



**Facultad de Ciencias
del Ambiente y la Salud**

Universidad Nacional del Comahue

TESIS DE GRADO

“Efecto de la temperatura y la variedad de manzana sobre la diversidad de levaduras presentes durante la elaboración de sidras patagónicas”

Tesista: Romina Di Niccolo

Carrera: Licenciatura en Saneamiento y Protección Ambiental

Legajo: 70695

Director: Dr. Christian Lopes

Codirector: Dra. María Eugenia Rodríguez

**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)

Trabajo de Tesis titulado

Efecto de la temperatura y la variedad de manzana sobre la diversidad de levaduras presentes durante la elaboración de sidras patagónicas

.....

Dr. Lopes Christian Ariel

.....

Dra. María Eugenia Rodríguez

.....

Tesista Romina Di Niccolo

Agradecimientos

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

A mi Director Christian Lopes y mi Co-Directora Maria Eugenia Rodriguez, porque son la cabeza intelectual de este trabajo, por haber tenido una dedicación incondicional en esta tesis.

A mi familia, especialmente a mi mamá, porque siempre confió en mí, por motivarme en los momentos difíciles, para poder seguir adelante con mis metas.

A mi compañera y amiga del alma, yuni por esas noches largas de estudio siempre a mi lado.

A Ivan por estar, por acompañarme y apoyarme en este trayecto, tan importante.

A mis compañeras de laboratorio por haber tenido la paciencia y la dedicación para enseñarme; principalmente quiero agradecer a Andrea porque además ha estado siempre que las necesite y a Melisa, por su acompañamiento, porque siempre me estímulo a seguir adelante, y por los conocimientos compartidos.

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

A todo el personal del PROBIEN, el instituto donde se desarrolló este trabajo.

A la Universidad Nacional del Comahue y al personal docente en general, por haber participado en mi formación académica.

RESUMEN

Las levaduras son microorganismos responsables de la transformación del mosto de manzana en sidra base, mediante el proceso metabólico conocido como fermentación alcohólica. Durante este proceso las levaduras no solo producen etanol y CO₂, sino que también un gran número de metabolitos que contribuyen a la complejidad en el aroma y el sabor de la sidra. Aun cuando la especie de levadura más ampliamente involucrada en las fermentaciones del mundo es *Saccharomyces cerevisiae*, también se ha reportado la presencia de la especie criotolerante *Saccharomyces uvarum*, principalmente asociada a fermentaciones realizadas a bajas temperatura. La fermentación a baja temperatura 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 estudiar y analizar la biodiversidad de levaduras indígenas asociadas a procesos de elaboración de sidras, utilizando mostos de una sidrera de la región del Alto Valle de Río Negro (Norpatagonia Argentina). Para este análisis se evaluó el efecto de la temperatura de fermentación y la variedad de manzana, con el objetivo de evidenciar la influencia de estas variables sobre la biota de levaduras en fermentaciones naturales (espontáneas).

El aislamiento y recuento de las levaduras se realizó en un medio completo no selectivo. La identificación se realizó utilizando métodos fisiológicos para obtener una primera clasificación en función del tipo de esporulación, forma de la colonia y temperatura de crecimiento. Posteriormente se seleccionaron entre 2 y 4 colonias de cada grupo para realizar la determinación a nivel de especie por secuenciación del dominio D1/D2 del gen ribosomal 26S, las secuencias obtenidas fueron analizadas por BLASTn. Con las colonias identificadas dentro género *Saccharomyces* que no pudieron ser caracterizadas a nivel de especie con esta técnica, se realizó PCR-RFLP de 6 genes nucleares. Se pudo identificar la especie *Saccharomyces uvarum*, asociada a un ambiente de fermentación industrial (Mosto Red Delicious a 13°C) por primera vez en todo el continente.

En los estadios iniciales de fermentación se observó la mayor diversidad de especies, independientemente del mosto y temperaturas evaluadas, identificándose en todos los casos solo a especies *no-Saccharomyceticas*. En mayoría de los casos analizados, se observó la mayor diversidad de especies en las fermentaciones realizadas a 13°C indicando que las temperaturas bajas permiten conservar la diversidad incluso en los estadios medios y finales de fermentación, independientemente del mosto utilizado.

Por último, en cuanto a las propiedades cinéticas y fisicoquímicas de las sidras obtenidas, se observó que las fermentadas a 25°C tuvieron una cinética similar y menor tiempo de fermentación, mientras que en las fermentadas a 13°C se observó una cinética superior en mosto Red Delicious donde dominó la fermentación la especie *S. uvarum*. Además, estas sidras presentaron una menor acidez volátil, características de interés en la industria sidrera.

ABSTRACT

Yeasts are microorganisms responsible for the transformation of apple must into cider base, through the metabolic process known as alcoholic fermentation. During this process, yeasts not only produce ethanol and CO₂, but also a large number of metabolites that contribute to the complexity in the aroma and flavor of cider. Although the yeast species most widely involved in the fermentations of the world is *Saccharomyces cerevisiae*, the presence of the cryo-tolerant species *Saccharomyces uvarum* has also been reported, mainly associated with fermentations carried out at low temperatures. The fermentation at low temperature allows to preserve the volatile compounds related to the aroma better, so having cryo-tolerant yeasts for these processes is of the utmost importance.

The objective of this work was to study and analyze the biodiversity of indigenous yeasts associated with cider making processes, using the majority of a cider from the Alto Valle region of Río Negro (Norpatagonia Argentina). For this analysis, the effect of fermentation temperature and apple variety was evaluated, with the aim of demonstrating the influence of these variables on the biota of yeasts in natural (spontaneous) fermentations.

The isolation and counting of yeasts was performed in a complete non-selective medium. The identification was made using physiological methods to obtain a first classification based on the type of sporulation, shape of the colony and growth temperature. Subsequently, between 2 and 4 colonies of each group were selected to perform the determination at the species level by sequencing the D1 / D2 domain of the 26S ribosomal gene, the sequences obtained were analyzed by BLASTn. With the colonies identified within the *Saccharomyces* genus that could not be characterized at the species level with this technique, PCR-RFLP of 6 nuclear genes was performed. The species *Saccharomyces uvarum* could be identified, associated with an industrial fermentation environment (Mosto Red Delicious at 13 ° C) for the first time throughout the continent.

In the initial stages of fermentation, the greatest diversity of species was observed, regardless of the must and temperatures evaluated, identifying in all cases only non-Saccharomycetic species. In most of the cases analyzed, the greatest diversity of species was observed in fermentations carried out at 13 ° C, indicating that low temperatures allow the diversity to be preserved even in the middle and final stages of fermentation, regardless of the must used.

Finally, regarding the kinetic and physicochemical properties of the ciders obtained, it was observed that those fermented at 25 ° C had a similar kinetics and less fermentation time, while in those fermented at 13 ° C a higher kinetics was observed in Red Delicious must where fermentation dominated the species *S. uvarum*. In addition, these ciders showed a lower volatile acidity, characteristics of interest in the cider industry.

INDICE

INTRODUCCIÓN	01
1. La sidra.....	01
1.1. Historia.....	01
1.2. Definición.....	01
1.3. Producción y Consumo.....	02
2. El proceso de elaboración de la sidra.....	05
2.1. Materia prima.....	05
2.2. Elaboración.....	07
2.2.1. Procesos Pre-fermentativos.....	08
2.2.1.1. Ingreso de la fruta.....	12
2.2.1.2. Obtención del jugo.....	12
2.2.1.3. Sulfitado del mosto.....	13
2.2.1.4. Clarificación.....	13
2.2.2. Procesos Fermentativos.....	14
2.2.3. Operaciones Post-fermentativas.....	15
3. Levaduras.....	15
3.1. Ecología de levaduras asociadas al proceso de elaboración de sidra.....	16
3.2. <i>Saccharomyces</i>	19
3.2.1 Características generales.....	19
3.3. Selección de levaduras para cultivos iniciadores de sidra.....	19
3.4. La importancia de la biodiversidad de levaduras.....	20
Hipótesis	23
Objetivo general	23
Objetivos particulares	24
MATERIALES	23
1. Material biológico.....	24
2. Soluciones para análisis microbiológico.....	24
3. Medios de cultivo.....	24
4. Reactivos utilizados en los estudios moleculares.....	24
5. Soluciones y kits comerciales.....	25
6. Equipamiento.....	26
MÉTODOS	27
1. Fermentación.....	27
1.1. Escala de laboratorio.....	27
1.2. Recolección de muestras.....	27
2. Aislamiento de levaduras durante el proceso de elaboración de sidra.....	27
3. Caracterización e identificación de levaduras.....	28
3.1. Métodos convencionales.....	28
3.1.1. Caracterización macroscópica y microscópica.....	28
3.1.2. Esporulación.....	28
3.2. Caracterización a nivel molecular.....	28
3.2.1. Extracción de ADN.....	28

3.2.2. Secuenciación del dominio D1/D2.....	30
3.2.3 Identificación de especies del género <i>Saccharomyces</i>	31
4. Índice de biodiversidad.....	32
5. Determinaciones Físico químicas.....	32
5.1 Glucosa- Fructosa y Glicerol.....	32
5.2. Etanol.....	32
5.3. Acidez volátil (AV)	33
5.4. Sólidos solubles.....	33
5.5. pH.....	33
6. Métodos estadísticos.....	33
6.1. Modelos mixtos no lineales.....	33
6.2. Análisis de datos fisicoquímicos.....	34
6.3 Análisis multivariado.....	35
RESULTADOS	36
1. Cinética de fermentación.....	36
2. Características físico químicas en sidra.....	38
3. Caracterización e identificación de biota de levaduras.....	41
3.1. Características macroscópica y microscópica.....	42
3.2 Caracterización a nivel molecular.....	43
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	54

INTRODUCCION

1. La sidra

1.1. Historia

La sidra 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 así también en la zona de Asturias en España, la explotación del manzano y la elaboración y 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 el vinagre de manzana, el coñac y el espumante de manzana (Durieux et al., 2005). La sidra se mantuvo como una bebida popular en EEUU 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 vuelve a reinstalarse en el mercado americano (EEUU) y europeo gracias a las mejoras tecnológicas que repercutieron en mejoras en la calidad del producto, nuevas estrategias de marketing y a la cultura alimenticia de los comensales (Rowles, 2000).

1.2. Definición

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.

1.3 Producción y Consumo

El 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 y popular sino también el centro de una actividad turística de 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 apuntalan 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 una San Juan. De estas 15 empresas, cuatro 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 sería de 40 millones de litros para el año 2010.

La región norpatagónica comprende cuatro áreas productivas, de las cuales el Alto Valle del río Negro concentra prácticamente el 90% de la actividad. En esta área las variedades de manzanas usualmente empleadas para la elaboración de sidra son Royal Gala, Red Delicious y Golden Delicious (dulces), Jonathan (semiácida) y Granny Smith (ácida).

No existen datos actualizados, sin embargo, considerando la estimación de la producción nacional antes indicada, se observa que el consumo *per capita* actual no podría superar el litro por habitante por año.

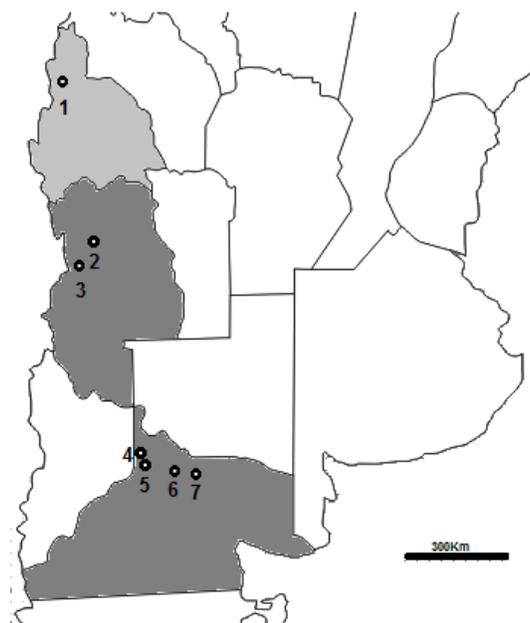


Figura 1: Localización de las principales sidreras de la Argentina. De la provincia de San Juan: **1:** Zona de Calingasta. De la Provincia de Mendoza: **2:** Vista Flores. **3:** Valle de Uco. De la Provincia de Río Negro: **4:** Cipolletti. **5:** Allen. **6:** General Roca. **7:** Villa Regina.

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 capita* 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, alcanza 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 picos 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.

A nivel nacional el sector debería apuntar 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 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).

2. EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA SIDRA

2.1. Materia prima

El jugo o mosto de manzana, y en menor proporción de pera, obtenidos por molienda y prensado de sus respectivas frutas frescas, constituye la materia prima de la cual se parte para la elaboración de la sidra. En general, el jugo de manzana tiene una densidad media de 1.050 gL⁻¹ con un contenido medio de 800 gL⁻¹ de agua, 110 gL⁻¹ de azúcares (en promedio, 74% fructosa, 15% sacarosa y 11% glucosa) o su equivalente 10,5 % m/m (°Brix), sustancias ácidas, mayoritariamente ácido L (-) málico seguido de los ácidos shiquímico y quínico, que le confieren al mosto una acidez media de 3,5 gL⁻¹ (expresada como ácido málico), pectina soluble (polímeros del ácido galacturónico esterificados con metanol), nitrógeno soluble (mayoritariamente representado por los amino ácidos asparagina, aspártico y glutámico), minerales, vitaminas y enzimas en disolución (Beech, 1972b; Johansen, 2000). Adicionalmente, la manzana y los productos industriales derivados de ella (jugos y sidra) tienen un alto contenido de compuestos fenólicos mayoritariamente epicatequinas y proantocianidinas diméricas y triméricas y ácidos fenólicos (Mataix Verdú y Ortega Anta, 2008), los que, por sus propiedades antioxidantes, poseen probados efectos beneficiosos sobre la salud (Santos

Buelga y Scalbert, 2000; Dixon *et al.*, 2004). La calidad del jugo de manzana, y en consecuencia de la sidra, depende de la variedad, del grado de madurez y de las condiciones higiénico-sanitarias de las manzanas utilizadas (Piyasena *et al.*, 2002). El grado de madurez de la materia prima es de importancia en la elaboración de sidra ya que influye significativamente sobre el rendimiento del prensado y sobre ciertas características de la sidra como son su graduación alcohólica, acidez y contenido de compuestos fenólicos, entre otras.

El momento óptimo de maduración (madurez tecnológica) puede determinarse por métodos físicos, que evalúan la firmeza de la pulpa (penetrómetro) 4 o el contenido de sólidos solubles (°Brix), y químicos, mediante la medición del contenido de almidón o de la acidez titulable. La Tabla 1 presenta valores promedios de los parámetros orientativos del grado de madurez en manzanas Red Delicious y la relación entre los mismos. (Calvo, 2004).

Resulta de particular relevancia en la elaboración de sidras lograr un adecuado balance en los contenidos de azúcares, ácidos y taninos (Johansen, 2000; Coudray *et al.*, 2003). Respecto del mosto de pera, permitido hasta en un 10% en la elaboración de sidra por el Código Alimentario Argentino, presenta una menor acidez titulable, y como consecuencia un mayor pH, y un mayor contenido del aminoácido prolina que el de manzana (Mataix Verdú y Ortega Anta, 2008). La prolina no puede ser utilizada por las levaduras en condiciones anaeróbicas (Aranda *et al.*, 2005) por lo que el contenido de este aminoácido en la sidra es indicativo de la proporción del jugo de pera, o de su fermentado, contenido en la bebida.

Tabla 1: Madurez promedio para manzanas Red Delicious

Parámetro	Cosecha 2004		
	Temprana (19/02)	Óptima (07/03)	Tardía (28/03)
Firmeza de pulpa (Kg/cm²)	7,42	7,10	6,20
Sólidos solubles (°Brix)	10,0	10,3	10,85
Acidez titulable (g/L)	3,09	3,05	2,62
Degradación de almidón (%)	18	36	54

4 Fuente: RIA(Revista Investigación Agrícola), INTA.

<http://www.inta.gov.ar/ediciones/ria>

5 Fuente: Feippe A., Evaluación de madurez en manzanas.

<http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos>

2.2. Elaboración

Debido a su alto contenido en ácido málico, el jugo de manzana es un líquido muy cáustico y como consecuencia el equipamiento utilizado en las sidreras sólo puede estar construido con ciertos tipos de materiales capaces de resistir a la corrosión. Este hecho motivó a 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 construidos 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).

A continuación, se describen brevemente los procesos que involucran la elaboración de la sidra agrupados en procesos pre-fermentativos, fermentativos y post-fermentativos (Figura 2).

2.2.1. Procesos Pre-fermentativos

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 EEUU utilizan variedades específicas que se clasifican en tipos o bloques tecnológicos relacionados con su contenido de azúcares (hasta el 15% p/v), su acidez (0,1-1% de ácido málico), su estructura fibrosa y el contenido 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 por ejemplo una 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 polifenoles; 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, se pueden encontrar otros con características intermedias (Blanco Gomis y Mangas, 2010). En la Tabla 2 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.

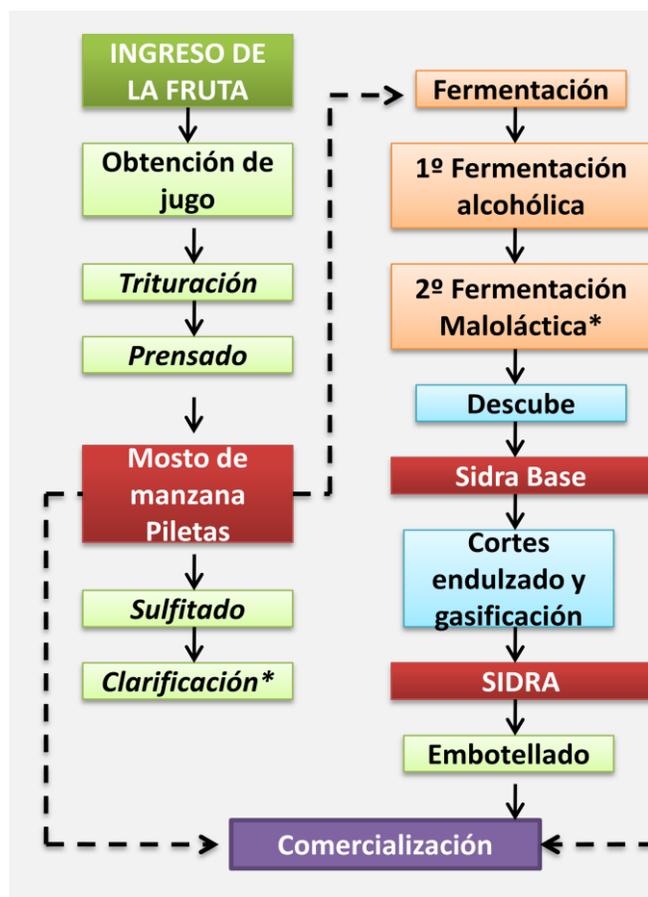


Figura 2: Esquema del proceso de producción de sidra, desde el ingreso de la fruta hasta su comercialización. En verde etapa pre-fermentativa; en naranja etapa fermentativas; en celeste etapa post-fermentativa.

**Pasos opcionales del proceso*

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 2: 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	Johnn Apple, Royal Wilding
Ácido	≥4,8	≤1,45	Granny Smith, Calville Blanc, Belle de Boskoop, Lakeland
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).

La manzana contiene además numerosos compuestos que son metabolizados por microorganismos, o transformados químicamente durante el proceso de elaboración de las sidras. Los principales compuestos presentes en la manzana se describen en la Tabla 3.

Los azúcares derivan de la fotosíntesis, mientras que los ácidos orgánicos son generados en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Como se mencionó brevemente en párrafos anteriores, el ácido málico es el principal ácido orgánico presente en la manzana, existiendo en menores proporciones otros ácidos como el ácido cítrico, isocítrico, succínico, fumárico, quínico y shikímico (Eisele and Drake, 2005).

Por lo que se refiera a los aminoácidos, hay que señalar que el 90% del total de la fracción aminoacídica está constituida por los ácidos aspártico y glutámico, la aspargina, la serina y la glutamina, siendo el ácido aspártico y glutámico los aminoácidos mayoritarios (Tabla 2) (Blanco Gomis *et al.*, 1990; Ackermann *et al.*, 1992). Las proporciones de todos estos compuestos varían con la variedad de manzana a utilizar y por consiguiente, también varía el producto final elaborado, la sidra.

Tabla 3: Composición química de la manzana (*Malus domestica*)

Nutrientes	% p/p	Nutrientes	% p/p
Azúcares		Xantofilas	
Azúcares totales (g)	10,39	Epigallocatequina(mg)	0,3
Sacarosa(g)	2,07	Flavonoles	
Glucosa(g)	2,43	Epicatequina(mg)	7,5
Fructosa(g)	5,9	Epigallocatequina-3-galate (mg)	0,2
Minerales		Luteolina (mg)	0,1
Calcio (mg)	6	Kaenferol (mg)	0,1
Hierro (mg)	0,12	Quercetina (mg)	4
Magnesio (mg)	5	Catequina (mg)	1,3
Fosforo(mg)	11	Ácidos orgánicos	
Potasio(mg)	107	Ácido málico(g)	0,3-1
Sodio(mg)	1	Ácido cítrico (mg)	5
Zinc(mg)	0,004	Ácido isocítrico (mg)	5
Cobre(mg)	0,027	Ácido succínico (mg)	1
Manganeso(mg)	0,035	Ácido fumárico (mg)	2
Fluor (µg)	3,3	Ácido quínico (mg)	1
Vitaminas		Ácido shikímico (mg)	1
ácido ascórbico (Vit C)(mg)	4,6	Aminoácidos	
Tiamina (mg)	0,017	Triptofano (g)	0,001
Riboflavina (Vit B2) (mg)	0,026	Treonina (g)	0,006
Niacina (Vit B3) (mg)	0,091	Isoleucina (g)	0,006
ácido pantoténico (B5)(mg)	0,061	Leucina (g)	0,013
Vitamina B6(mg)	0,041	Lisina (g)	0,012
Folato total (µg)	3	Metionina (g)	0,001
Folato (en comidas)(µg)	3	Cisteína (g)	0,001
Folato DFE (µg)	3	Fenilalanina (g)	0,006
Betaína (µg)	0,1	Tirosina (g)	0,001
Vitamina A (µg)	3	Valina (g)	0,012
Betacaroteno(µg)	27	Arginina (g)	0,006
Betacriptoxantina (µg)	11	Histidina (g)	0,005
Luteína+Zeaxantina(µg)	29	Alanina (g)	0,011
Vitamina E(mg)	0,18	Acido aspártico (g)	0,07
Vitamina K (µg)	2,2	Acido glutámico (g)	0,025
Ácidos Grasos		Glicina (g)	0,009
Fitoesteroles(mg)	12	Prolina (g)	0,006
Flavonoles		Serina (g)	0,01
Cianidina(mg)	1,6	Água (g)	85,56

Datos tomados del servicio de cromatografía para los alimentos USDA 2010

2.2.1.2. Ingreso de la fruta

Las manzanas que ingresan a las sidreras son volcadas en los 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.

2.2.1.2. 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 hacia un sistema de cañerías que lo transportará hasta las piletas de fermentación (Figura 3D) (Barbagelata, 2010).

2.2.1.3. Sulfitación del mosto

El SO₂ (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 and Pretorius, 2000). El acondicionamiento del mosto para dar inicio al proceso fermentativo involucra la adición de SO₂, práctica conocida como sulfitación.

2.2.1.4. Clarificación

Como paso previo al desarrollo del proceso fermentativo puede ser necesaria la realización de una clarificación del mosto, en el caso de que éste presente una elevada turbidez. El tipo de clarificación más comúnmente usado es la clarificación enzimática con pectinasas que provocan que las partículas en suspensión puedan flocular (Blanco Gomis y Mangas, 2010).



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.

2.2.2. Procesos Fermentativos

Efectuada la etapa de ajuste del SO_2 y la clarificación (optativa), el mosto es transportado a la pileta donde definitivamente se dará inicio a la fermentación primaria o alcohólica, llevada a cabo por las levaduras. 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. Respecto de la temperatura de fermentación, aspecto de relevancia para este trabajo, las fermentaciones naturales raramente progresan por debajo de los 10°C, entre 10°C y 30°C su velocidad crece linealmente con el aumento de la temperatura y entre 35°C y 40°C ésta convierte en un factor limitante del crecimiento celular. Temperaturas de fermentación elevadas (>25°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). Terminada la fermentación alcohólica y cuando la densidad del mosto es de aproximadamente 1.003 gL⁻¹ (concentración de azúcares < 2 gL⁻¹), 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 deacidificación de la sidra y de otras bebidas fermentadas, a su estabilidad microbiológica y a la complejidad de su aroma (Xu et al., 2005).

2.2.3. 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 1,025 gL⁻¹ para la sidra dulce y de 1,015 gL⁻¹ para la sidra semidulce.

3. Levaduras

Actualmente se define a las levaduras como “hongos unicelulares, ascomicetes o basidiomicetes, que se reproducen vegetativamente por brotación o fisión y que pueden o no presentar estados sexuales que no están contenidos en cuerpos de fructificación” (Kurtzman, et al., 2011). Las levaduras que presentan estadios sexuales se denominan levaduras perfectas o formas teleomórficas y a las que no los presentan levaduras imperfectas o formas anamórficas. 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. Pueden ser aisladas de ambientes terrestres, acuáticos o aéreos (Phaff and Starmer, 1987; Hagler and Ahearn, 1987; Martini, 1992; Gadanho et al., 2003; Libkind et al., 2003) incluso de ambientes extremos (Vishniac and Onofri, 2003; Russo et al., 2006), aunque en general sus hábitats preferidos son los tejidos vegetales (Martini et al., 1980; Phaff, 1993; Starmer et al., 2003). Desde el punto de vista nutricional, las levaduras son eucariotas heterótrofos quimiorganotrofos capaces de utilizar ciertos hidratos de carbono, glucosa en particular, como fuente de carbono y de energía (Gancedo and 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 *Candida*, *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 aun 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.

3.1 Ecología de levaduras asociadas al proceso de elaboración de sidra

La elaboración de sidra por el método tradicional se lleva a cabo fermentando espontáneamente el jugo de manzana. En este tipo de fermentaciones, denominadas espontáneas o naturales, el proceso fermentativo es conducido por las levaduras naturalmente presentes en el mosto. Estas levaduras, denominadas indígenas, proceden de la superficie de las manzanas y del equipamiento de las sidreras (Vidrih y Hribar, 1999; Johansen, 2000; Morrissey *et al.*, 2004; Romano *et al.*, 2006). Aún cuando levaduras del género *Saccharomyces* son generalmente las predominantes durante la fermentación alcohólica, otras especies denominadas en conjunto no-sacaromicéticas también participan del proceso espontáneo, fundamentalmente en los estadios iniciales del mismo (Salih *et al.*, 1988; Cabranes, 1994; Michel *et al.*, 1998; Morrissey *et al.*, 2004; Suárez Valles *et al.*, 2007a).

En este tipo de fermentaciones, la etapa inicial está dominada por levaduras de bajo poder fermentativo como las pertenecientes a los géneros *Hanseniaspora (Kloeckera)*, *Candida* y *Metschnikowia* y en menor extensión, *Kluyveromyces* y *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 UFCmL⁻¹ durante los primeros 2 a 3 días de fermentación y a partir del estadio medio de la misma sus poblaciones comienzan a declinar hasta desaparecer. A partir de ese momento, cepas de levaduras con alto poder fermentativo pertenecientes al género *Saccharomyces*, y mayoritariamente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, comienzan a dominar a la fermentación (1×10^7 - 1×10^8 UFC m/L) y la conducen hasta su finalización. En los últimos años, estudios ecológicos sobre dinámica de poblaciones utilizando técnicas de biología molecular, las cuales permiten discriminar levaduras al nivel de cepa, han puesto en evidencia que además, una gran diversidad de cepas de *S. cerevisiae* participan del proceso fermentativo (Cabranes *et al.*, 1990; Dueñas *et al.*, 1994; le Quéré and Drilleau, 1996; Coton *et al.*, 2006; Suarez-Valles *et al.*, 2007a). Similares hallazgos han sido reportados para algunas especies no-sacaromicéticas en las etapas iniciales (Kurtzman *et al.*, 2011).

Las levaduras pertenecientes a la especie *S. cerevisiae* seguida de *Kloeckera apiculata*, y *Saccharomyces ludwigii* se han descrito como predominantes en la elaboración de sidras en Inglaterra (Beech, 1972b) mientras que en Francia éstas correspondieron a *S. cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* y *valbyensis* y *Metchnikowia pulcherrima* (Salih *et al.*, 1988; le Queré y Drilleau, 1996; Laplace *et al.*, 1998). En España así como en Irlanda se han descrito a *S. cerevisiae* y *K. apiculata* (Cabranes, *et al.*, 1990, 1996 y 1997; Dueñas, *et al.*, 1994; Morrissey *et al.*, 2004). También otras especies de los géneros *Saccharomyces*, como *S. bayanus*, y *Hanseniaspora*, *H. osmophila* y *H. uvarum*, han sido aisladas como mayoritarias en sidras asturianas (Suárez Valles *et al.*, 2007a) y ciertas especies de *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Brettanomyces* y *Hansenula*, se han hallado asociadas a este proceso fermentativo en diferentes países europeos, aunque en mucha menor extensión (Johansen, 2000; Suárez Valles *et al.*, 2007a). En particular, levaduras procedentes de la superficies de la sidrera y pertenecientes a los géneros *Dekkera/Brettanomyces* se han reportado como dominantes durante la fase de maduración tanto en sidras francesas como irlandesas (Le Quere y Drilleau, 1996; Morrissey *et al.*, 2004).

Adicionalmente, el advenimiento de métodos moleculares que permiten discriminar entre individuos de una misma especie, como el análisis del polimorfismo en los tamaños de los fragmentos obtenidos por restricción del ADN mitocondrial con endonucleasas específicas (ADNm-RFLP) y métodos basados en técnicas de PCR (RAPD, microsátélites, minisátélites, secuencias δ , AFLP) (para revisión ver Fernández-Espinar *et al.*, 2005), han revelado una complejidad adicional dentro de la biota indígena de levaduras asociadas a la elaboración de bebidas fermentadas. La variabilidad interna y la dinámica de las poblaciones de levaduras, *S. cerevisiae* en particular, asociadas a fermentaciones espontáneas se ha caracterizado mayoritariamente en vinos (Frezier y Dubordieu, 1992; Vezinhet *et al.*, 1992; Schütz y Gafner, 1993; Versavaud *et al.*, 1993 y 1995; Querol *et al.*, 1994; Constantí *et al.*, 1998; Sabate *et al.*, 1998; Gutiérrez *et al.*, 1999; Esteve-Zarzoso *et al.*, 2001; Torija *et al.*, 2001; Lopes *et al.*, 2002 y 2007; Rainieri *et al.*, 2003; Cocolin *et al.*, 2004; Schuller *et al.*, 2005; Legras *et al.* 2005) y en menor proporción en sidras (Masneuf *et al.* 1998; Naumov *et al.*, 2001; Suárez Valles *et al.*, 2007b). Estos estudios han permitido establecer que cada especie de levadura puede estar a su vez representada por diferentes cepas o individuos con

características metabólicas particulares y que el perfil ecológico de la fermentación, y por ende la calidad del producto final, queda determinado por las diferentes especies y cepas de levaduras que se establecen sucesivamente durante el proceso fermentativo.

Numerosos factores como la localización geográfica, condiciones climatológicas, calidad de la materia prima (variedad, integridad física, grado de madurez), prácticas culturales de campo, métodos de recolección y acopio de los frutos (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) y las prácticas que se llevan a cabo en la misma antes (Mangas *et al.*, 1996) y durante el proceso fermentativo (Dueñas *et al.*, 2002; de la Roza *et al.*, 2003) afectan la extensión y diversidad de levaduras participantes del proceso y por lo tanto la calidad del producto final. También otros factores propios del proceso fermentativo pueden afectar la biota inicial y la evolución de las diferentes especies y cepas de levaduras durante el transcurso de la fermentación natural.

3.2. *Saccharomyces*

3.2.1 Características generales

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 seis aisladas de hábitats naturales (*S. arboricolus*, *S. cariocanus*, *S. eubayanus*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* y *S. paradoxus*) (Kurtzman and Robnett, 2003; Wang and Bai, 2008; Naseeb *et al.*, 2017; Libkind *et al.*, 2011). De las dos aisladas en ambiente de fermentación, *S. cerevisiae* es la especie más ampliamente difundida en procesos de fermentación alcohólica. 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).

3.3 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 (starter) que permite realizar un control microbiológico del proceso, mediante la normalización de la biota participante.

Evidentemente, el cultivo iniciador no puede ser una levadura cualquiera, 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.

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 and Saller, 1951), canadienses (Adams, 1953; 1954) y americanos (Castor, 1953) y se extendió rápidamente a otras zonas vitivinícolas como Australia, Nueva Zelanda y Sud Africa (Rainieri and Pretorius, 2000; Pretorius, 2000). Sin embargo, a pesar de los aparentes beneficios de su uso, algunos productores o elaboradores de bebidas fermentadas son reacios a su utilización.

La crítica más importante es que las 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 vitivinícola particular (Querol and Ramón, 1996). Usualmente la selección ha estado orientada a cepas de la especie *S. cerevisiae*. Sin embargo la

imposibilidad de reunir en una sola cepa todos los atributos metabólicos que permitan obtener bebidas con la complejidad aromática de las obtenidos por fermentaciones naturales, ha llevado a extender la selección a otras especies de *Saccharomyces* y particularmente a especies de levaduras del género, a híbridos entre diferentes especies del género adaptadas a diferentes condiciones ambientales y a levaduras no-sacaromícéticas como parte de cultivos iniciadores mixtos (Soden et al., 1998; Rainieri and Pretorius, 2000; Romano et al., 2003).

La especie *S. uvarum* es reportada como una especie con propiedades fermentativas destacables para ser usada como cultivo iniciador, se destaca principalmente por producir una alta concentración de glicerol alcoholes superiores y esterres 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).

3.4 La importancia de la biodiversidad de levaduras

El origen de la producción primitiva de pan y cerveza estuvo muy relacionada, ambos alimentos se obtienen a partir de distintas proporciones de dos ingredientes principales, los cereales y el agua. Las levaduras salvajes están y estaban presentes en el medio ambiente, suponemos que su utilización en la fabricación de pan y cerveza fue en principio accidental ya que la fermentación era desconocida y sus efectos se asociaban a la presencia de algo divino y mágico. Lo cierto es que en un momento determinado las técnicas adoptadas por los egipcios para fabricar estos alimentos aseguraban indirectamente la presencia de este maravilloso microorganismo.

Los microorganismos son el grupo de seres vivos menos conocido y con más potencialidad para el sector agroalimentario. Las levaduras están fuertemente ligadas al desarrollo y evolución de la civilización, siendo componentes fundamentales en la elaboración de alimentos tan antiguos como el pan, la cerveza o el vino. Las primeras civilizaciones las utilizaban empíricamente para elaborar sus alimentos, existiendo citas que

datan su utilización desde fechas tan tempranas como 7000 a. C. en China (McGovern et al., 2004) o 3150 a. C. en Egipto (Kurtzman y Fell, 1998; Cavalieri et al., 2003).

Durante los últimos años, su potencial metabólico ha sido explorado extensamente, conduciendo al empleo de levaduras como verdaderas “factorías metabólicas”, y convirtiéndolas en un foco de interés tanto para la comunidad científica como para las industrias farmacéuticas, químicas y alimenticias. Dentro de estas últimas se encuentra la industria vitivinícola.

Se utilizan como fuente de aromas naturales y condimentos en industria alimentaria, como probióticos en la industria de nutrición y salud tanto humana como animal, como fuente de ingredientes en la industria cosmética, en la industria de protección y fertilización de cultivos, etcétera. Las levaduras juegan también un importante papel en la llamada química verde, especialmente en lo relacionado con la producción de biocombustibles de segunda generación.

La importancia de conocer y conservar la biodiversidad microbiana, y el creciente uso de microorganismos en la biotecnología, han contribuido a reconocer el valor que tienen las colecciones de cultivos Microbianos en la preservación de los recursos genéticos. El manejo y conservación de una colección de microorganismos son tareas exigentes, que requieren conocimientos no sólo de los propios microorganismos, sino también de sus condiciones de crecimiento y preservación, de sus propiedades y posibles aplicaciones.

Destacar por último el importante papel que la levadura ha jugado desde hace años en innumerables proyectos de investigación bioquímica, especialmente en investigación de la evolución de la vida en la tierra y en investigación genética, ya que el genoma de la levadura se conoce desde el año 1996 y esto ha sido imprescindible para el descubrimiento del genoma humano y de otras especies.

Es realmente increíble como un ser unicelular que está presente en nuestro planeta desde hace millones de años, ejerce un papel tan beneficioso e importante para la vida de millones de personas. Además desempeña este papel de una forma natural, discreta y precisa que no deja de tener algo de mágico y divino como pensaban los antiguos egipcios.

En este trabajo, no solo permitirá ampliar el conocimiento de la ecología y biodiversidad de levaduras fermentativas asociada a distintas variedades de manzana de la

zona del Alto Valle sino que además permitirá evaluar el efecto de la temperatura y el cambio de escala sobre la diversidad de levaduras. Este novedoso estudio permitiría impulsar, una mayor protección y concientización, de la importancia estos ecosistemas nativos, al uso sustentable de los recursos naturales, y desde el punto de vista económico su posible aplicación biotecnológica para mejorar la calidad bebidas fermentadas.

Hipótesis

La temperatura de fermentación y la variedad de manzana, influyen sobre la biota de levaduras que interviene en la elaboración de sidras realizadas de manera espontánea, afectando asimismo la calidad final de los productos obtenidos.

Objetivo general

Evaluar el efecto de la temperatura y la variedad de manzana empleada sobre la biodiversidad de levaduras presentes durante la elaboración de sidras regionales por fermentación espontánea.

Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de la temperatura de fermentación sobre la diversidad de levaduras durante la elaboración de sidras regionales a partir de un mismo sustrato (mosto).
2. Evaluar el efecto del uso de diferentes variedades de manzana sobre la biota de levaduras presentes durante la elaboración de sidras regionales.
3. Identificar las levaduras de cada etapa del proceso.

MATERIALES

1. Material biológico

Se utilizaron dos variedades de mostos de manzanas sin fermentar o fermentados naturalmente de dos Sidreras del Alto Valle de Río Negro.

2. Soluciones para análisis microbiológico

-Antiséptico: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (metabisulfito de sodio), Una vez que los mostos llegaron al laboratorio se les adiciono 30 mg/L del antiséptico utilizado en las sidras para reducir la microbiota total, de manera de reproducir en el laboratorio las condiciones de sidrera.

-Solución antibiótica: Trifamox (Amoxilina – Sulbactam) 1500 Unidades (Laboratorio Bagó S.A.). Se preparó por disolución de una ampolla en 300 mL de agua destilada estéril, conservándose a -4°C hasta su uso. Se agregó 0,1 mL de esta solución por cada 10 mL de medio de cultivo, para prevenir el desarrollo bacteriano.

-Solución de glicerol al 20% v/v.

3. Medios de cultivo

Medio GPY-agar (p/v): 0,5 % extracto de levadura, 0,5 % peptona, 2 % glucosa, 2% agar.

Medio Agar-agar acetato (McClary) : 0,1 % glucosa, 0,18% cloruro de potasio, 0,25 extracto de levadura, 0,1% acetato de sodio y 0,15% de agar-agar.

Medio GPY-caldo (p/v): 0,5 % extracto de levadura, 0,5 % peptona, 2 % glucosa.

4. Reactivos utilizados en los estudios moleculares

4.1. Soluciones

-Solución 1 (400 mL): 372,27 mL sorbitol 1M y 72,72 EDTA mL 0,5M.

-Solución 2 (400 mL): 20 mL de Tris-HCl 1M, 16 mL de EDTA 0,5M y H₂O destilada c.s.p. 400mL. Ajustar a pH 7,4 y autoclavar.

-Acetato de potasio, AcK (5M/3M): a 60 mL de una solución de AcK 5M se añadió ácido acético glacial hasta pH 4,8 y se llevó a 100 mL con H₂O destilada.

-Solución reguladora TBE: 45 mM Tris-Borato, 1 mM EDTA, pH 8.

4.2. Enzimas y reactivos

- La Zimoliasa 20T utilizada fue provista por US Biological, y se utilizó resuspendida en Solución 1 (2mg/mL).
- Las endonucleasas de restricción *CfoI*, *HaeIII*, *Hinfl* fueron suministradas por Thermo Scientific.
- La Taq ADN polimerasa, cloruro de magnesio (ClMg_2), los cebadores ITS1 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) y los nucleótidos (dNTPs) fueron provistos por Promega.
- Los marcadores de peso molecular de 100-bp y 50-bp fueron provistos por Genbiotech.
- La agarosa fue provista por Genbiotech.
- El agua milliQ utilizada fue de Sintorgan®.
- El Gel Red fue de la marca por Biotum.
- El Sorbitol fue provisto por Anedra.

5. Soluciones y Kits comerciales usados para las determinaciones fisicoquímicas

- Kit enzimático Glicerol método UV. Cat. N° 10148270035. R-Biopharm. Roche®, para determinación de glicerol en sidra.
- Kit enzimático Glucosa método UV. LOT 140508-4 – Megazyme para determinación de glucosa y fructosa.
- Solución de NaOH 0,1 N
- Solución de NaOH 0,5N
- Solución de fenolftaleína al 0,5 % m/v.
- Estándares usados en Cromatografía Gaseosa (GC): Los estándares utilizados fueron adquiridos en Sigma-Aldrich, excepto el 1-propanol, acetato de etilo, 1-butanol, metanol que fueron adquiridos en Merck y el alcohol bencílico marca DR. EHRENSTORFER.
- Estándares para cromatografía Líquida de alta performance (HPLC): Los estándares de ácidos málico, shikímico, cítrico, láctico y acético fueron adquiridos en Sigma-Aldrich.

6. Equipamiento

- Centrífuga refrigerada de alta velocidad Sorvall RC 5C Plus
- Centrífuga Eppendorf 5424
- Shaker Arcano, TS-2000A, VDRL
- Vortex/Mixer, Labnet
- Microscopio Nikon Eclipse 80i
- Autoclave tipo chamberland marca VZ 50litros
- Espectrofotómetro Rayto RT-2100C
- Balanza RADWAG, PS510/C/1
- Refractómetro
- Cámara de flujo laminar vertical
- Equipo de destilación para medir etanol y acidez volátil
- pH-metro
- Microscopio Nikon Eclipse 80i
- Estufa de esterilización
- Estufa con control de temperatura

MÉTODOS

1. Fermentación

1.1. Escala de laboratorio

La fermentación se realizó en frascos de vidrio de 1L de capacidad por duplicado para cada temperatura (13°C y 25°C). Los frascos se llenaron con aproximadamente 0,8 L de mosto de manzana recolectados de piletas de fermentación. Posteriormente los mostos se llevaron al laboratorio, y se le agregó $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (metabisulfito de sodio), antiséptico utilizado en las sidras con el objetivo de reducir la microbiota total, de manera de reproducir en el laboratorio las condiciones de sidrera. Los frascos se cerraron con tapones de algodón, y se incubaron a 13°C y 25°C.

En todos los casos la evolución de la cinética de fermentación, se controló diariamente por la medición de los grados Brix.

1.2. Recolección de muestras

Las muestras se tomaron en frascos de vidrio estériles de un litro de capacidad, por duplicado y a una altura de $\frac{3}{4}$ partes de la base de las piletas. Los muestreos se realizaron en tres estadios diferentes del proceso fermentativo: inicial (concentración de sólidos solubles igual a 12 - 13 °Brix o su equivalente a 7 - 8° Bmé), medio (7 °Brix o su equivalente 3-4° Bmé) y final (5 °Brix menor de 1° Bmé). A escala de laboratorio las muestras se colectaron por pipeteo de 5 mL de mosto a una altura de $\frac{3}{4}$ partes de la base del frasco, por duplicado. Previamente a los muestreos el contenido de los fermentadores se homogenizó por agitación suave.

2. Aislamiento de levaduras durante el proceso de elaboración de sidra

El aislamiento de levaduras procedentes de los mostos se realizó por el método de diluciones sucesivas de la muestra y siembra por diseminación en superficie placas de agar GPY adicionadas con cloranfenicol (200 mg/L) para prevenir el desarrollo bacteriano. En todos los casos las siembras se realizaron por duplicado y las placas se incubaron durante 48-72 horas a la temperatura de fermentación correspondiente hasta franco desarrollo de las colonias.

3. Caracterización e identificación de levaduras

3.1 Métodos convencionales

3.1.1. Caracterización macroscópica (colonias) y microscópica (células vegetativas)

A partir de cada mosto, y en cada estadio de fermentación (inicial, medio y final) se aislaron levaduras de placas de GPY. Considerando las características macroscópicas, relacionadas con el color, forma y texturas de cada colonia, etc.; como así también según forma de la célula observada al microscopio.

3.1.2. Esporulación

Se llevó a cabo en placas de Petri adicionadas con 20 mL de agar acetato (agar McClary). Las placas fueron sembradas con las levaduras de cada mosto, se incubaron a 25°C durante 7 – 10 días. A partir del séptimo día el material fue examinado por observación microscópica directa de los preparados en fresco y así verificar la formación de esporas.

3.2. Caracterización a nivel molecular de levaduras

La caracterización molecular y comprobación de los genomas de las especies aisladas se realizó mediante métodos molecular que se describen a continuación.

3.2.1. Extracción de ADN

Metodología A-Extracción con Zymoliasa

Las cepas de *S. cerevisiae* se cultivaron en un tubo Eppendorf conteniendo 1mL de medio GPY a 30°C sin agitación durante la noche y se procedió a la extracción del ADN de acuerdo al siguiente protocolo propuesto por Querol et al. (1992), con modificaciones.

1. Centrifugar los cultivos a 2500 g durante 5 min.
2. Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 1 mL de agua destilada estéril y centrifugar nuevamente en las condiciones anteriores. Este paso se repite una vez más para lavar bien el sedimento de células.
3. Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 500 µL de la Solución 1.
4. Añadir 30 µL de una suspensión de Zimoliasa (1 mg/mL; 20000 U/g) y homogeneizar bien la suspensión con ayuda de una micropipeta.

5. Incubar durante 20 minutos a 37°C.
6. Centrifugar a 10000 g durante 1 min. y descartar el sobrenadante.
7. Resuspender el sedimento con ayuda de una pipeta automática en 500 µL de Solución 2.
8. Añadir 13 µL de una solución de SDS al 10% y agitar en *vortex*.
9. Incubar a 65°C durante 5 min.
10. Añadir 200 µL de acetato potásico 5M/3M y dejar en hielo durante 5 min.
11. Centrifugar las muestras a 20800 g durante 15 min a 4°C.
12. Mantener las muestras en hielo y transferir el sobrenadante a otro tubo Eppendorf (700 µL aproximadamente). Conservar durante 15 min a -20°C.
13. Centrifugar nuevamente a 20800 g durante 15 min a 4°C y esta vez el sobrenadante se transfiere a un tubo Eppendorf con 700 µL de isopropanol. Agitar suavemente y dejar a temperatura ambiente durante 10 min.
14. Centrifugar a 15300 g durante 15 min.
15. Descartar el sobrenadante y lavar el sedimento con 500 µL de etanol al 70%.
16. Centrifugar a 15300 g durante 3 min.
17. Sacar el alcohol con ayuda de una bomba de vacío y evaporar los restos del alcohol a 37°C durante 15 min aproximadamente.
18. Una vez seco resuspender el sedimento en 20µl de agua MQ.
19. Conservar las muestras a -20°C hasta su utilización.

Metodología B: Extracción por frío-calor

Las levaduras se desarrollaron en placas tortas (divididas en 6 casilleros) con medio GPY a 26 °C durante 48 – 72 horas. La extracción del ADN se realizó siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

1. Cargar el triángulo de levadura en un tubo con 300 µL de agua MQ o bf de lisis. Resuspender bien (*vortex*) y colocar en el freezer a -80°C durante 1 hora.
2. Transcurrido ese tiempo pasa las muestras INMEDIATAMENTE a agua a 100°C durante 10 minutos (de ser posible colocar los tubos en el freezer en el mismo "rack" que se va a usar en el baño a 100°C).
3. Homogenizar con *vortex* suave y centrifugar a 13000 rpm- 5 min.
4. transvasar el sobrenadante a otro tubo. Agregar el mismo volumen de cloroformo-isoamílico (24:1) (300 µL aprox.), agitar suavemente con la mano y centrifugar a 13000 rpm- 5 min.

5. Recoger el sobrenadante (parte superior) (sin tomar nada de la capa intermedia) y colocarlo en otro tubo.
6. Agregar 300 μL de isopropanol (para precipitar ADN), agitar suavemente con la mano y dejar 10 min. A temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 13000 rpm- 10 min. Descartar sobrenadante.
8. Sin resuspender, agregar 500 μL de alcohol 70% sobre el precipitado.
9. Centrifugar 13000 rpm- 5 min. y descartar sobrenadante.
10. Repetir dos veces paso 8 y 9.
11. Sacar el alcohol remanente con una pipeta, sin tocar el precipitado. Terminar de sacar el precipitado en la estufa a 50-60°C (pellet se pone transparente o queda blanco y se despega del tubo).
12. Agregar 50-60 μL de agua mQ (el volumen de agua mQ a adicionar depende del precipitado que se obtenga). Colocar el freezer durante 10 min. y luego resuspender el precipitado.

3.2.2. Secuenciación del dominio D1/D2 para caracterización de especies

La identificación de las levaduras se realizó por el método de secuenciación del dominio D1/D2 perteneciente a rDNA 26S (Kurtzman, 2003)(Figura 4). Para ello se realizó la extracción del ADN total de las colonias aisladas utilizando el protocolo de extracción de ADN total desarrollado previamente.

Posteriormente se realizó la amplificación por PCR del dominio D1/D2 perteneciente a rDNA 26S (Kurtzman y Robnett, 2003) utilizando los cebadores *nl1* (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) y *nl4* (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG). La amplificación se realizó de la siguiente manera: Se resuspendieron 2 μL de ADN diluido (1/20) en 18 μL de la mezcla de amplificación conteniendo 0,16 μL de solución acuosa 50 μM de cada cebador, 1,6 μL de una solución acuosa 1 mM de deoxinucleótidos (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), 0,8 μL de MgCl_2 (25 mM), 4 μL de solución reguladora para *Taq* ADN polimerasa (1X), 11,2 μL de agua destilada estéril y 0,1 μL de *Taq* ADN polimerasa (1 U/ μL). Los parámetros del termociclador fueron: un ciclo de desnaturalización (95°C por 5 min), luego 35 ciclos de tres pasos, desnaturalización (94°C por 1 min), hibridación (55,5°C por 2 min) y extensión (72°C por 2 min) y por último un ciclo de extensión (72°C por 10 min).

Los amplicones obtenidos se separaron en geles de agarosa al 1,5 % m/v, con solución reguladora TBE 1X. La electroforesis se realizó a voltaje constante (90 V). Luego, los geles se tiñeron con *Gel Red 5000X* (0,3 µL/mL) y se revelaron bajo luz ultravioleta (UV). Como marcador de peso molecular se utilizó una escala de fragmentos de ADN de 100 pb.

Una vez evidenciada la correcta amplificación las muestras, los amplicones se purificaron utilizando los kits de purificación de marca Bioneer Inc (Korea) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. La secuenciación se realizó utilizando el servicio de MacroGen (Korea) y las secuencias obtenidas como se compararon con las disponibles en la base de datos de NCBI utilizando BLASTn. Para identificar las especies se compararon con las cepas tipo más cercanas disponibles en la base de datos del NCBI.

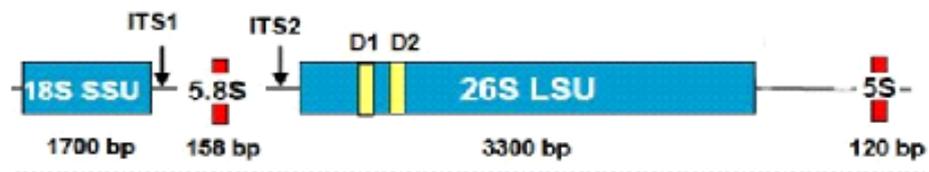


Figura 4: Esquema de la organización de los genes ribosomales

3.2.3. Identificación de especies del género *Saccharomyces*

Debido a que el análisis de la secuencia del dominio D1/D2 no permite diferenciar entre las especies hermanas *S. uvarum* y *S. eubayanus*, se procedió a la caracterización por RFLP-PCR de seis genes nucleares: *BRE5*, *CAT8*, *CYC3*, *GALA*, *MET6*, *EGT2* utilizando las enzimas de restricción *Hinf I*, *Msp I*, *Hinf I*, *Taq I*, *Asp I* y *Hinf I* respectivamente, siguiendo la metodología propuesta por Perez-Tráves et al. (2014) y Rodriguez et al. (2017). La misma se resumen a continuación:

La amplificación se realizó siguiendo la misma metodología detallada en el punto 3.2.3 para el dominio D1/D2, los cebadores fueron los utilizados por Perez-Tráves et al. 2014. Los productos de PCR se digirieron con la endonucleasa de restricción respectiva para cada gen a 37°C con excepción de la digestión llevada a cabo con la enzima *Taq I* que se realizó a 60°C (temperatura óptima de digestión de esta enzima) todas *over night*. Los

amplicones, como también los fragmentos de restricción obtenidos se separaron en geles de agarosa al 1,5 %m/v y 3 %m/v respectivamente, con solución reguladora TBE 1X. La electroforesis se realizó a voltaje constante (90 V). Luego, los geles se tiñeron y revelaron de la misma forma que se detalló en el punto 6.2.

Los perfiles RFLP-PCR obtenidos se compararon con los descriptos por Pérez-Través et al., (2014) y Rodríguez et al., (2017) para identificar las especies del género *Saccharomyces*.

4. Índice de Biodiversidad

El índice de Biodiversidad de Shannon-Weaver H' (Shannon y Weaver, 1964) se calculó siguiendo la ecuación:

$$H' = - \sum_{i=1}^R p_i \ln p_i$$

Donde p_i es la abundancia relativa ($\frac{n_i}{N}$), N es el número total de individuos y n_i es el número total de individuos de cada especie.

5. Determinaciones fisicoquímicas

5.1. Glucosa, Fructosa y Glicerol

Los compuestos químicos glucosa, fructosa, glicerol y etanol se determinaron por cromatografía líquida HPLC (en el laboratorio de Cromatografía del PROBIEN, CONICET-UNCo) utilizando el equipo Agilent 1260 (Quat Pump VL, ALS, TCC) con detector RID 55°C. La fase estacionaria se llevó a cabo con una columna HIPLEX H (300 x 7,7 mm) y la fase móvil se realizó por gradiente isocrático (100 % H₂SO₄ 0,001 M Flujo: 0,4 ml/min). Las muestras fueron filtradas con filtros de nylon 0,22 µm e inyectadas directamente (20 µL) en la columna cromatográfica. Las soluciones estándar fueron de pureza HPLC mayor a 99,8 % provistas por SIGMA. Los valores calculados para cada muestra fueron el resultado de dos medidas.

5.2. Etanol

La concentración de etanol en las fermentaciones de 1L se determinó por destilación de la muestra (volumen: 200 mL), previamente neutralizada con NaOH 5 N (7500 µL) y

con el agregado de antiespumante (2000 μ L). La valoración del contenido alcohólico del destilado se realizó con densímetro a 20°C y se expresó como % v/v de etanol o su equivalente en grados alcohólicos Gay Lussac (°GL).

5.3. Acidez volátil (AV)

La determinación se efectuó mediante titulación de las muestras obtenidas con destilación por arrastre de vapor en solución con 0,1 N de NaOH, utilizando fenolftaleína como indicador. Los resultados se expresaron en gL-1 de ácido acético (Ribéreau – Gayón et al., 1989).

5.4. Sólidos solubles

Se determinó por refractometría a 20°C utilizando un refractómetro de mano marca ICOSA-OPTIC. Los resultados se expresaron en °Brix (% m/m).

5.5. pH

Se determinó empleando pH-metro (Oakton) con electrodo de pH rango de 0 a 14. Previo a cada medición, el equipo se calibró utilizando soluciones estándar para calibración de pH 4 y pH 7 a 20°C.

6. Métodos estadísticos

Se utilizaron análisis estadísticos inferenciales para modelar las cinéticas de fermentación, análisis descriptivos multivariados y análisis de varianza para comparación de diferentes variables. A continuación, se describe cada uno de ellos.

6.1. Modelos mixtos no lineales

Los datos obtenidos de grados Brix en las fermentaciones, como así también los datos de evolución del contenido de glucosa y fructosa se modelaron utilizando modelos mixtos no lineales. Se evaluaron diferentes modelos según la naturaleza de los datos para cada caso en particular.

Las ecuaciones utilizadas fueron las siguientes:

* *Ecuación exponencial de decaimiento* (Arroyo-Lopez, et al., 2009):

La función que describe el modelo es la siguiente:

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

Donde: Y es el porcentaje de glucosa, fructosa o grados Brix (de acuerdo al caso) presente en el medio, t es el tiempo en horas, D es el valor específico cuando t tiende al infinito, S es el valor estimado de cambio y K es la constante cinética (h-1) (Tronchoni, et al.,2009).

En la Figura 5.A se muestran los parámetros descriptos, siendo el valor D la asíntota inferior, en este caso representa el valor en el que se estabilizó la fermentación, ya sea en grados Brix o concentración de glucosa y fructosa (gL-1). El valor S, representa para este análisis la caída o disminución del sustrato, a mayor caída hay mayor consumo de azúcares por parte de la levadura. Por último, el valor K (h-1) representa la tasa de consumo del sustrato.

* *Ecuación sigmoidea de decaimiento parametrizada por Gompertz, previamente usada por Lambert and Pearson 2000.*

$$Y=A+C*\exp(-\exp(K*(t-m)))$$

Donde: Y es el porcentaje de sustrato todavía presente en el mosto, t es el tiempo en horas, A es la asíntota inferior cuando t tiende a infinito, K es una constante cinética (h-1), C es la distancia entre la asíntota superior y la inferior, y M es el tiempo en el punto de inflexión (Tronchoni et al., 2009). En la Figura 5.B se representan estos parámetros. Los ajustes se realizaron utilizando el paquete *nlme* (descrito inicialmente por Pinheiro et al., 2009).

6.2. Análisis de datos fisicoquímicos

Se realizaron comparaciones entre medias para los datos fisicoquímicos utilizando el método de Análisis de la Varianza de una vía (ANOVA) y Test de Tukey

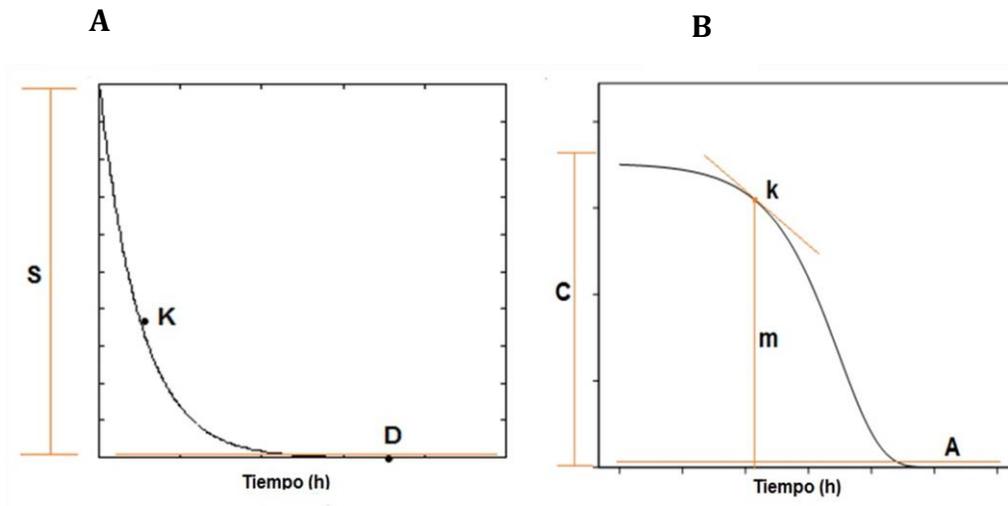


Figura 5: Parámetros obtenidos en las diferentes curvas de decaimiento de sustrato. A: Ecuación exponencial. B: Ecuación sigmoide.

de diferencia significativa honesta (HSD), utilizando un α : 0,05. La normalidad en la distribución de los datos se evaluó utilizando el Test de Lilliefors y la homocedasticidad de las varianzas con el Test de Cochran, Hartley y Barlett. Todos estos análisis se realizaron utilizando el software STATISTICA 7.0 Stat Soft Inc.

6.3. Análisis multivariado

Para analizar múltiples variables cuantitativas (físicoquímicas y cinéticas) evaluadas en las fermentaciones se utilizaron gráficos de caras de Chernoff que permite ilustrar tendencias en los datos en relacionan a rasgos de una cara, de modo que se puede diferenciar entre observaciones. Estos gráficos se realizaron utilizando el programa estadístico Rstudio con el paquete “aplpack” (R core Team, 2013).

RESULTADOS

El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto de la variedad de manzana y la temperatura de fermentación sobre los parámetros cinéticos y la dinámica de levaduras asociadas a procesos fermentativos realizados de manera espontánea durante la elaboración de sidras patagónicas.

Las fermentaciones se llevaron a cabo utilizando dos mostos de manzana no estériles variedades Granny Smith (GS) y Red Delicious (RD), ambos provenientes de la cosecha 2014. Las fermentaciones se realizaron en frascos de 1L conteniendo 800 mL de mosto a 13°C y a 25°C y por duplicado. El seguimiento de las fermentaciones se realizó mediante medición de grados Brix y en los estadios iniciales, medios y finales de las fermentaciones se analizó la biota de levaduras asociada. A continuación, se exponen los principales resultados obtenidos.

1. Cinética de fermentación

Los parámetros cinéticos de una fermentación son de interés enológico debido a que brindan información importante acerca de cómo ocurrió el proceso: la duración de la fermentación, la velocidad de la misma y si hubo o no una parada de fermentación. A su vez, la evolución de una fermentación está íntimamente relacionada con la biota de levaduras presente en el jugo de manzana y con la temperatura a la que se desarrolla el proceso. Por este motivo, se evaluó el comportamiento cinético por medición diaria de los °Brix de todas las fermentaciones realizadas. Las mismas se dieron por finalizadas cuando no se observó cambio en la concentración de azúcares residuales siendo en todos los casos menores a 1,5 g/L.

Se utilizaron dos modelos matemáticos diferentes para ajustar los datos observados durante la fermentación, el modelo de decaimiento Sigmoideo (Lambert y Pearson, 2000) y el modelo de decaimiento exponencial (Arroyo-Lopez et al., 2009). Los datos observados en las fermentaciones llevadas a cabo a 13°C se ajustaron al modelo de decaimiento sigmoideo mientras que los datos observados en las fermentaciones realizadas a 25°C se ajustaron al modelo de decaimiento exponencial. En todos los casos el ajuste fue adecuado ya que siempre la proporción de la variancia explicada por el

modelo (R2) respecto de los datos experimentales resultó ser mayor a 0,99 (Tabla 4). Estos resultados evidencian que el modelo al cual se ajustaron los datos experimentales observados en las fermentaciones estuvo asociado a la temperatura de fermentación y no de la variedad de manzana utilizada (Tabla 4).

Tabla 4 Parámetros cinéticos de las fermentaciones espontáneas.

Temperatura		13°C *		25°C **	
Parámetros	Red Delicious	Granny Smith	Parámetros	Red Delicious	Granny Smith
A (°Brix)	4,95±0,48	5,12±0,32	D (°Brix)	4,51±0,68	4,69±0,94
C	8,84±2,05	8,92±1,34	S	9,54±2,12	9,34±1,23
K (°Brix.h⁻¹)	0,0112±0,0002 ^b	0,0045±0,0003 ^a	K (°Brix.h⁻¹)	0,01±0,0001 ^b	0,009±0,0001 ^a
M (h)	244,58±17,54 ^a	477,67±12,87 ^b		-	-
R2	0,995	0,998		0,987	0,994

Los superíndices en la misma fila indican diferencias significativas (ANOVA y test de Tuckey n=2) evaluados por temperatura.

*Función de decaimiento sigmoideo o Gompertz modificado, usado previamente por Lambert y Pearson (2000)

** Función de decaimiento exponencial, usados previamente por Arroyo-López et al., (2009)

Las fermentaciones llevadas a cabo a 13°C presentaron una cinética diferencial, llegando a sequedad a los 22 y 30 días en los mostos RD y GS respectivamente. Por otra parte, se observó que la fermentación realizada en mosto RD evidenció la mayor tasa de consumo de azúcares (parámetro K) y el menor tiempo requerido para consumir el 50% de los mismos (parámetro M) (Tabla 4). En contraste, las fermentaciones llevadas a cabo a 25°C presentaron una cinética muy similar independientemente del mosto, finalizando la fermentación a los 22 días en ambos casos. No obstante, se observaron diferencias significativas en la tasa de consumo de azúcares (K), siendo más elevada en las fermentaciones realizadas en RD que en el mosto GS (Tabla 4).

En la Figura 6 se representan en líneas continuas las curvas estimadas por el modelo y con puntos los datos experimentales observados, además las líneas punteadas representan el tiempo en el que se dio por finalizada la fermentación. En la misma puede observarse con claridad la diferencia en la forma de los dos tipos de curvas (sigmoidea y exponencial) y la marcada diferencia entre las cinéticas de las fermentaciones llevadas a cabo a 13°C en GS y RD.

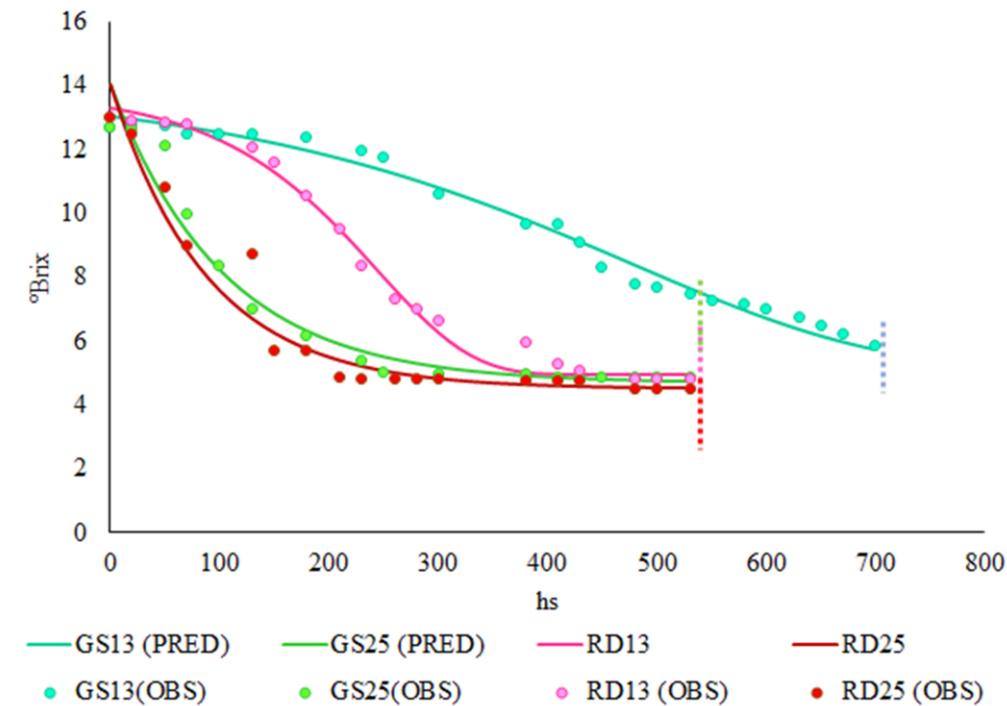


Figura 6. Cinética de Fermentación en mosto Red Delicious (RD) y Granny Smith (GS) a dos temperaturas de fermentación (13°C y 25°C). En líneas continuas se representan los datos predichos por el modelo (PRED) y los puntos representan las mediciones de °Brix (OBS).

2. Características fisicoquímicas de sidras

El análisis de las propiedades fisicoquímicas de las sidras obtenidas reveló, tal como se mencionó previamente, que todos los productos finales alcanzaron la sequedad evidenciando concentraciones de azúcares residuales (glucosa + fructosa) menores a 1,5 g/L. Además, se observó un consumo preferente de glucosa por sobre el de fructosa, evidenciándose aproximadamente el doble de fructosa como azúcar residual en todas las sidras base (Tabla 5).

En cuanto a la concentración de azúcares residuales y a la de glicerol no se observaron diferencias significativas, independientemente del tipo de mosto de manzana y la temperatura de fermentación, detectándose valores medios de $0,43 \pm 0,12$ g/L, $1,06 \pm 0,29$ g/L y $3,77 \pm 0,75$ g/L de glucosa, fructosa y glicerol respectivamente (Tabla 5).

Respecto a las concentraciones de etanol, los mayores valores se observaron en las sidras base producidas en mosto Granny Smith a 25°C y los menores valores en el mismo tipo de mosto pero fermentado a 13°C. Este resultado evidencia la influencia de la temperatura de fermentación sobre la producción de etanol. No se observó el mismo efecto sobre la concentración de etanol en las sidras base elaboradas con mosto Red Delicious (Tabla 5).

Por último, e independientemente del tipo de mosto, las fermentaciones realizadas a 13°C evidenciaron los valores más bajos de acidez volátil, parámetro que es un reflejo de la concentración de ácido acético producto del metabolismo microbiano. Los valores de pH, que están directamente relacionados a los valores de acidez volátil se condicen con los resultados descriptos previamente, siendo significativamente mayores en las fermentaciones realizadas a 25°C que en aquellas realizadas a 13°C (Tabla 5).

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de las sidras base obtenidas.

Propiedades fisicoquímicas	Fermentaciones a 13°C		Fermentaciones a 25°C	
	Red Delicious	Granny Smith	Red Delicious	Granny Smith
Glucosa (g/L)	0,43±0,14	0,42±0,17	0,48±0,02	0,39±0,09
Fructosa (g/L)	1,09±0,09	1,24±0,27	0,91±0,26	1,02±0,37
Glicerol (g/L)	4,04±0,35	3,35±0,36	4,12±0,021	3,59±0,75
Etanol (%v/v)	6,72±0,11 ^{ab}	5,49±0,29 ^a	6,57±0,37 ^{ab}	7,41±0,38 ^c
pH	3,3±0,1 ^a	3,3±0,0 ^a	3,5±0,1 ^b	3,4±0,0 ^{ab}
Acidez Volátil (g/L)	0,19±0,01 ^a	0,21±0,04 ^a	1,1±0,29 ^c	0,41±0,02 ^b

Los superíndices en la misma fila indican diferencias significativas (ANOVA y test de Tuckey n=2) evaluados por temperatura, en aquellos valores donde no se colocó superíndice indica que no hay diferencias significativas.

Con la información de las propiedades fisicoquímicas y las características cinéticas de las cuatro fermentaciones analizadas -exceptuando el parámetro cinético M que no es comparable en las cuatro fermentaciones- se construyó un gráfico de Chernoff para cada fermentación. Estos gráficos permiten comparar de forma visual las características de los productos. En este gráfico se observa que, en líneas generales, las fermentaciones llevadas a cabo a 25°C son mucho más homogéneas, interpretado por el parecido de los rostros,

esto se debe principalmente a la elevada acidez volátil que presentaron ambas fermentaciones (estructura de cara) y a la similitud en los tres parámetros cinéticos de fermentación, representados en el ancho de ojos, alto y ancho de pelo. Mientras que, en las fermentaciones llevadas a cabo a 13°C, se observó una mayor heterogeneidad, aportada principalmente por las diferentes concentraciones de glicerol, fructosa y etanol, tres variables en la que no se observaron diferencias significativas, pero si diferencias en valores absolutos que son resaltadas en los estadísticos que utilizan los gráficos de Chernoff. Además, existe una notable diferencia en la cinética de fermentación, principalmente en el parámetro K que se mencionó previamente (Figura 7).

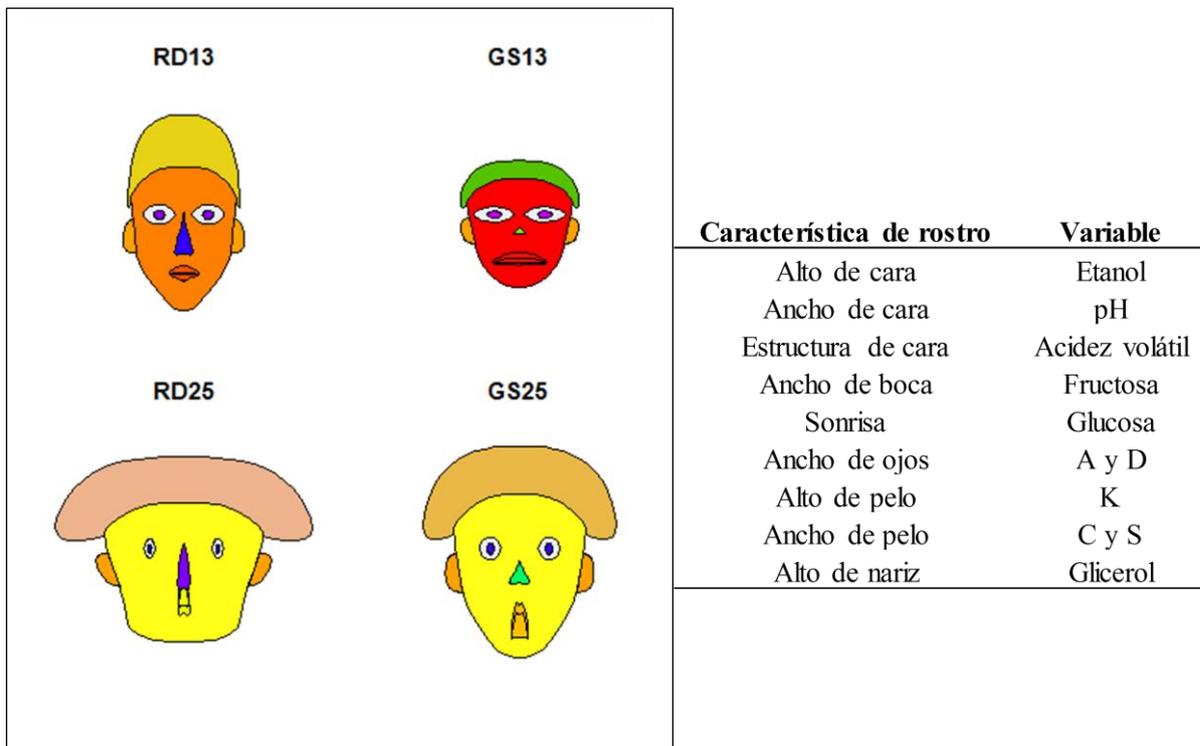


Figura 7 Gráfico de Chernoff para las variables cinéticas y fisicoquímicas de las cuatro fermentaciones analizadas; Red Delicious (RD), Granny Smith (GS), 13°C y 25°C.

Todas estas variables interpretadas juntas reforzaron lo mencionado previamente; que las temperaturas de fermentación influyeron más en las propiedades cinéticas y fisicoquímicas que el tipo de mosto utilizado. Además, este análisis nos permitió interpretar que las fermentaciones llevadas a cabo a 13°C fueron las que mayor

heterogeneidad evidenciaron. Dada esta notable diferencia entre las fermentaciones, resultó de gran interés analizar la biota de levaduras presente a lo largo de cada uno de los procesos, a fin de detectar posibles asociaciones entre la misma y las condiciones de fermentación (mosto y temperatura).

3. Aislamiento e identificación de las levaduras

La evolución de una fermentación natural puede estar influenciada por diferentes factores físicos (temperatura de fermentación, pH, etc.), químicos (concentración de azúcares, nitrógeno, etc.) y biológicos. Dentro de estos últimos encontramos a los microorganismos que naturalmente se encuentran asociados al proceso de elaboración de sidra. Como ya se ha descrito, las levaduras son las que cumplen el rol central en fermentación alcohólica, ya que transforman los azúcares en etanol y dióxido de carbono, así como en cientos de metabolitos secundarios que contribuyen a las características organolépticas y sensoriales de la sidra. A lo largo de la fermentación alcohólica natural ocurre una sucesión de especies y cepas de levaduras que, dependiendo de cómo sea el tipo y proporción de cada una, afectan a la cinética de la fermentación de un año a otro aun cuando se utilice para fermentar el mismo varietal de manzana. Conocer la biota de levaduras asociada a una fermentación tiene importantes beneficios tanto desde el punto de ecológico como del biotecnológico.

Con el objetivo de estudiar la biota de levaduras y evaluar el posible impacto sobre esta del sustrato (dos varietales diferentes) y la temperatura de fermentación (13°C y 25°C) se tomaron muestras de los diferentes mostos en los estadios iniciales, medios y finales de fermentación. A partir de cada muestra se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en placas que contenían GPY-agar, un medio de cultivo completo que es frecuentemente utilizado para el recuento total de levaduras en estudios de biodiversidad ya que permite el desarrollo de todas las especies de levaduras cultivables presentes en los sustratos a estudiar. Estos tipos de medios presentan ciertas limitaciones cuando las muestras contienen poblaciones de levaduras de diversas especies en diferentes proporciones; en estas circunstancias, colonias de las especies prevalentes dominan la placa y evitan el desarrollo de aquellas que, aunque estén presentes, se encuentran en

menor proporción. No obstante, el uso de medios completos sigue siendo actualmente lo más aceptado para este tipo de estudios ya que brindan un panorama de la diversidad existente que más se asemeja a la realidad.

3.1. Características macroscópica y microscópica

A partir de las placas de aislamiento de GPY, se realizó una caracterización visual macroscópica de las colonias (color, aspecto, textura, etc) como microscópica de la célula vegetativa proveniente de cada tipo colonia (forma, tamaño, etc). Esta primera aproximación metodológica nos permitió armar grupos de levaduras con características morfológicas similares y que posteriormente fueron aisladas e identificadas a nivel de género y especie por métodos moleculares.

Los estadios iniciales de ambos mostos (RD y GS), estadio común de las fermentaciones realizadas a 13°C y 25°C, se caracterizaron por presentar una amplia variedad de colonias con distintas características en cuanto al color, morfología y textura, observándose colonias crema brillante, blanca opaca chata, blanca rugosa, naranja lisa brillante, etc. (Figura 8-A).

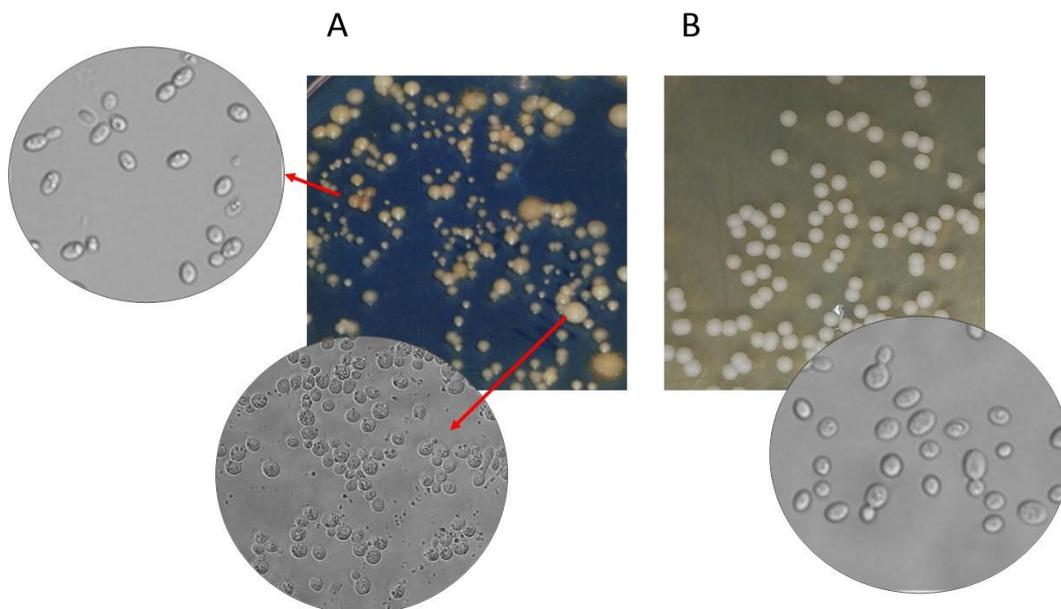


Figura 8: Ejemplo de algunas colonias y células (400X) de levaduras aisladas a partir de mosto de manzana Red Delicious. A) Levaduras no-*Saccharomyces*, B) *Saccharomyces*.

Mientras que los estadios medios y finales de fermentación se caracterizaron por la homogeneidad de sus colonias, así como de sus células, la mayoría de estas presentaron un aspecto macro y microscópico típico de levaduras sacaromícéticas, tal como se puede observar en la (Figura 8-B). Adicionalmente, se evaluó la capacidad de esporular de todos aislados de estadios medios y finales. Los aislados que esporularon evidenciaron ascas típicas del género *Saccharomyces* sp (Figura 9).

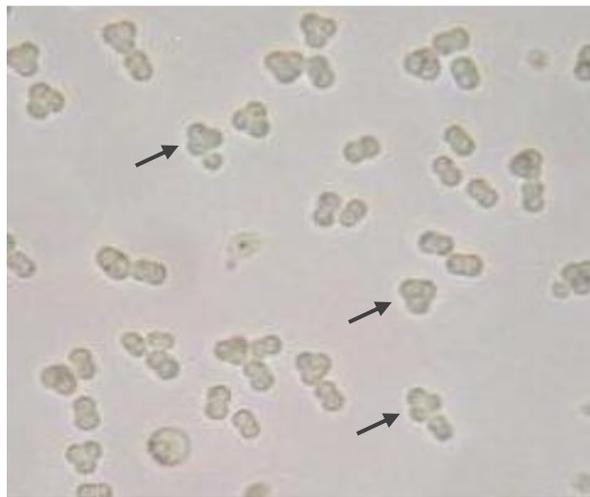


Figura 9: Observación microscópica (400x) de ascas con esporas en preparado fresco. La muestra corresponde a un aislamiento de estadio final de fermentación en mosto Red Delicious.

3.2. Caracterización a nivel molecular

Tradicionalmente, la identificación de especies de levaduras se ha basado en aspectos morfológicos y en características fisiológicas (Barnett et al., 1990). Actualmente, los métodos moleculares basados en el polimorfismo de los ácidos nucleicos constituyen una mejor alternativa a los métodos tradicionales, ya que, al no depender del estado fisiológico de la célula, son más reproducibles. Además, poseen otras ventajas como la elevada precisión y discriminación, así como su rapidez y sencillez en la realización.

En la actualidad la técnica más utilizada y aceptada para la tipificación de levaduras a nivel de especie es la secuenciación de regiones ribosómicas del ADN como los

dominios D1 y D2 situados en el extremo 5' del gen 26S correspondiente al ADN ribosomal.

La caracterización morfológica y fisiológica realizada en este trabajo permitió realizar una primera agrupación del tipo de levaduras provenientes de cada fermentación. Posteriormente, se seleccionaron entre 2 y 4 colonias de cada grupo para realizar la determinación a nivel de especie por secuenciación del dominio D1/D2 del gen ribosomal 26S. Los electroferogramas (Figura 10.A) obtenidos para cada levadura fueron analizados por *BLAST Nucleotide (Basic Local Alignment Search Tool-BLASTn*, NCBI) (Figura 10.B). A nivel de especie se identificaron solo aquellas secuencias que presentaron un porcentaje de identidad mayor o igual al 98% con una única especie en la base de NCBI. Las secuencias que presentaron un porcentaje de identidad menor o igual al 97% con la cepa tipo más cercana disponible en la base de datos se indicó únicamente a nivel de género. Lo mismo para algunos aislamientos que presentaron un porcentaje de identidad del 99% con dos o más especies de levaduras, como los identificados como *Vishniacozyma*, que presentó 99% de similitud con dos especies diferentes: *V. victoriae* y *V. tepherensis* (Tabla 6). Situación similar se observó entre los aislamientos que presentaron el mismo porcentaje de similitud (100%) con las especies hermanas *S. uvarum* y *S. eubayanus* (Tabla 6).

La diversidad de especies encontradas para los estadios iniciales, medios y finales de cada fermentación se detallan en la Tabla 6. Además, en esta se incluyó el índice de Biodiversidad H' de Shannon and Weaver (1964), calculado para cada mosto en los diferentes estadios y temperatura de fermentación, con el objetivo de evaluar si hubo una pérdida de la biodiversidad al avanzar la fermentación y si las temperaturas de fermentación influyeron en esta. La mayor biodiversidad fue detectada en los estadios iniciales de fermentación, independientemente del mosto, siendo mayor en mosto GS que en RD (1,41 vs 1,16) (Tabla 6). Este estadio estuvo representado solo por especies no-sacaromicéticas, encontrándose a *Hanseniaspora guilliermondii* y *Pichia kluyveri* (78%) como especies mayoritarias en el mosto RD y a *Vishniacozyma sp.* y *Yamadazyma mexicana* (69%) en el mosto GS (Tabla 6). Excepto *Pichia kudriavzevii*, que fue detectada en el estadio inicial y final de las fermentaciones en mosto RD a 25°C, ninguna de las

especies no-sacaromycéticas del estadio inicial fue detectada en estadios avanzados de la fermentación (Tabla 6).

En los estadios medios y finales la biodiversidad decreció independientemente del tipo de mosto y de la temperatura de fermentación. La mayor reducción de los índices de biodiversidad se observó en las fermentaciones llevadas a cabo a 25°C, específicamente en los estadios medios, identificándose solo dos especies a 25°C (versus seis especies diferentes en las fermentaciones a 13°C) (Tabla 6). Estos estadios (medios y finales) estuvieron gobernados principalmente por levaduras fermentativas del género *Saccharomyces*, en mostos GS fermentados a ambas temperaturas, así como en mostos RD fermentados a 25°C se observó predominancia de la especie *S. cerevisiae*. No obstante, en los mostos RD fermentados a 13°C se identificó a la especie criotolerante identificada como *S. uvarum/S. eubayanus* como predominante con un porcentaje de 61% de implantación (Tabla 6). Resulta interesante mencionar que la especie *S. cerevisiae* también fue aislada en este mosto, sin embargo, la misma se encontró en muy baja proporción.

Debido al gran valor biotecnológico que podrían tener las especies criotolerantes *S. uvarum* y *S. eubayanus* en sidras, se decidió avanzar en la identificación de las mismas a fin de conocer específicamente de qué especie se trataba. Para ello se realizó la amplificación y posterior digestión con enzimas de restricción (PCR-RFLP) de seis genes nucleares *BRE5*, *CAT8*, *CYC3*, *GAL4*, *MET6*, *EGT2*, para las 55 colonias identificadas como *S. uvarum/S. eubayanus*. El análisis de los perfiles de restricción de estos aislados permitió confirmar que todos los aislamientos correspondieron a la especie *S. uvarum*. En la Figura 11 se representan como ejemplo los perfiles de RFLP-PCR de los genes *CAT8* y *CBT1* digeridos con las enzimas de restricción *Msp* I y *Hae* III, respectivamente.

Tabla 6: Especies de levaduras detectadas en fermentaciones realizadas con mosto Granny Smith y Red Delicious a 13°C y 25°C

Mosto de manzana	Especies	Estadio de fermentación y temperatura					% Identidad ^a	Cepa tipo ^b
		Inicio	13°C		25°C			
			Medio	Final	Medio	Final		
Red Delicious	<i>Candida boidinii</i>	-	1 (2,5%)	-	-	-	(100%)	<i>Candida boidinii</i> CBS2428 ^T
	<i>Candida californica</i>	-	2 (5%)	7 (17%)	-	-	(100%)	<i>Candida californica</i> CBS989 ^T
	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	9 (50%)	-	-	-	-	(100%)	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> CBS465 ^T
	<i>Pichia kluyveri</i>	5 (28%)	-	-	-	-	(100%)	<i>Pichia kluyveri</i> CBS188 ^T
	<i>Pichia kudriavzevii</i>	3 (17%)	-	-	-	1 (2%)	(100%)	<i>Pichia kudriavzevii</i> CBS5147 ^T
	<i>Pichia occidentalis</i>	-	-	-	-	1 (2%)	(100%)	<i>Pichia occidentalis</i> NRRL Y 552 ^T
	<i>Rhodotorula sp.</i> ^c	1 (5%)	-	-	-	-	(97%)	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CBS316 ^T
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	2 (5%)	4 (10%)	33 (75%)	44 (96%)	(99%)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS1171 ^T
	<i>Saccharomyces sp.</i> ^{d,e}	-	30 (75%)	25 (61%)	-	-	(100%)	<i>S. uvarum</i> CBS377 ^T , <i>S. eubayanus</i> CBS12357 ^T
	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	-	4 (10%)	4 (10%)	11 (25%)	-	(99%)	<i>Torulaspota delbrueckii</i> CBS1146 ^T
	<i>Torulaspota sp.</i> ^c	-	1 (2,5%)	1 (2%)	-	-	(94%)	<i>Torulaspota delbrueckii</i> CBS1146 ^T
	Total aislados	18 (100%)	40 (100%)	41 (100%)	44 (100%)	46 (100%)		
	Índice de biodiversidad H'	1,16	0,87	1,09	0,56	0,21		
Granny Smith	<i>Filobasidium sp.</i> ^e	1 (5%)	-	-	-	-	(98%)	<i>Filobasidium magnum</i> CBS140 ^T , <i>F. floriforme</i> CBS6242 ^T , <i>F. elgans</i> CBS7640 ^T
	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	2 (9%)	-	-	-	-	(99%)	<i>Hanseniaspora osmophila</i> CBS313 ^T
	<i>Papiliotrema flavescens</i>	-	9 (23%)	-	-	-	(99%)	<i>Papiliotrema flavescens</i> CBS942 ^T
	<i>Pichia kluyveri</i>	4 (19%)	-	-	-	-	(100%)	<i>Pichia kluyveri</i> CBS188 ^T
	<i>Pichia kudriavzevii</i>	-	1 (2,5%)	-	-	-	(100%)	<i>Pichia kudriavzevii</i> CBS5147 ^T
	<i>Pichia membranifaciens</i>	-	-	-	7 (16%)	18 (43%)	(99%)	<i>Pichia membranifaciens</i> CBS107 ^T
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	26 (67%)	40 (100%)	38(84%)	24 (57%)	(99%)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS1171 ^T
	<i>Saccharomycodes sp.</i> ^{c,e}	-	2 (5%)	-	-	-	(97%)	<i>Saccharomycodes ludwigii</i> CBS821 ^T
	<i>Vishniacozyma sp.</i> ^e	8 (38%)	-	-	-	-	(99%)	<i>Vishniacozyma victoriae</i> CBS8685 ^T , <i>V. tephrensis</i> CBS8935 ^T
	<i>Yamadazyma mexicana</i>	6 (29%)	-	-	-	-	(99%)	<i>Yamadazyma mexicana</i> CBS7066 ^T
	<i>Zygorulaspota sp.</i> ^c	-	1 (2,5%)	-	-	-	(95%)	<i>Zygorulaspota Florentina</i> CBS746 ^T
	Total aislados	21 (100%)	39 (100%)	40 (100%)	46 (100%)	42 (100%)		
	Índice de biodiversidad H'	1,41	0,95	0	0,43	0,68		

a- Porcentaje de identidad obtenida entre la secuencia de nucleotídica de los aislamientos de sidras y de la cepa tipo más cercana disponible en la base de datos del NCBI

b- Especies tipo más cercanas disponibles en la base de datos del NCBI

c- Aislados que presentaron un porcentaje de identidad menor del 98% con la cepa tipo más cercana indicada en la Tabla

d- La identidad de los aislados nombrados como *Saccharomyces sp* fueron posteriormente identificados como *S. uvarum* por PCR-RFLP y secuenciación de 6 genes nucleares

e- Secuencia del dominio D1/D2 región 26S rDNA que mostraron el mismo porcentaje de identidad con más de una especie tipo disponible en la base de datos del NCBI

H': Índice de biodiversidad de Shannon y Weaver (1964)

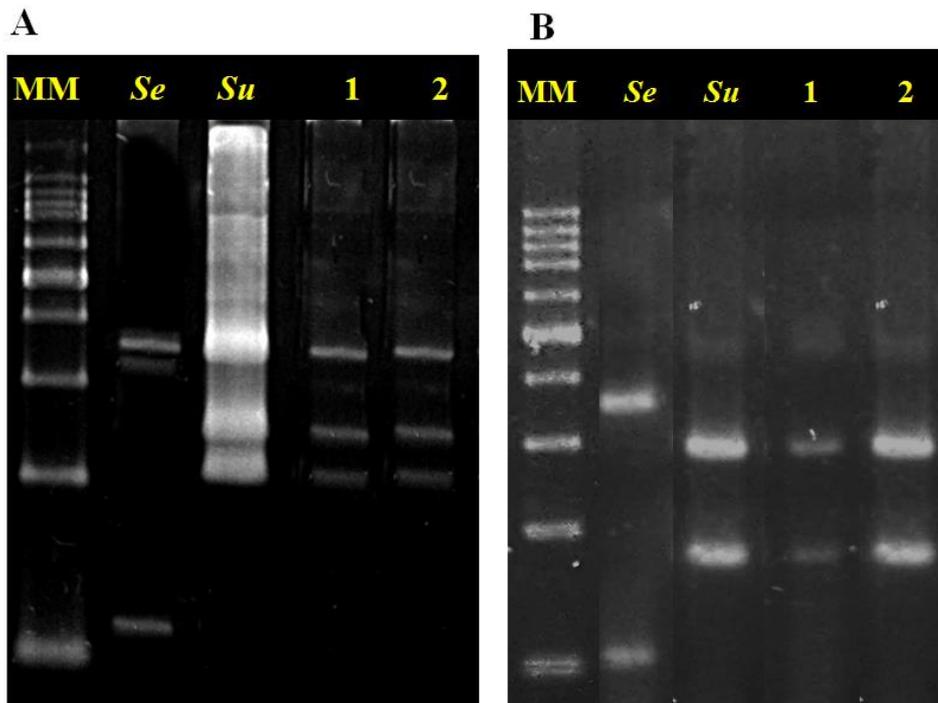


Figura 12. Perfil PFLP-PCR de cepas de *S. uvarum* aisladas en mosto Red Delicious a 13°C. A: Digestión del gen *CAT8* con enzima de restricción *Msp* I. B: Digestión del gen *CBT1* con enzima de restricción *Hae* III. MM: Marcador molecular 1000pb; *Se*: *S. eubayanus*; *Su*: *S. uvarum* 1 y 2: Colonias aisladas en mosto Red Delicious

DISCUSIÓN

La gran capacidad de competencia de *S. cerevisiae* en condiciones de fermentación, debida principalmente a su alto vigor fermentativo y a su elevada capacidad para tolerar y producir etanol (Piskur et al., 2006), ha convertido a esta especie en la dominante en la mayoría de las bebidas alcohólicas realizadas a temperatura ambiente (alrededor de 25°C) o superiores en todo mundo. Sin embargo, bajo condiciones específicas de fermentación esta especie cosmopolita comparte su nicho ecológico con otra especie del género, *S. uvarum*. Como se mencionó en la primera parte de esta Tesis, estas condiciones en las que *S. uvarum* coexiste con *S. cerevisiae* o incluso puede llegar a desplazarla, se relacionan con procesos realizados a bajas temperaturas. La levadura criotolerante *S. uvarum* ha sido aislada de procesos de vinificación (Demuyter et al., 2004; Naumov et al., 2000; Sipiczki et al., 2001), de producción de sidras (Coton et al., 2006; Suárez Valles

et al., 2007) y de chichas de manzana (Rodríguez et al., 2017) en regiones caracterizadas por las bajas temperaturas ambientales.

Basado en estos datos, y utilizando como sustrato la corteza de diferentes árboles mayormente de Europa, Sampaio y Goncalves (2008), lograron el aislamiento de cepas de las especies criotolerantes *S. uvarum* (sólo de árboles de Canadá) y *S. kudriavzevii* (sólo de árboles de Portugal) únicamente cuando las muestras se incubaron a bajas temperaturas, mientras que al usarse temperaturas superiores detectaron *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*. Este resultado evidenció la relevancia de la temperatura en la competencia entre especies de levaduras coexistiendo en un mismo sustrato. Posteriormente, Alonso-del-Real et al., (2017) analizaron específicamente la capacidad de competencia de *S. uvarum* en cultivos mixtos con *S. cerevisiae* bajo diferentes condiciones pero en ambiente de fermentación, demostrando que las bajas temperaturas (13°C) mejoran la habilidad de competencia de la especie criotolerante. Esta observación resulta coherente con los resultados obtenidos en esta Tesis, respecto del aislamiento de *S. uvarum* por primera vez a partir de una bebida industrial (sidra) en Sudamérica, utilizando bajas temperaturas de fermentación. El hecho de que a partir del mismo mosto, pero realizando la fermentación a 25°C, se pudieron aislar únicamente cepas de *S. cerevisiae*, apoya la hipótesis de que las bajas temperaturas mejoran la capacidad de competencia de *S. uvarum*.

También se pudo observar que las bajas temperaturas de fermentación influyen positivamente en la biodiversidad total de especies aisladas durante todo el proceso, evidenciado en los altos índices de diversidad H', mayores en las fermentaciones realizadas a 13°C en los dos estadios evaluados (medio y final), con excepción del estadio final de la fermentación llevada a cabo en mosto GS, donde la biodiversidad fue nula debido a que se detectó únicamente a la especie *S. cerevisiae*. De hecho, especies como *C. boidinii*, *C. californica*, *P. flavescens*, *P. kudriavzevii*, *Saccharomycodes sp*, y *Zygorulaspota sp*, fueron solamente aisladas en los mostos fermentados a 13°C. A pesar de que estas especies no han sido descritas como microorganismos criotolerantes, los cambios en las cinéticas de fermentación y en la dinámica microbiana asociadas con las bajas temperaturas de fermentación parecen ser la causa de la presencia de estas especies solo bajo estas condiciones. Este es el primer trabajo en donde se evalúa el efecto de la temperatura en la diversidad durante el proceso elaboración de sidra. Otros trabajos

sobre diversidad de levaduras en sidras utilizaron solo bajas temperaturas de fermentación (Pando Bedriñana et al., 2010; Suárez Valles et al., 2007) o simplemente no controlan este parámetro (Morrissey et al., 2004) o no especifican las temperaturas de fermentación que usaron (Coton et al., 2006).

Es interesante notar que no solo la temperatura fue decisiva para el aislamiento de *S. uvarum* y otras especies minoritarias, sino también el sustrato. La mayoría de los estudios sobre biodiversidad se realizaron utilizando una mezcla de manzanas ácidas, amargas y dulces. En esta etapa de la Tesina se utilizaron dos variedades de manzana: Granny Smith y Red Delicious. En base a la acidez y el contenido tánico la variedad Granny Smith es clasificada como una variedad ácida, mientras que Red Delicious es considerada una variedad dulce (Blanco Gomis y Mangas Alonso, 2010). Esta diferente clasificación habla sobre una clara diferencia en el sustrato que puede haber estado relacionada con la presencia de una u otra levadura. En la región Norpatagónica, estas dos variedades son destinadas al consumo fresco, sin embargo, una gran proporción de la producción total es también destinada a la industria de jugo concentrado y a la industria sidrera. Además de las diferencias antes mencionadas entre las dos variedades de manzana, y aun cuando las concentraciones de azúcares totales fueron similares en los mostos obtenidos a partir de cada una de ellas (120 y 130 g/L en mosto GS y RD, respectivamente), se evidenció una gran diferencia en la relación glucosa/fructosa. El mosto obtenido a partir de manzanas Red Delicious presentó una proporción de 0,88 mientras que el obtenido a partir de manzanas Granny Smith mostró una relación de 1,55. Esta diferencia en su composición química también podría estar relacionada con las diferencias observadas en la diversidad de levaduras. En este trabajo, *S. uvarum* fue solamente aislada de mosto Red Delicious, en donde la proporción de fructosa fue mayor a la de glucosa (aproximadamente un 53% de fructosa y un 47% de glucosa). La capacidad fructofílica de *S. uvarum* ha sido reportada previamente por varios autores (Gonçalves et al., 2000; Sipiczki et al., 2001; Tronchoni et al., 2009) y podría estar relacionada con el hallazgo de *S. uvarum* únicamente en fermentaciones en mosto Red Delicious.

Las especies minoritarias de levaduras *C. boidinii*, *C. californica*, *P. occidentalis* y *Rhodotorula* sp, fueron también detectadas únicamente en mosto Red Delicious, mientras

que *Filobasidium sp.*, *H. osmophila*, *P. membranifaciens*, *Saccharomyces sp.*, *Vishniacozyma sp.*, *Y. mexicana*. y *Zygotrulaspora sp.*, fueron únicamente detectadas en mosto Granny Smith. La mayoría de las especies identificadas en este trabajo han sido descritas anteriormente en fermentaciones de mosto de manzana en otros países incluyendo España (Pando Bedriñana et al., 2010; Suárez Valles et al., 2007), Francia (Coton et al., 2006), Irlanda (Morrissey et al., 2004) e Italia (Lorenzini et al., 2018). La mayoría de estos estudios coincide en la presencia mayoritaria de *S. cerevisiae* en fermentaciones en mostos de manzana y solo algunos de ellos reportan la presencia de otras especies del género *Saccharomyces* como *S. bayanus* (Coton et al., 2006; Morata et al., 2007; Pando Bedriñana et al., 2010). Actualmente se ha aceptado que *S. bayanus* es el nombre asignado a un grupo de cepas quiméricas compuestas por porciones de genomas pertenecientes a *S. eubayanus* y *S. uvarum* (Libkind et al., 2011). La existencia de otras cepas quiméricas en sidras fue también evidenciada después de la caracterización molecular de la levadura CID1, aislada de sidra en Francia, cuyo genoma presenta porciones de tres especies el género: *S. cerevisiae*, *S. uvarum* y *S. kudriavzevii* (Groth et al., 1999).

La detección en este trabajo de cepas de *S. uvarum* en sidras patagónicas resulta de gran relevancia biotecnológica, dado que hasta el momento solo se contaba en el país con cepas de esta especie criotolerante asociada a ambientes naturales. Seleccionar la cepa de *S. uvarum* de sidra con las mejores características fermentativas permitirá obtener sidras con gran identidad regional y características organolépticas diferenciales. Estos trabajos se encuentran actualmente en desarrollo en el laboratorio donde se realizó esta Tesina.

CONCLUSIONES

- En las fermentaciones espontáneas de mosto de manzana realizadas a 25°C, las cinéticas respondieron al modelo de decaimiento exponencial, mientras que en las realizadas a 13°C las cinéticas se ajustaron al modelo de decaimiento sigmoideo, independientemente del mosto utilizado.
- En todas las fermentaciones naturales, independientemente de la temperatura y el mosto se observó la mayor biodiversidad de especies en los estadios iniciales de fermentación, identificándose únicamente especies *no-sacaromicéticas*.
- En mosto Red Delicious fermentado a 13°C se identificó a la especie criotolerante *S. uvarum* en los estadios medios y finales, representando el primer hallazgo de esta especie relacionada a una fermentación industrial en todo el continente.
- Las cinéticas de fermentación a 25°C fueron muy similares en los dos mostos utilizados, mientras que a 13°C se observó una cinética superior en mosto Red Delicious, donde predominó la especie *S. uvarum*.

- Las fermentaciones en donde predominó la especie *S. uvarum* presentaron los valores más bajos de acidez volátil, respecto al mismo mosto a 25°C, donde predominó la especie *S. cerevisiae*.

Bibliografía

- Ackermann J., Fisher M. and 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.
- Alonso-del-real, J., Contreras-Ruiz, A., Castiglioni, G.L., Barrio, E., Querol, A., 2017a. The Use of Mixed Populations of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* to Reduce Ethanol Content in Wine : Limited Aeration , Inoculum Proportions , and Sequential Inoculation. *Front. Microbiol.* 8, 1–8.
- Aranda, A., Matallana, E. del Olmo, M. (2005) Levaduras. *Saccharomyces* I. Levaduras de primera fermentación. En: *Microbiología del vino*. Capítulo 1, pp 19-56. AMV Ediciones, Madrid. España.
- Arroyo-López F.N, Orlic S., Querol A. and Barrio E. (2009). Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *International Journal of Food Microbiology* **131**: 120–127.
- Barbagelata R.J. (2010). Ecología de levaduras asociadas a la elaboración de sidras patagónicas. Tesis de Maestría. U.N.Comahue. Facultad de Ingeniería.
- Beech F.W. (1972). Cider making and cider research: a review. *Journal of Institute of Brewing* 78: 477-491.
- Beech, F.W. (1972b). English cider making – technology, microbiology and biochemistry. In: *Progress in Industrial Microbiology*, pp. 133–213. Hocken-Hull, D.J.D. (Ed.). Churchill Livingstone, London, UK.
- Blanco Gomis D. and 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., Moran M.J., Gutierrez M.D., Moreno J., Dapena E. and Mangas J.J. (1992). Biochemical study of the ripening of cider apples varieties. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung*, 194: 33-37.
- Blanco Gomis D., Picinelli A., Gutierrez M.D. and Mangas J.J. (1990). Determination of aminoacids in apple extracts by High Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia* 29: 155-160.
- Cabranes, C., (1994). Fermentaciones espontáneas e inducidas en sidras naturales asturianas. Ph D Thesis. Spain. University of Oviedo.
- Cabranes, C., Mangas, J. J. and Blanco, D. (1996). Controlled Production of Cider by Induction of Alcoholic Fermentation and Malolactic Conversion. *Journal of Institute of Brewing* 102: 103-109.
- Cabranes, C., Mangas, J.J. and Blanco, D. (1997). Selection and Biochemical Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* Strains Isolated from Spanish Cider. *Journal of Institute of Brewing* 103: 165-169.
- Cabranes, C., Moreno, J., and Mangas, J.A. (1990). Dynamics of Yeast Populations during Cider Fermentation in the Asturian Region of Spain. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 3881-3884.
- Calvo, G. (2004). Efecto del 1-Metil ciclopropeno (1-MCP) en manzanas Red Delicious, cosechadas con tres estados de madurez y conservadas en frío convencional y atmósfera controlada. *Revista Investigación Agrícola (RIA)*. INTA Argentina 31 (3): 9-24.
- Castor J.G. (1953). Experimental development of compressed yeast fermentation starters. *Wines & Vines* **34**: 8-27.
- Cavaliere D., McGovern P.E., Hartl D.L., Mortimer R., Polsinelli M. (2003). Evidence for *S. cerevisiae* Fermentation in Ancient Wine. *J Mol Evol* (2003) 57: 226–232
- CIANI, M., I. Mannazu, P. Marinangeli, F. Clementi & A. Martini; 2004.- Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 85: 159-164.

Bibliografía

- Cocolin, L., Pepe, V., Comitini, F., Comi, G. and Ciani, M. (2004). Enological and genetic traits of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from former and modern wineries. *FEMS Yeast Research* 5: 237-245.
- Coloretti F., Zambonelli C. and Tini V. (2006). Characterization of flocculent *Saccharomyces* interspecific hybrids for the production of sparkling wines. *Food Microbiology* 23: 672-676.
- Constantí, M., Regaunt, C., Poblet, M., Zamora, E., Mas, A. and Gillamón, J.M. (1998) Molecular analysis of yeast population dynamics: effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *International Journal Food Microbiology* 41: 169-175.
- Coton E., Coton M., Levert D., Casaregola S. and 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 levadura spécifique*. *Viticulture Tourangelle* 215: 15-18.
- de la Roza, C., Laca, A., García, L., and Díaz, M. (2003). Ethanol and ethyl acetate production during the cider fermentation from laboratory to industrial scale. *Process Biochemistry* 38: 1451-1456.
- del Campo, G., Santos, J.I., Berregi, I., Velasco, S., Ibarburu, I., Dueñas, M.T. and 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., and 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.
- Dixon, R.A., Xie, D.Y., Sharma, S.B. (2004). PAs – a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist* 165: 9-28.
- du Toit M. and 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.
- Dueñas, M., Irastorza, A., Fernandez, A., Bilbao, A. and Huerta, A. (1994). Microbial Populations and Malolactic Fermentation of Apple Cider using Traditional and Modified Methods. *Journal of Food Science* 5: 1060-1064.
- Dueñas, M., Irastorza, A., Munduate, A., Santos, J. I., Berregui, I., and del Campo, G. (2002). Influence of Enzymatic Clarification with a Pectin Methylsterase on Cider Fermentation. *Journal of Institute of Brewing* 108 (2): 243-247.
- Durieux, A., Nicolay, X. and 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., William J.M., Fogarty M.W., Francis I.L., Kwiatkowski M.J., Hoj P.B. and 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. and Drake S.R. (2005). The partial compositional characteristics of apple juice from 175 apple varieties. *Journal Food Compositional Analysis* 18: 213-221.
- es/_publicaciones/guia_para_la_elaboracion_artesanal_de_sidra.pdf
- Esteve-Zarzoso, B., C. Belloch, F. Uruburu y A. Querol (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49, 329-337.
- Esteve-Zarzoso, B., Peris -Torán, M.J., García-Maiquez, E., Uruburu, F. and Querol, A. (2001). Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Applied Environmental Microbiology* 67: 2056-2061.
- Fay J.C., y Benavides J.A. (2005) Evidence for Domesticated and Wild Populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Plos Genetics* 1: 66-71.
- Fernández-Espinar, M.T., Barrio, E. and Querol, A. (2005). Identificación y caracterización molecular de levaduras vínicas. En: *Microbiología del vino*. Carrascosa A. V., Muñoz R. y González R. (Eds.). 1era Edición. Capítulo 5, pp. 148-184. AMV Ediciones. ISBN 84-87440-06-1

Bibliografía

- Frezier, V. and Dubordieu, D. (1992). Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *American Journal of Enology and Viticulture* 43: 375-380.
- Fuente Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca de Argentina:
- Gadanhho M., Almeida J., and Sampaio J.P. (2003). Assessment of yeast diversity in a marine environment in the south of Portugal by microsatellite-Primed PCR. *Antonie van Leeuwenhoek* 84(3): 217-227.
- Gamero A., Tronchoni J., Querol A. and 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. and 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.
- Giudici, P., Caggia, C., Pulvirenti, A., Restuccia, C., 1999. Cryotolerant *Saccharomyces* strains and spoilage of refrigerated musts *. *Ann. Microbiol. Enzimol.* 49, 155–161.
- Gonçalves, P., Rodrigues de Sousa, H., Spencer-Martins, I., 2000. FSY1, a Novel Gene Encoding a Specific Fructose/H⁺ Symporter in the Type Strain of *Saccharomyces carlsbergensis*. *J. Bacteriol.* 182, 5628–5630.
- González S.S., Barrio E., Gafner J. y Querol A. (2006) Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Res.* 6: 1221-1234.
- Gorter, F.A., Derks, M.F.L., Van Den Heuvel, J., Aarts, M.G.M., Zwaan, B.J., De Ridder, D., De Visser, J.A.G.M., 2017. Genomics of Adaptation Depends on the Rate of Environmental Change in Experimental Yeast Populations. *Mol Biol Evol* 34(10) 2613-2626.
- Groth, C., Hansen, J., Piskur, J., 1999. A natural chimeric yeast containing genetic material from three species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 1933-1938.
- Gutiérrez, A.R., Santamaría, P., Epifanio, S., Garijo, P. and López, R. (1999). Ecology of spontaneous fermentation in one winery during five consecutive years. *Letters in Applied Microbiology* 29: 411-415.
- Hagler A.N. and Ahearn D.G. (1987). Ecology of aquatic yeasts. In: *The Yeasts*. Vol 1. Rose, H., y Harrison, J.S. (Eds.). Segunda edición, Cap 6, pp. 181-205. Academia Press Inc. (London) Ltd., Londres, Inglaterra.
- Herrero M., Roza C., García L.A. and Díaz M. (1999). Simultaneous and sequential fermentations with yeast and lactic acid bacteria in apple juice. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology* 22: 48-51.
- http://www.minagri.gob.ar/site/desarrollo_rural/eventos_y_material_de_difusion/02_publicacion
- Johansen K. (2000). Cider Production in England and France – and Denmark? *Danbrew Ltd. A/S. Brygmesteren - NR.* 4.
- Kodama Y., Kielland-Brandt M.C. and Hansen J. (2005). Lager brewing yeast. In: Sunnerhagen P, Piškur J, editors. *Comparative Genomics: using fungi as models*. Berlin, Germany: SpringerVerlag. pp. 145-164.
- Kurtzman C.P. and Robnett C.J. (2003). Phylogenetic relationships among yeasts of the "Saccharomyces complex" determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Research* 1554: 1-16
- Kurtzman C.P., Fell J.W. and Boekhout T. (2011). *The yeasts, a taxonomic study*. fifth edition. Ed. Amsterdam: Elsevier.
- Kurtzman C.P. and Fell J.W. (1998). *The yeast. A taxonomic study*. Ediciones Elsevier Science Publications. Amsterdam. Holanda. ISBN 0-444-81312-8.
- Lambert R.J.W. and Pearson J. (2000). Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of Applied Microbiology* 88: 784–790.
- Laplace, J. M., Apery, S., Frère, J. and Auffray, Y. (1998). Incidence of Indigenous Microbial Flora From Utensils and Surrounding Air in Traditional French Cider Making. *Journal of Institute of Brewing* 104: 71-74.

- le Queré, J.M. and Drilleau, J.F. (1996). Trends in French Cider Microbiology Research, *Cerevisia Belg. Journal Brewing Biotechnology* 21: 66-70.
- Legras, J.L., Ruh, O., Merdinoglu, D. and Karst, F. (2005). Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal Food Microbiology* 102: 73-83.
- Libkind D., Brizzio S., Ruffini A., Gadanho M., Giraudo M. and Sampaio J.P. (2003). Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek* 84 (4): 313-322.
- Libkind D., Hittinger C.T., Valerio E., Goncalves C., Diver J., Johnston M., Goncalves P. and Sampaio J.P. (2011) Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lagerbrewing yeast. *PNAS Early Edition* 108: 1-6.
- Lopes, C.A., Rodríguez, M. E., Sangorrín, M., Querol, A., and Caballero, A. C. (2007). Patagonian wines: implantation of an indigenous strain of *Saccharomyces cerevisiae* in fermentations conducted in traditional and modern cellars. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34:139-149.
- Lopes, C.A., van Broock, M., Querol, A. and Caballero, A. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. *Journal of applied Microbiology* 93: 608-615.
- Lorenzini, M., Simonato, B., Zapparoli, G., 2018. Yeast species diversity in apple juice for cider production evidenced by culture-based method. *Folia Microbiol. (Praha)*. 4, 1–8.
- Mangas, J., Rodriguez, R., Moreno, J., and Blanco, D. (1996). Changes in the Major Volatile Compounds of Cider Distillates During Maturation. *Lebensm.-Wiss. u.-Technology* **29**: 357-364
- Mangas, J.J., Cabranes, C., ;premp, J., Gomis, D.B. (1994). Influence of cider-making technology on cider taste. *Lebensm.- Wiss. U- Technology* 27: 583-586
- Martini A. (1992). Biodiversity and conservation of yeasts. *Biodiversity and Conservation* 1: 324-333.
- Martini A., Federichi F. and Rosini G., (1980). A new approach to the study of yeast ecology of natural substrates. *Canadian Journal of Microbiology* 26: 856-859.
- Masneuf, I., Hansen, J., Groth, C., Piskur, J. and Dubourdieu, D. (1998). New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. *Applied Environmental Microbiology* 64: 3887-3992.
- Mataix Verdú, J. and Ortega Anta, R.M. (2008) Bebidas alcohólicas. En: Tratado de Nutrición y alimentación. Volumen 1, Nutrientes y alimentos. Capítulo 17, Agua y bebidas II. Bebidas pp 479-496. Mataix Verdú J. (Ed.). Ediciones Océano, Barcelona, España.
- McGovern P., Zhang J., Tang J., Zhang Z., Hall G.R., Moreau R.A., Nuñez A., Butrym E.D., Richards M.P, Wang C., Cheng G., Zhao Z., and Wang C. (2004). Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *PNAS* 101(51):17593-17598.
- Michel, A., Bizeau, C. and Drilleau, J. F. (1998). Flore levurienne presente dans les cidreries de l'ouest de la France. *Science Alimentes*. 8: 359-368.
- Morata, A., González, C., Suárez-Lepe, J.A., 2007. Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by selected yeasts fermenting red grape musts supplemented with hydroxycinnamic acids. *Int. J. Food Microbiol.* 116, 144–152.
- Morrissey, W.F., Davenport, B., Querol, A. and Dobson, A.D.W. (2004). The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. *Journal of Applied Microbiology* **97**: 647-655.
- Naumov, G.L., Nguyen, H.V., Naumova, E.S., Michel, A., Aigle, M. and Gaillardin, C. (2001). Genetic identification of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, a cider fermenting yeast. *International Journal Food Microbiology* 65: 163-171.
- Naseeb,S., James, S.A., Alsammar, H., Michaels, C.J., Gini, B., Nueno-Palop, C., Bond, C.J., McGhie, H., Roberts, I.N. and Delneri D., 2017. *Saccharomyces jurei* sp. nov., isolation and genetic identification of a novel yeast species from *Quercus robur*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67:2046–2052.

- Nedovic V.A., Durieux A., Van Nederveelde L., Rosseels P., Vandegans J., Plaisant A. M. and Simon J.P. (2000). Continuous cider fermentation with co-immobilized yeast and *Leuconostoc oenos* cells. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 834-839.
- Oliveira B.M, Eladio Barrio E., Amparo Querol A. and Pérez-Torrado R. (2014). Enhanced Enzymatic Activity of Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase from the Cryophilic *Saccharomyces kudriavzevii*. *Plos One* 9: (1) 1-12.
- Orlic S., Vojvoda T. and Babic K.H. (2010). Diversity and oenological characterization of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* associated with Zilavka grapes. *World Journal Microbiology Biotechnology* 26: 1483–1489.
- Pando Bedriñana, R., Querol Simón, A., Suárez Valles, B., 2010. Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. *Food Microbiol.* 27, 503-508.
- Pérez-Través L., Lopes C.A., Barrio E. and Querol A. (2014). Stabilization process in *Saccharomyces* intra- and interspecific hybrids in fermentative conditions. *International Microbiology*. 17: 213-224.
- Phaff H.J. (1993). Specific habitats of yeasts and their isolation. *USFCC Newsletter* 18(4): 11-13.
- Phaff H.J. and Starmer W.T. (1987). Yeast associated with plants, insects and soil. En: *The Yeasts*. Vol 1. Rose, H., y Harrison, J.S. (Eds.). Segunda edición, Cap. 5. pp. 123-180. Academic Press Inc. (London) Ltd., Londres, Inglaterra.
- Pinheiro J., Bates D. and Debroy S. (2009). Sarkar and the R Core Team. nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-96. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Piskur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A., Compagno, C., 2006. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends Genet.* 22, 183–186.
- Piyasena, P., Rayner, M., Bartlett, F.M., Lu X., and McKellar, 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.
- Querol A. and 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. (1992b). Dry yeast strain for use in fermentation of Alicante wines: selection and DNA patterns. *Journal of Food Science* 57: 183-185.
- Querol, A., Barrio, E. and Ramón, D. (1994). Population dynamics of natural *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation. *International Journal Food Microbiology* 21:315-323.
- R core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
- Rainieri S. and Pretorius I.S. (2000). Selection and improvement of wine yeasts. *Annals of Microbiology* 50: 15-31.
- Rainieri, S., Zambonelli, C. and Kaneko, Y. (2003). *Saccharomyces sensu stricto*: systematics, genetic diversity and evolution. *Journal Bioscience Bioengineering* 96:1-9.
- Redzepović S., Orlić S., Majdak A. and Pretorius I.S. (2002). Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian wines. *Letters Applied Microbiology* 35: 305-310.
- Ribereau-Gayon, J., Peynaud, E., Sudraud, P. and Ribereau-Gayon, P.(1989). *Ciencia y Técnicas del vino*. Tomo II. Cap VII. Ediciones Hemisferio Sur. Buenos Aires.
- Rodriguez, M.E., Pérez-Traves, L., Sangorrín, M.P., Barrio, E., Querol, A., Lopes, C.A., 2017. *Saccharomyces uvarum* is responsible for the traditional fermentation of apple chicha in Patagonia. *FEMS Yeast Res.* 17, 1–11.
- Romano, P., Capece, A., and Jespersen, L., (2006). Yeasts in Food and Beverages. In: *Taxonomic and Ecological Diversity of Food and Beverage Yeasts*, Chapter 2. Querol, A., Fleet, G.H. (Eds.). Springer-Verlag, Berlin.

- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M. and Capece A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* **86**: 169-180.
- 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.
- Russo G., Libkind D., Sampaio J.P. y Van Brook M. (2006). Levaduras del Río Agrio y el lago Caviahue, un ambiente acuático ácido y de origen volcánico (Neuquén, Argentina) Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 41 (3-4): 167-175.
- Sabaté, J., Cano, J., Querol, A. and Guillamón, J. M. (1998). Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. *Letters in Applied Microbiology* **26**: 452-455.
- Salih, A. G., Drilleau, J. F., Cavin, F. F., Divies, C. and Bourgeois, C. M. (1988). A Survey of Microbiological Aspects of Cider Making. *Journal of Institute of Brewing* **94**: 5-8.
- Santos-Buelga, C.; Scalbert, A. (2000). Review: Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutritional health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**: 1094-1117.
- Schuller, D., Alves, H., Dequin, S. and Casal, M. (2005). Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vine-yards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiology and Ecology* **51**: 167-177
- Sipiczki, M., Romano, P., Lipani, G., Miklos, I., Antunovics, Z., 2001. Analysis of yeasts derived from natural fermentation in a Tokaj winery. *Antonie Van Leeuwenhoek* **79**, 97–105.
- Soden A., Francis I.L, Gockowiak H., Lee T.H. and Henschke P.A. (1998). The use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. In *Proceedings Tenth Australian Wine Industry Technical Conference*. Ed. Blair R.J., Sas A.N., Hayes P.F. and Hoj P.B. Sydney, New South Wales, Australia. pp. 166-171.
- Starmer W.T., Schmedicke R.A. and Lachance M.A. (2003). The origin of the cactus-yeast community. *FEMS Yeast Research* **3**: 441-448.
- Suárez Valles, B., Bedriñana, R. P, Fernández Tascón, N., Querol Simón, A., and Rodríguez 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. and Querol Simón, A. (2007b). A molecular genetic study of natural strains of *Saccharomyces* isolated from Asturian cider fermentations. *Journal of Applied Microbiology* **103** (4): 778-786.
- Toriya, M.J., Rozés, N., Poblet, M., Gillamón, J.M., and Mas, A. (2001). Yeast population dynamics in spontaneous fermentation. Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek* **79**: 345-352.
- 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.
- Ulbrich M. and Saller W. (1951). Investigations of the practicality of aeration of pure cultures of commercial wine yeasts. *Rebe Wein, Ser. A. (Klosterneuburg)* **1**: 94-104.
- Versavaud, A., Courcoux, P., Roulland, C., Dulau, L. and Hallet, J. (1995). Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from wine-producing area of Charentes, France. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 3521-3529.
- Versavaud, A., Dulau, L. and Hallet, J.N. (1993). Etude écologique de la microflore levurienne spontanée du vignoble des Charentes et approche moléculaire de la diversité infraspécifique chez *Saccharomyces cerevisiae*. *Rewieus Franchais Oenologique* **142**: 20-28.
- Veziñhet, F., Hallet, J.N., Valade, M. and Poulard, A. (1992). Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification. *American Journal of Enology and Viticulture* **43**: 83-86.
- Vidrih, R., and Hribar, J. (1999). Synthesis of higher alcohols during cider processing. *Food Chemistry* **67**: 287-294.
- Vishniac, H.S. and Onofri S. (2003). *Cryptococcus antarcticus* var. *circumpolarenensis* var. nov., a basidiomycetous yeast from Antarctica. *Antonie van Leeuwenhoek* **83**(3): 231-233.

Bibliografía

- Wang S. and Bai F. (2008). *Saccharomyces arboricolus* sp. nov., a yeast species from tree bark. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 510–514.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR protocols. A guide to methods and applications*. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J., y White, T.J. (Eds.), pp. 315-322. Academic Press, San Diego, Estados Unidos.
- Xu, Y., Zhao, G., Pan, H., and 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