiores en las sidras obtenidas de RG, independientemente de la cepa utilizada. Interesantemente, los dos mostos fermentados con las cepas de *S. uvarum* presentaron las concentraciones más altas de este ácido.
- ◆ Las cepas no-*S. cerevisiae* produjeron las concentraciones más altas de alcoholes superiores totales en las sidras, independientemente de la variedad de manzana evaluada.
- ◆ No se observaron diferencias significativas en la concentración de compuestos minoritarios individuales, incluyendo terpenos y fenoles volátiles, en las sidras base elaboradas con la variedad de cepas utilizadas.

PERSPECTIVAS

- ◆ Evaluar la capacidad de implantación de las cepas seleccionadas en fermentaciones realizadas en mostos no estériles y seleccionar las condiciones óptimas para su uso.
- ◆ Evaluar la aptitud fermentativa a escala piloto y/o industrial de las cepas nativas seleccionadas.
- ◆ Realizar un análisis sensorial de las sidras obtenidas comparándolas con sidras fermentadas con cultivos iniciadores comerciales utilizados en fermentaciones por sidreras de la región Norpatagónica.

BIBLIOGRAFÍA

- Ackermann J., Fisher M., Amadó R. (1992). Changes in sugar, acids, and aminoacids during ripening storage of apples (Cv Glockenapfel). *J. Agricultural Food Chemistry* **40**: 1131-1134.
- Adams A.M. (1953). Studies on the storage of yeast. II. Wine yeast starter stored as moist yeast. Rept. Ontario Hort. Exp. Sta. and Products Lab. 98.
- Adams A.M. (1954). A simple continuous propagator for yeast. Rept. Ontario Hort. Exp. Sta. And Products Lab. 102-103.
- Albers, E., Liden, G., Larsson, C., Gustafsson, L.(1998). Anaerobic redox balance and nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Rec. Dev. Microbiol.* 2, 253-279.
- Amerine M.A. (1985). Winemaking. En: *Worlds Debt to Pasteur*. Koprowski, H., y Plotin, S.A. (Eds.), pp.67-81. New York, Estados Unidos.
- Amerine, M. A., Berg, H. A., Kunkee, R. R., Ough, C. S., Singleton, U. L., Webb A.A. (1982). *Technology of Wine making*. Westport, Connecticut: The AVI Publishing Company.
- Antonelli, A., Castellari, L., Zambonelli, C., Carnacini, A.(1999). Yeast Influence on Volatile Composition of Wines. *Agric. Food Chem.* 47, 1139-1144.
- Arroyo-López F.N., Bautista-Gallego J., Durán-Quintana M.C., Garrido-Fernández A. (2008). Effects of ascorbic acid, sodium metabisulfite and sodium chloride on freshness retention and microbial growth during the storage of Manzanilla- Aloreña cracked table olives. *LWT Food Science and Technology*, **41**: 551–560.
- Barbagelata R.J. (2010). *Ecología de levaduras asociadas a la elaboración de sidras patagónicas*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional del Comahue. Facultad de Ingeniería.
- Bayonove C.L., Baumes R., Crouzet J., Gunata Y.Z. (2000). Aromas In: *Enología, Fundamentos científicos y tecnológicos*. Ed. AMV, Madrid, España. pp. 137-173.
- Beech F.W. (1972). Cider making and cider research: a review. *Journal of Institute of Brewing* **78**: 477- 491.
- Bertolini, L., Zambonelli, C., Giudici, P. and Castellari, L. (1996). Higher alcohol production by cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 343-345..
- Bevan, E.A. y Makower, M. (1963). The physiological basis of the *killer* character in yeast. In: *Proceeding of the Eleventh International of Genetics* (Goerts, S.J., Ed.) Pergamon Press, Oxford. pp. 202-203
- Blanco Gomis D., Mangas J.J. (2010). *La manzana y la sidra: Bioprocesos tecnologías de elaboración y control*. ISBN 978-84-693-6631-8. pp 318.

- Blanco Gomis D., Picinelli A., Gutierrez M.D., Mangas J.J. (1990). Determination of aminoacids in apple extracts by High Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia* **29**: 155-160.
- Cabranes C., Moreno, J., Mangas J.A. (1990). Dynamics of Yeast Populations during Cider Fermentation in the Asturian Region of Spain. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 3881-3884.
- Calderón-Borra M., Fernández N., Rodríguez M.E., Sangorrín M.P., Lopes C.A. (2010). Diversidad de levaduras asociadas a chichas de manzana silvestre de Sud América. XIV Congreso Latinoamericano de Genética. Viña del Mar, Chile.
- Carrau, F.M., Neirotti, E., and Gioia, O: (1993). Stuck wine fermentations, effect of killer/sensitive yeast interactions. *Journal of Fermentation Bioengineering* **76**: 67-69
- Cassone, A., Conti, S., De Bernardis, F. y Polonelli, L. (1997). Antibodis, killer toxin and antifungal immunoprotection: a Lesson from nature? *Immunology Today* **18**: 164-169.
- Castellari L., Ferruzzi M., Magrini A., Giuidici P., Passarelli P., Zambonelli C. (1994). Unbalanced wine fermentation by cryotolerant vs. non-cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Vitis*, 33, 49-52.
- Castor J.G. (1953). Experimental development of compressed yeast fermentation starters. *Wines & Vines* **34**: 8-27.
- Chandon J. A. (2003). *Faites votre cidre*. Ediciones D'utovie. Francia. 40 pp.
- Chatonnet P., Dubourdieu D., Boidron J.N., Pons M. (1992). The origen of ehtylphenols in wines. *Journal Science of Food Agricultural* **60**: 165-178.
- Colas S., Daumas F., Pusais J., Cuinier C. (1984). Les souches de "Côtes du Rhône". In: VI Symposium International sur les levures. Montpellier.
- Coloretti F., Zambonelli C., Tini V. (2006). Characterization of flocculent *Saccharomyces* interspecific hybrids for the production of sparkling wines. *Food Microbiology* **23**: 672-676.
- Coton E., Coton M., Levert D., Casaregola S., Sohier D. (2006). Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *Int. J. Food Microbiology* **108**: 130-135.
- Coudray, M., Teurtrie, J., Vico, J. (2003). *Le cidre*. Ediciones Jean Paul, Gisserot. Francia. 32 pp.
- Cuinier C. (1986). Le levadure spécifique. *Viticulture Tourangelle* **215**: 15-18.
- de la Roza C., Laca A., García L., Díaz M. (2003). Ethanol and ethyl acetate production during the cider fermentation from laboratory to industrial scale. *Process Biochemistry* **38**: 1451-1456.
- Degré R. (1993). Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. Ed. Fleet G. Harwood Academic Publishers, Suiza. pp. 421- 447.

- del Campo G., Santos J.I., Berregi I., Velasco S., Ibarburu I., Dueñas M.T., Irastorza A. (2003). Cider Produced by Two Types of Presses and Fermented in Stainless Steel and Wooden Vats. *Journal of Institute of Brewing* **109**: 342-348.
- Demuyter C., Lollier M., Legras J.L., Le Jeune C. (2004). Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery. *Journal of Applied Microbiology* **97**: 1140–1148.
- Dietrich, H., Pour-Nikfardjam, M.S. (2009). Influence of Phenolic Compounds and Tannins on Wine-Related Microorganisms. In: König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (Eds.) *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Heidelberg, Germany, pp. 307-334.
- du Toit M., Pretorius I.S. (2000). Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal: A review. *American Journal of Enology and Viticulture* **21**: 74-96.
- Durieux A., Nicolay X., Simon J.P. (2005) Application of immobilization technology to cider production: a review. In: *Applications of Cell Immobilization Biotechnology*, pp. 275-284. V. Nedovic and R. Willaert (Eds.). Springer, Netherlands.
- Eglinton J.M., Heinrich A.J., Pollnitz A.P., Langridge P., Henschke P.A., de Barros Lopes M. (2002). Decreasing acetic acid accumulation by a glycerol overproducing strain of *Saccharomyces cerevisiae* by deleting the *ALD6* aldehyde dehydrogenase gene. *Yeast* **19**: 295-301.
- Eglinton J.M., William J.M., Fogarty M.W., Francis I.L., Kwiatkowski M.J., Hoj P.B., Henschke P.A. (2000). The effect of *Saccharomyces bayanus*- mediated fermentation on the chemical composition and aroma profile of Chardonnay wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **6**: 190-196.
- Eisele T.A., Drake S.R. (2005). The partial compositional characteristics of apple juice from 175 apple varieties. *Journal Food Compositional Analysis* **18**: 213-221.
- Esteve-Zarzoso B., Manzanares P., Ramón D., Querol A. (1998). The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. *International Microbiology* **1**: 143- 148.
- Fernandes-Salomão, T.M., Amorim, A.C.R., Chaves-Alves, V.M., Coelho, J.L.C., Silva, D.O., Araújo, E.F. (1996). Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. *Rev. Microbiol.* **27**: 15–18.
- Fleet G. H. (2008). Wine yeasts for the future. Food Science, School of Chemical Sciences and Engineering, University of New South Wales, Sydney, NSW, Australia.
- Fleet, G.H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* **86 (1-2)**: 11-22.
- Fleet G.H., Heard G.M. (1993). Yeast growth during fermentation. In: *Wine microbiology and biotechnology*. G. Fleet (Ed.). Cap. 2, pp: 27-54. Harwood Academic Publishers. Suiza.

- Franken, D. B., Ariatti, M., Pretorius, I.S. y Guphar, A.S., (1998). Genetic y Fermentation properties of the *killer* yeast, *Saccharomyces cerevisiae* T206. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**: 263-269.
- Gamero A., Tronchoni J., Querol A., Belloch C. (2013). Production of aroma compounds by cryotolerant *Saccharomyces* species and hybrids at low and moderate fermentation temperatures. *Journal Applied Microbiology* **114**: 1405-1414.
- Gancedo C., Serrano R. (1989). Energy-yielding metabolism. In: The yeast, Volume 3, segunda edición. Rose, A.H. and Harrison, J.S. (Eds.). pp. 205-259, New York: Academic Press, Nueva York, Estados Unidos.
- Gibson B., Liti G. (2015). *Saccharomyces pastorianus*: genomic insights inspiring innovation for industry. *Yeast* **32**: 17-27.
- Giudici P., Zambonelli C. (1992). Criteri di selezione dei lieviti per neología. *Vignevini* 9, 29-34.
- Giudici P., Zambonelli C., Passarelli P., Castellari L. (1995). Improvement of wine composition with cryotolerant *Saccharomyces* strains. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 143-147.
- Gonçalves, P., Rodrigues de Sousa, H., Spencer-Martins I.(2000). *Fsy1*, a novel gene encoding a specific fructose/h1 symporter in the type strain of *saccharomyces carlsbergensis*. *J. Bacteriol.* 182 (19), 5628-5630.
- González, J.A., Gallardo, C.S., Pombar, A., Rego, P., Rodríguez, L.A. (2004). Determination of enzymatic activities in ecotypic *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeast. *Elec. J. Env. Agricult. Food Chem.* **3**: 743-750.
- Guillaume, C., Delobel, P., Sablayrolles, J.M., Blondin, B., (2007). Molecular Basis of Fructose utilization by the Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a Mutated *HXT3* Allele Enhances Fructose Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (8), 2432-2439.
- Guittard A. (1980). Practic utilization of an improving yeast: *Saccharomyces capensis*. *Review Franc Oenologie* **16**: 77-80.
- Günata, Y.Z., Bitteur, S., Brillouet, J.M., Bayonove, C.L., Cordonnier, R.E.(1988). Sequential Enzymatic Hydrolysis of potentially Aromatic Glycosides from Grape Carbohydrate Res. 184, 139-149.
- Henschke P.A. (1997). Wine yeast. In *Yeast Sugar Metabolism*, Zimmermann F.K., Entian K-D (eds). Technomic Publishing: Lancaster, PA; 527-560.
- Hernández, L.F., Espinosa, J.C., Fernández-González, M., Briones, A. (2003). β -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *Int. J. Food Microbiol.* 80: 171- 176.
- Herrero, M., García, L.A., Díaz, M. (2006). Volatile Compounds in Cider: Inoculation Time and Fermentation Temperature Effects. *J. Inst. Brew.* 112(3), 210-214.

- Herrero M., Roza C., García L.A., Díaz M. (1999). Simultaneous and sequential fermentations with yeast and lactic acid bacteria in apple juice. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology* **22**: 48-51.
- Hsu, J., Heartherbell, D., Yorgey, B.(1989). Effects of fruit storage and processing on clarity, proteins and stability of Granny Smith apple juice. *J. Food Sci.* 54, 660-662.
- Huang, C., Lee, S.L., Chou, C.C. (2001). Production of 2-phenylethanol, a *flavour* ingredient, by *Pichia fermentans* L-5 under various culture conditions. *Food Res. Int.* 34, 277-282.
- Ishikawa, T., Noble, A.C. (1995). Temporal perception of astringency and sweetness in red wine. *Food Qual. Prefer.* 6, 27-33.
- Jiranek V. (2003). Yeast nutrition and fermentation kinetics. En: Actas del IX Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología. Ed. Pszczólkowski. P., González, A.S., Prado, B., Sánchez, M.S., y Varas, M.E. (Eds.). pp. 129-136. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago de Chile, Chile. I.S.B.N.: 956-14-0745-0.
- Johansen K. (2000). Cider Production in England and France – and Denmark? Danbrew Ltd. A/S. Brygmesteren - NR. 4.
- Jolly N.P., Augustyn O.P.H., Pretorius I.S. (2006). The Role and Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Wine Production. *Journal Enology Viticulture*. **27**:(1) 1-8.
- Kurtzman C.P., Fell J.W. and Boekhout T. (2011). The yeasts, a taxonomic study. Fifth edition. Ed. Amsterdam: Elsevier.
- Kurtzmann C.P., Fell J.W. (1998). The yeast. A taxonomic study. Ediciones Elsevier Science Publications. Amsterdam. Holanda. ISBN 0-444-81312-8.
- Lafon-Lafourcade S. (1983). Wine and Brandy. In: Rehm, H. J., Reed, G. (Eds.). *Biotechnology*, vol. 5. Germany: Weinheim.
- Lambrechts M.G., Pretorius I.S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma- a review. *South African Journal of Enology and Viticulture* **21**: 75-97.
- Lea A.G.H. (1990). Apple Juice. En “Production and Packaging of non-Carbonated Fruit Juices and Fruit Beverages”. D. Hicks (editor). Blackie and Son Ltd, Glasgow, 182- 222.
- Lea A.G.H. (1995). Cider making. In: *Fermented Beverage Production*, pp. 81-82. Lea, A.G.H. and Piggott, J.R. (Eds.). Blackie Academic and Professional Press, London, UK.
- Libkind D., Hittinger C.T., Valerio E., Goncalves C., Diver J., Johnston M., Goncalves P., Sampaio J.P. (2011) Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lagerbrewing yeast. *PNAS Early Edition* **108**: 1-6.
- Longo, E., Cansado, J., Sieiro, P., Calo, P., Velásquez, J.B. y Villa, T.G., (1992). Influence of the curing of the *killer* phenotype in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains on their fermentative behavior. *World Journal of Microbiology y Biotechnology* **8**: 147- 150.

- Lopes C.A. (2004). Biotecnología de vinos: selección de una cepa de levadura indígena destinada a la producción de un starter de fermentación vínica para ser usado en denominación de origen. Tesis Doctoral. C.R.U.B.- U.N.Comahue.
- López-Malo, M., Querol, A. Guillamon, J.M. (2013). Metabolomic Comparison of *Saccharomyces cerevisiae* and the Cryotolerant Species *S. bayanus* var. *uvarum* and *S. kudriavzevii* during Wine Fermentation at Low Temperature. PLoS ONE 8(3), 1-14.
- Lowes, K.F., Shearman, C.A., Payne, J., Mackenzie, D., Archer, D.B., Merry, R.J. and Gasson, M.J. (2000). Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast Myosin HMK. *Applied and Environmental Microbiology* **3**: 1066-1076.
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D. y Polonelli, L. (1997). Yeast *killer* systems. *Clinical Microbiology Reviews* **3**: 369-400.
- Magyar, I., Tóth, T. (2011). Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 28, 94-100.
- Mangas, J.J., Cabranes, C., Moreno, J., Gomis, D.B. (1994). Influence of cider-making technology on cider taste. *Lebensm.-Wiss. U- Technology* **27**: 583-586.
- Mangas J.J., Rodriguez R., Moreno J., Blanco D. (1996). Changes in the Major Volatile Compounds of Cider Distillates During Maturation. *Lebensm.-Wiss. U.-Technology* **29**: 357-364.
- Martín, M.C., Morata de Ambrosini, V.I.(2014). Effect of a cold-active pectinolytic system on colour development of Malbec red wines elaborated at low temperature. *Int J Food Sci Technol.* 49, 1893-1901.
- Martini A., Martini A.V. (1990). Grape must fermentation. Past y Present. In: Yeast technology. Ed. Spencer J.F.T. and Spencer D. M., Springer Verlag, New York. pp 105- 123.
- Masneuf-Pomarède I., Bely M., Marullo P., Lonvaud-Funel A., Dubourdiou D. (2010). Reassessment of phenotypic traits for *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* wine yeast strains. *International Journal of Food Microbiology* **139**: 79-86.
- Medina, K., Carrau, F.M., Gioia, O., and Bracesco, N. (1997). Nitrogen available of grape juice limits *killer* growth and fermentation activity during mixed-culture fermentation with comercial yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 2821-2825.
- Mendes-Ferreira, A., Barbosa, C., Falco, V., Leão, C., Mendes-Faia, A. (2009). The production of hydrogen sulphide and other aroma compounds by wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* in synthetic media with different nitrogen concentrations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 571-583.
- Meyer J.P. (1979). Yeasts adapted to low temperatures, and their selection. *Review. Franch. Oenologie* **16**: 45-48.
- Morrissey W.F., Davenport B., Querol A., Dobson A.D.W. (2004). The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. *Journal of Applied Microbiology* **97**: 647-655.

- Nally, M.C., Maturano, Y.P., Vázquez, F., Toro, M.E. (2005). Comportamiento de una cepa salvaje de *Saccharomyces cerevisiae killer* y su isogénica sensible respecto de diferentes fuentes de nitrógeno en cultivos mixtos. *Revista Argentina de Microbiología* **37**: 73-77.
- Naumov, G.L., Nguyen, H.V., Naumova, E.S., Michel, A., Aigle, M., Gaillardin C. (2001). Genetic identification of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, a cider-fermenting yeast. *International Journal of Food Microbiology* **65**: 163-171.
- Nedovic, V.A., Durieux, A., Van Nedervele, L., Rosseels, P., Vandegans, J., Plaisant, A.M., Simon, J.P. (2000). Continuous cider fermentation with co-immobilized yeast and *Leuconostoc oenos* cells. *Enzyme and Microbial Technology* **26**: 834-839.
- Nevoigt, E., Stahl, U. (1997). Osmoregulation and glicerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**, 231–241.
- Oliveira B.M, Eladio Barrio E., Amparo Querol A., Pérez-Torrado R. (2014). Enhanced Enzymatic Activity of Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase from the Cryophilic *Saccharomyces kudriavzevii*. *Plos One* **9**: (1) 1-12.
- Paillard, N. (1990). The flavour of apples, pears and quinces. In: Norton, I., Macleod, A. (Eds.), *Food Flavours*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands, pp. 1- 41.
- Palpacelli, V., Ciani, M. and Rosini, G. (1991). Activity of different *killer* yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. *FEMS Microbiology Letters* **84**: 75-78.
- Pando Bedriñana, R.; Lastra Queipo A., Suárez Valles B. (2012). Screening of enzymatic activities in non-Saccharomyces cider yeasts. *J. Food Biochem.* **36**, 683-689.
- Pérez, F., Ramirez, M. and Regodón, J.A. (2001). Influence of *killer* strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *Antoine van Leeuwenhoek* **79**: 393-399.
- Piyasena, P., Rayner, M., Bartlett, F.M., Lu X., and MacKellar, R.C. (2002). Characterization of Apples and Apple Cider Produced by a Guelph Area Orchard. *Lebensm-Wiss. U. – Technology* **35**: 622-627.
- Poulard, A., Reberteau, R., Rousset, Y. (1985). La microflore des phases prefermentaires. *Revue Francaise d'Oenologie* **99**: 14-19.
- Pretorius I.S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **16**: 675–729.
- Pretorius I.S., Høj P.B. (2005) Grape and wine biotechnology: Challenges, opportunities and potential benefits. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **11**: 83–108.
- Pronk J.T., Steensma H., van Dijken A.J.P. (1996). Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**: 1607-1633.
- Querol A., Ramón D. (1996). The application of molecular techniques in wine microbiology. *Trends in Food Science and Technology* **7**: 73-78.

- Querol, A., Huerta, T., Barrio, E. and Ramón, D. (1992a). Dry yeast strain for use in fermentation of Alicante wines: selection and DNA patterns. *Journal of Food Science* **57**: 183-185.
- Querol A., Huerta T., Barrio E., Ramón D. (1992b). Dry yeast strain for use in fermentation of Alicante wines: selection and DNA patterns. *Journal of Food Science* **57**: 183-185.
- Rainieri, S. and Pretorius, I.S. (2000). Selection and improvement of wine yeasts. *Ann. Of Microbiology* **50**: 15-30.
- Rainieri, S., Zambonelli, C., Hallsworth J.E., Pulverini, A. Giudici, P. (1999). *Saccharomyces uvarum*, a distinct group within *Saccharomyces sensu stricto*. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**, 177-185.
- Ribereau Gayon, P. (1985). New development in wine microbiology. *American Journal of Enology and Viticulture*, **36**, 1-10.
- Ribereau Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A. (2003). *Tratado de Enología 1. Microbiología del vino. Vinificaciones*. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.
- Robinson J. (1994). *The Oxford companion to wine*. Oxford University Press, Oxford.
- Rodríguez, M.E., Lopes, C., van Broock, M., Vallés, S., Ramón, D., Caballero, A. (2004). Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activity. *J. Appl. Microbiol.* **96**: 84–95.
- Rodríguez M.E., Pérez-Través L., Sangorrín M.P., Barrio E., Lopes C.A. (2014). *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces uvarum* associated with the fermentation of *Araucaria araucana* sedes in Patagonia. *FEMS Yeast Research*. **1**: 1–18.
- Rojas, V., Gil, J.V., Piñaga, F., Manzanares, P. (2001). Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* **70**, 283-289.
- Rous, C.V., Snow, R., Kunkee, R.I. (1983). Reduction of higher alcohols by fermentation with a leucine-auxotrophic mutant of wine yeast. *J. Inst. Brew.* **89**, 274-278.
- Rowles K. (2000) *Processed Apple Product Marketing Analysis: Hard Cider and Apple Wine*. SP 2000- 06, June 2000. Department of Agricultural, Resource, and Managerial Economics Cornell University. Ithaca, New York 14853-7801 USA.
- Sangorrín, M.P., Zajonskovsky, I., Lopes, C., Rodriguez, M.E., van Broock, M.R. and Caballero, A. (2001). *Killer* behavior in wild wine yeasts associated to Merlot and Malbec type musts spontaneously fermented from Northwestern Patagonia (Argentina). *Journal of Basic Microbiology* **41**: 105-113.
- Sangorrín, M., Zajonskovsky, I., van Broock, M., Caballero, A. (2002). The use of *killer* biotyping in an ecological survey of yeast in an old Patagonian winery. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 115–120.

- Sangorrín, M.P., Lopes, C.A., Belloch, C., Querol, A. and Caballero, A. C. (2007). *Candida patagónica* sp. nov., a new yeast species from cellars surfaces. *Antonie van Leeuwenhoek* **92**: 77-81.
- Shimizu, K., (1993). *Killer yeast*. In: Wine, Microbiology y Biotechnology. (Graham H. Fleet, Ed.) pp. 243-264. Switzerly: Harwood Academic Publishers. ISBN 3-7186-5132-7.
- Silva, P., Cardoso, H., Gerós, H. (2004). Studies on the wine spoilage capacity of *Brettanomyces/Dekkera* spp. *Am. J. Enol.Vitic.* 55, 65-72.
- Sipiczki M., Romano P., Lipani G., Miklos I., Antunovics Z. (2001) Analysis of yeast derived from natural fermentation in Tokaj winery. *Antonie van Leeuwenhoek* **79**: 97-105.
- Sipiczki M. (2002). Taxonomic and physiological diversity of *Saccharomyces bayanus*. *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts* (Ciani M, ed), pp. 53–69. Research Signpost, Kerala.
- Stribny, J., Gamero, A., Pérez-Torrado, R., Querol, A., (2015). *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces uvarum* differ from *Saccharomyces cerevisiae* during the production of aroma-active higher alcohols and acetate esters using their amino acidic precursors. *Int. J. Food Microbiol.* 205, 41–46.
- Suárez-Lepe J.A. (1997). En: Levaduras vínicas. Funcionalidad y uso en bodega. Capítulo III. Ediciones. Mundi Prensa. Madrid.
- Suárez-Valles B., Bredriñana, R.P., Fernández Tascón, N., Querol Simón, A. and Rodriguez Madrera, R. (2007a). Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiology* **24**: 25-31.
- Suárez-Valles B., Pando Bredriñana Pando R., González García A., Querol A. (2007b). A molecular genetic study of natural strains of *Saccharomyces* isolated from Asturian cider fermentations. *Journal of Applied Microbiology* **103 (4)**: 778-786.
- Sudrand P., Chauvert S. (1985). Action antilevure de l'anhydride sulfureux moléculaire. *Connaissance de la Vigne et du Vin* **19**: 39-40.
- Swiegers J.H., Bartowsky E.J., Henschke P.A., Pretorius I.S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma. *Australian Journal of Grape and Wine Research.* **11**: 139-73.
- Torrea, D., Fraile, P., Garde, T., Ancín, C. (2003). Production of volatile compounds in the fermentation of chardonnay musts inoculated with two strains of *Saccharomyces cerevisiae* with different nitrogen demands. *Food Cont.* 14, 565–571.
- Tronchoni, J., Gamero, A., Arroyo-López, F.N, Barrio, E., Querol, A. (2009) . Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 134, 237– 243.
- Ugliano, M. (2009). Enzymes in winemaking. In: Moreno-Arribas, M., Polo, M. (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer Science + Business Media LLC, New York, USA, pp. 103–128.

- Valade M., Moulin J.P., Laurent M. (1984). Comparaison de preparations de levures séches actives dans les conditions de la vinification champenoise. *Le Vigneron Champenois* **105**: 382-307.
- Valadi, A., Granath, K., Gustafsson, L., Adler, L.(2004). Distinct intracellular localization of Gpd1p and Gpd2p, the two yeast isoforms of NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, explains their different contributions to redox-driven glycerol production. *J. Biol. Chem.* *279*, 39677–39685.
- Whiting, G.C. (1976). Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages-a review. *J. Inst. Brew.* *82*, 84-92.
- Williams A. (1974). Flavour research and the cider industry. *Journal Institute of Brewing* **80**: 455-70.
- Xu Y., Zhao G., Pan H., Li J. (2005) Effects of Inhibitory Environmental Factors on Growth of *Oenococcus oeni* CCSYU2068 for Malolactic Fermentation of Cider Production. *Journal of Institute of Brewing* **11**: 223-228.
- Zajonskovsky, I., Lavallo, L., Sangorrín, M. and Caballero, A. (2004). Levaduras *killer* y vitivinicultura. *El Vino y su Industria.* **20**: 29-42.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* *56*, 1875–1881.

PÁGINAS WEB

Fuente Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca de Argentina:

http://www.minagri.gob.ar/site/desarrollo_rural/eventos_y_material_de_difusion/02_publicaciones/_publicaciones/guia_para_la_elaboracion_artesanal_de_sidra.pdf

Fuente Diario Río Negro:

<http://www.rionegro.com.ar/diario/print/nota-735266-2.aspx>

Fuente Sidra de Asturias:

<http://www.sidradeasturias.es>