

## **Aprovechamiento de levadura enológicas nativas *no-saccharomyces* para su uso como agentes fermentativos en elaboración de cerveza artesanal.**

Rios-Resendiz, Y., Trejo-Márquez, M.A. \*, Lira-Vargas, A.A.; Pascual-Bustamante, S.

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Laboratorio de Postcosecha de Productos Vegetales, Centro de Asimilación Tecnológica, Jiménez Cantú s/n, San Juan Atlámica, C.P. 54729, Cuautitlán Izcalli, Edo. De México, México. \*Correo electrónico: andreatrejo@unam.mx

### **RESUMEN:**

En México la levadura de excelencia en cervecería es *Saccharomyces cerevisiae*. Paradójicamente existe una gran biodiversidad de cepas de levaduras nativas en frutos como, las presentes en las uvas vitivinícolas, las cuales se consideran *No-Saccharomyces*, estas aportan características organolépticas positivas a los vinos debido a una serie de metabolitos secundarios volátiles que producen. El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo aislar, purificar e identificar levaduras *No-Saccharomyces* a partir de desechos de industrias vitivinícolas provenientes de Querétaro y Baja California, para el uso alternativo como agentes fermentativos en cerveza artesanal. El aislamiento se llevó a cabo por medio de agotamiento por estría en placa en medios de cultivos selectivos (Agar-EYPD, Agar-Lisina, Agar-Amonio y Agar-Mosto Malta), se diferenciaron las levaduras como *No-Saccharomyces* (NS) en medio Agar-Lisina, obteniendo 14 cepas. Una vez obtenidas se evaluó la actividad enzimática mediante microfermentaciones, para elegir aquellas sobresalientes sensorialmente que presentaran atributos positivos (notas florales y/o frutales), siendo cuatro las levaduras seleccionadas; NS008, NS010, NS011 Y NS014 las cuales presentaron la capsula envolvente, su forma morfológica fue muy variada con un tamaño de célula de 0.4-0.6  $\mu\text{m}$ , siendo NS014 la que presentó mayor arranque de fermentación y NS008 una mayor producción de Ácido acético (0.48 g/L).

**Palabras clave:** Vitivinícola, cepas, cinética de fermentación, aislamiento, uvas.

### **ABSTRACT:**

In Mexico the yeast of excellence in brewery is *Saccharomyces cerevisiae*. Paradoxically, there is a great biodiversity of native yeast strains in fruits such as those present in wine grapes, which are considered to be Non-*Saccharomyces*, which contribute to the wine's positive organoleptic characteristics due to a series of volatile secondary metabolites that they produce. The objective of the present research was to isolate, purify and identify No-*Saccharomyces* yeasts from waste from wine industries from Queretaro and Baja California, for their alternative use as fermenting agents in artisanal beer. Isolation was carried out by means of platelet streaking in selective culture media (Agar-EYPD, Agar-Lysine, Agar-Ammonium and Agar-Mosto Malta), yeasts were differentiated as No-*Saccharomyces* (NS) in Agar-Lysine medium, obtaining 14 yeast. Once obtained the enzymatic activity was evaluated by means of microfermentations, to choose those salient sensorially that presented positive attributes (floral and / or fruit notes), being four yeasts selected; NS008, NS010, NS011 and NS014 which presented the wrapping capsule, its morphological form was very varied with a cell size of 0.4-0.6  $\mu\text{m}$ , with NS014 being the one with the highest fermentation start and NS008 with a higher production of acetic acid (0.48 g/L).

**Keywords:** Vitivinícola, strains, fermentation kinetics, isolation, grapes.

### INTRODUCCIÓN

En la actualidad el panorama de la cerveza artesanal en México es prometedor logrando distinguirse de las marcas industriales en cuanto a variedad y calidad, ganando aceptabilidad entre los consumidores. Lo que ha generado el aumento de la demanda de estos productos en el mercado, haciéndolo cada vez más competitivo, lo que conlleva a buscar maneras novedosas de conectarse emocionalmente con los nuevos consumidores a través de nuevas variedades y diversificación de sabores.

En México existe una limitada cantidad de cepas de levaduras para su aplicación en la elaboración de cerveza, siendo *Saccharomyces cerevisiae*, la levadura de excelencia. Paradójicamente existe una gran biodiversidad de cepas de levaduras nativas en frutos como, lo es en las uvas vitivinícolas (Carrau, 2005; Carrascosa et al., 2005). Existen investigaciones dedicadas a estudiar el aporte de las levaduras nativas, en su gran mayoría *No-Saccharomyces* sobre las características organolépticas de los vinos, ya que estas producen una serie de metabolitos secundarios volátiles (ésteres apolares que se asocian al aroma frutal, floral y fresco) y ácidos grasos que aportan atributos sensoriales beneficiosos al vino. Por otra parte, las fermentaciones espontáneas se asocian con la producción de mayor cuerpo, aroma y sabores inusuales, textura cremosa una mayor complejidad (Giorello et al., 2014; Santillán & García-Garibay, 1998; Vaina, 2011; Ortiz, 2013; Torija, 2002).

Es por ello que se propone una estrategia de búsqueda de nuevos fenotipos del sabor en la flora nativa proveniente de uvas para vinificación, así como la integración de conocimientos sobre análisis sensorial y biodiversidad natural de cepas no-*Saccharomyces*, abriendo así la oportunidad de lograr nuevas cepas de aplicación industrial en la industria cervecera, ofreciendo con ello oportunidades innovadoras para mejorar en el aroma y sabor de la cerveza, incrementando así la diferenciación de estas cervezas artesanales en un mercado cada vez más competitivo y a su vez satisfacer la demanda de nuevas alternativas del uso de agentes fermentativos en la elaboración de estas.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1.1. Sitio experimental y material biológico

Las muestras empleadas se obtuvieron de desechos de industrias vitivinícolas; orujo de una mezcla de uvas Sauvignon y Malbec y hoja de vid provenientes de los municipios de Tequisquiapan y Ezequiel Montes ubicados en el estado de Querétaro, México. Orujos de Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc y Tempranillo provenientes del estado de Baja California. Para la recolección de las muestras el orujo fue almacenado en bolsas de polietileno a  $-20^{\circ}\text{C}$ , posteriormente una parte se almacenó a temperatura de congelación ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) y a otra se le aplicó un proceso de secado a  $40^{\circ}\text{C}$  por 24 horas almacenándolo en bolsas metálicas a temperatura de  $20-25^{\circ}\text{C}$ . Para las hojas de la vid se realizó un muestreo aleatorio de los racimos y se almacenaron en bolsas metálicas a  $20-25^{\circ}\text{C}$ . Como levadura de referencia se utilizó la cepa *Saccharomyces cerevisiae*.

#### 1.2. Aislamiento de levaduras

El aislamiento se llevó a cabo por medio de agotamiento por estría en placa en medios de cultivos selectivos (Agar-EYPD, Agar-Lisina, Agar-Amonio y Agar-Mosto Malta) (Bernardi, 2013; Ortiz, 2013), aquellas colonias que crecieron sobre estos medios de cultivo que presentaron características morfológicas macroscópicas semejantes a colonias de levaduras (redondas, colores claros y textura cremosa) y homogeneidad fueron diferenciadas e identificadas.

#### 1.3. Diferenciación e Identificación de levaduras

La diferenciación e identificación se realizó mediante la adaptación de los métodos descritos por Pretorius (2000) quienes los dividen en: características de diferenciación; evaluando pureza del cultivo sobre un medio específico, características tecnológicas, los que establecen la eficiencia del proceso de fermentación (Cinética de

## Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos

fermentación, fermentación de azúcares y poder de fermentación ) y características cualitativas que ayudan a determinar la composición química y la participación en las cualidades sensoriales de los vinos (actividad enzimática y formación de ácidos a partir de glucosa) (Bernardi, 2013). La diferenciación se realizó mediante el análisis de pureza del cultivo macroscópicamente, observando el crecimiento de colonia, forma, color y homogeneidad, microscópicamente; mediante una tinción de Gram y se realizaron resiembras consecutivas en

medio Agar-Lisina incubada a 25 °C por 4 días. Considerando no-*Saccharomyces* (NS) aquellas levaduras capaces de desarrollarse después de dos siembras consecutivas sobre este medio (Ortiz, 2015; Bernardi, 2013). Para la identificación de levaduras se evaluaron las características cualitativas; realizando una adaptación en el método antes descrito, evaluando la actividad enzimática de las levaduras NS mediante microfermentaciones, considerando presencia de actividad  $\beta$ -glucosidasa al mostrar una diferenciación notable de liberación de compuestos aromáticos al finalizar la fermentación con respecto a *Saccharomyces cerevisiae* en mosto de cebada malteada lupulado de 12° Brix, gravedad específica inicial de 1.054 y pH inicial de 5.4. Tras finalizar las microfermentaciones se seleccionó mediante evaluación sensorial aquellas levaduras que presentaron atributos favorables para la obtención de cervezas con notas florales y/o frutales, para la caracterización tecnológica; realizando fermentaciones aireadas incubadas a 30°C con agitación constante en matraces Erlenmeyer de 2L adaptados con una llave para muestreo y una capacidad de mosto lupulado de 1.8 L. En cada uno de los matraces se inocularon las levaduras NS a analizar con una concentración determinada y realizaron 12 muestreos durante 5 días. Durante este periodo se evaluaron; conteo en placa PDA (NOM-111-SSA1-1994), determinación de ácidos orgánicos mediante una titulación ácido-base (NMX-V-015-NORMEX-2014), pH (NMX-F-317-S-1978), consumo de azúcares a través de la determinación de sólidos solubles totales (°Brix) ( NMX-F-103-1982), gravedad específica (López et al., 2013; NMX-V-032-S-2005) y producción de alcohol por destilación y contenido alcohólico (NMX-V-013-NORMEX-2005).

### 1.4. Análisis estadístico

Para la selección de levaduras No-*Saccharomyce* se realizará un análisis estadístico 2<sup>n</sup>, aquellos resultados que proporcionen la mejor la mejor interacción entre variables y las muestras, será la que se elija.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.5. Aislamiento de levaduras

Los medios selectivos utilizados para el aislamiento de levaduras, presentaron resultados favorables, los 4 cultivos inoculados con la muestra Hoja de uva, presentaron presencia de crecimiento diverso de colonias; bacterias, levaduras y mohos, ya que dichos medios contenían nutrientes de cadenas simples e hidrolizadas como fuente energía dextrosa, fuente proteica peptona y como suplente vitamínico extracto de levadura según el caso del medio usado, lo cual permitió la reproducción favorable de microorganismos, por su amplia gama de nutrientes disponibles (Carrascosa, 2005). A pesar de que los medios Agar lisina y amonio contienen fuente de nitrógeno más complejo esto no impidió el desarrollo de microorganismos en particular crecimiento fúngico. De forma general para esta muestra se obtuvo un crecimiento excesivo de colonias fúngicas, debido a que este tipo de muestra se encontró en contacto directo con el viento, tierra e insectos de la región (Tabla I) (Carrascosa et al., 2005; Suárez, 2002).

Los medios inoculados con orujo de uva Cabernet Sauvignon deshidratado presentaron poco crecimiento de microorganismos, debido al proceso de secado al que fue sometido, sin embargo, no todos los microorganismos son destruidos por este proceso, los que logran mantenerse es debido a diversos factores intrínsecos como; esporulación o estado vegetativo y factores ambientales que actúan durante el tratamiento térmico tales como  $a_w$ , pH, minerales, etc. Los principales microorganismos que se encontraron fueron levaduras (Tabla I).

En el caso de los medios Agar-lisina y Agar-Amonio se observó poco crecimiento de microorganismos, ya que estos tipo de medio contiene una fuente de nitrógeno más complejo y selectiva, las cepas de *Sacharomyces spp* no son capaces de utilizar la lisina y amonio como fuente de nitrógeno, ya que solo las levaduras no-*Saccharomyces*

Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos  
 pueden metabolizarlas y colonizar en estos medios sin dificultades (Bernardi, 2013).

**Tabla I.** Muestra el crecimiento de microorganismo en medios de cultivo selectivos

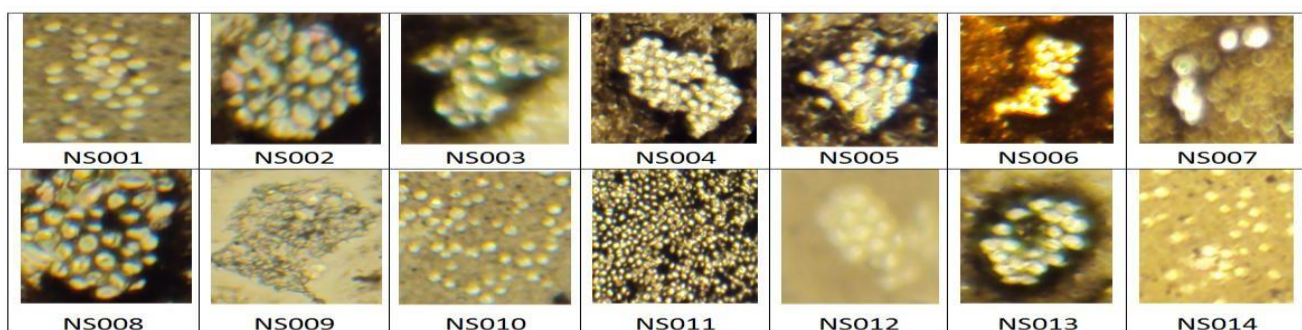


Para el caso del medio Agar-Mosto malta, en todas las pruebas inoculadas, se presentó una gran variedad de microorganismos, crecimiento fúngico de colonias amarillo intenso, blanco, verde y negras, levaduras; colonias lisas, blanca, redonda y cremosa, ya que este tipo de medio contiene una composición compleja de nutrientes; vitaminas, minerales, glucosa y fructosa, proteínas y aminoácidos, los cuales son nutrientes asimilables para cualquier tipo de microorganismo. Una vez que se llevó a cabo la purificación de las cepas por medio de agotamiento por estría en placa en medio agar lisina, se logró aislar 30 cepas de levadura.

### 1.6. Diferenciación e Identificación de levaduras

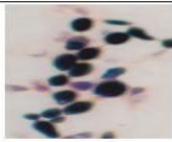
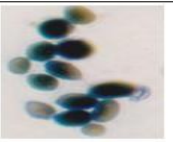
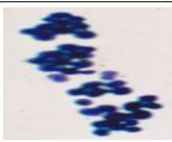
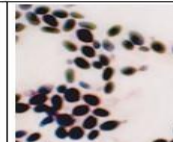
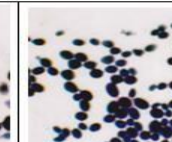
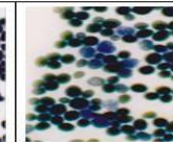
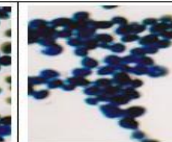
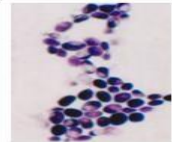
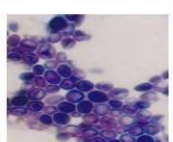
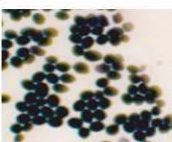
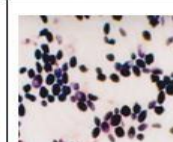
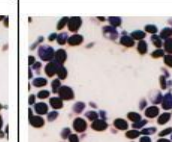
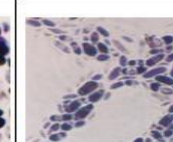
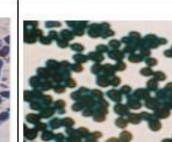
La prueba de diferenciación en medio específico Agar -Lisina permitió la identificación de las cepas de levaduras *No-Saccharomyces*, resultaron positivas aquellas que crecieron en resiembras consecutivas sobre este medio, a partir de ese momento se le asignaron las letras NS por pertenecer al género *No-Saccharomyces*, seguido de un número para poder identificarlas entre ellas, se identificaron 14 cepas representando el 46.7 % del total de aislamiento (Tabla II) (Bernardi, 2013; Ortiz, 2013).

**Tabla II.** Morfología en montaje negativo levaduras *No-Saccharomyces*



Posteriormente se evaluó la pureza del cultivo, macroscópicamente; observando el color, textura y crecimiento de colonias, presentando homogeneidad en todos los cultivos. Se confirmó la pureza, microscópicamente mediante tinción de Gram, en donde todas las cepas se comportaron como Gram positivas, debido a la composición de la pared celular de la levadura, ya que está compuesta aproximadamente el 90 % por polisacáridos (manano-proteínas y  $\beta$ - glucanos), que no son afectados por la decoloración con alcohol y/o acetona, reteniendo el colorante inicial (Rodríguez et al., 2008). Se logró observar con claridad la cápsula que envuelve a la levadura, todas las muestras presentaban la forma característica de levaduras donde algunas presentaron morfología elíptica, ovoide, esféricas y apiculada (NS011), incluso se observó algunas células en fase reproductiva (gemación), el tamaño de cada una ellas oscilaba ente 0.4-1  $\mu\text{m}$  (Tabla III).

**Tabla III.** Morfología en tinción de Gram y tamaño celular.

 NS001 0.5 $\mu\text{m}$	 NS002 0.6 $\mu\text{m}$	 NS003 0.5 $\mu\text{m}$	 NS004 0.5 $\mu\text{m}$	 NS005 0.6 $\mu\text{m}$	 NS006 0.6 $\mu\text{m}$	 NS007 0.6 $\mu\text{m}$
 NS008 0.6 $\mu\text{m}$	 NS009 0.5 $\mu\text{m}$	 NS010 0.6 $\mu\text{m}$	 NS011 0.6 $\mu\text{m}$	 NS012 0.5 $\mu\text{m}$	 NS013 1 $\mu\text{m}$	 NS014 0.4 $\mu\text{m}$

La prueba de actividad enzimática mediante micro-fermentaciones permitió identificar con actividad positiva a 11 levaduras de las 14 cepas seleccionadas como NS, tras finalizar la fermentación se procedió a realizar una evaluación sensorial para diferenciar sensorialmente la presencia de compuestos aromáticos, obteniendo actividad positiva de producción de ácido sulfúrico, ácidos orgánicos, alcoholes superiores, ésteres y aldehídos. Seleccionando solo aquellas levaduras que presentaron atributos positivos (notas florales y/o frutales), las cuales fueron NS008, NS010, NS011 y NS014, a las cuales se les realizó cinética de fermentación, poder de fermentación y fermentación de azúcares. Las cepas produjeron de 5-6° Alcohol, el consumo mayor de azúcares del mosto varío siendo: NS008 (30-48 h), NS010/ NS011 (18-48 h) y NS014 (12-36 h), lo cual es asociado a la etapa de crecimiento de la levadura (fase logarítmica del desarrollo), siendo NS014 la cepa con mayor arranque de fermentación.

## CONCLUSIONES

Dentro del aislamiento de levaduras se obtuvieron una gran diversidad de microorganismos de cada muestra. No obstante se logró aislar y purificar 30 levaduras, identificando exitosamente como *No-Saccharomyces* a 14 cepas, obteniendo células levaduriformes capsuladas, comportándose como Gram positivas, al realizar las micro-fermentaciones se pudieron elegir 4 cepas NS (NS008, NS010, NS011 Y NS014), siendo estas las levaduras *No-Saccharomyces* usadas como una alternativa de agentes fermentativos para la elaboración de cerveza artesanal a fin de confiarle estas notas al finalizar la fermentación, ofreciendo con ello oportunidades innovadoras para mejora en el aroma y sabor de la cerveza, incrementando así la diferenciación de estas cervezas artesanales en un mercado cada vez más competitivo y a su vez satisfacer la demanda.

**AGRADECIMIENTOS:** El presente trabajo se realizó con el financiamiento del Proyecto: Desarrollo Tecnológico para el Aprovechamiento Integral de Frutas y Hortalizas (PAPIIT IT201216) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bernardi, A. M. (2013). Selección de levaduras vínicas provenientes de la providencia de Mendoza, Tesina para obtener el grado de licenciada en Bromatología. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza
- Carrascosa, A.-V.; Muñoz, R.; González, R. (2005). Microbiología del vino. AMV ediciones, Madrid.
- Carrau, F.M. (2005). Levaduras Nativas para enología de mínima intervención, biodiversidad, selección y caracterización. *Agro ciencia*. (9):1 pág. 387-399.
- Giorello, F.; Martin, V., Fariña, L., Boido, E., Medina, K., Dallacassa, E., Berna, L., Aguilar, P., Gaggero, C., Carrau, F. (2014). Saccharomyces o no-Saccharomyces? Biodiversidad para incrementar complejidad sensorial. Universidad de la Republica. Facultad de Química, Montevideo, Uruguay.
- López M., Camarillo, J.M., Gómez, K.A., Becerra S. L, Peña Pérez, L.M. (2013). Medición de densidad de líquidos mediante hidrómetros y procesamiento de imágenes digitales. Memorias del XIX congreso internacional anual de la SOMIM 25 al 27 de septiembre, 2013. Pachuca, Hidalgo, México.
- NMX-F-103-1982. Alimentos. Frutas y derivados. Determinación de grados Brix.
- NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos.
- NMX-V-015-NORMEX-2014. Bebidas alcohólicas-determinación de acidez total, acidez fija y acidez volátil-métodos de prueba.
- NMX-V-032-S-2005. Bebidas alcohólicas. Determinación de densidad relativa
- NOM-111-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- Ortiz Barrera, E. (2013). Aislamiento, selección e identificación de levaduras enológicas nativas no-Saccharomyces en viñedos establecidos en Querétaro. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química.
- Rodríguez, O. M.; Pérez Quintana, M.; Bocourt Salabarría, R. (2008). Componentes de la pared de las levaduras: actividad prebiótica. Universidad de Matanzas, La Habana, Cuba
- Santillán Valverde, M. C. & García Garibay M. (1998). Biosíntesis de congenéricos durante las fermentaciones alcohólicas *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 40:109-119.
- Suarez Lepe, J.A. (1992). Microbiología enológica. 2ª Edición. Mundi-Prensa, Madrid.
- Torija Martínez, M. J. (2002). Ecología de las levaduras; Selección y adaptación a fermentaciones vínicas. Tesis para Doctora en Bioquímica. Facultad de Enología. Universitat Rovira I Virgili, Tarragona.
- Viana Garrado, F. (2011). Levaduras no-Saccharomyces para modular el aroma secundario de los vinos: incremento del Acetato 2-feniletico mediante cultivos iniciadores mixtos, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia.