

## Artículo original

# Actividad fermentativa de *Hanseniaspora uvarum* y su importancia en la producción de bebidas fermentadas

Waldir Estela Escalante<sup>a,d,\*</sup>, Mojmír Rychtera<sup>a</sup>, Karel Melzoch<sup>a</sup>, Beatriz Hatta Sakoda<sup>b</sup>, Elena Quillama Polo<sup>c</sup>, Zulema Ludeña Cervantes<sup>d</sup>, Victor Sarmiento Casavilca<sup>d</sup>, Guadalupe Chaquilla Quilca<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Institute of Chemical Technology Prague, Czech Republic. <sup>b</sup>Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Ingeniería de Industrias Alimentarias, Lima. <sup>c</sup>Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Biología, Lima. <sup>d</sup>Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac. Escuela de Ingeniería Agroindustrial–Laboratorio de Biotecnología Agroindustrial, Apurímac, Perú.

Recibido 11 de noviembre de 2010; aceptado 18 de mayo de 2011

**Resumen:** Se estudió la actividad fermentativa de *Hanseniaspora uvarum* RIVE 6-2-2 con el objetivo de evaluar su importancia en los procesos de producción de bebidas fermentadas. La cepa se cultivó en frascos Erlenmeyer conteniendo jugo de manzana esterilizado y sin aroma, y se determinaron los compuestos químicos de importancia sensorial producidos durante la fermentación en cultivo agitado (200 min<sup>-1</sup>) y estático (sin agitación). Los resultados mostraron que la cepa fue capaz de producir etanol hasta 4,02±0,1v/v% en cultivo estático a 28 °C. La agitación del medio de cultivo incrementó la producción de alcoholes superiores (hasta 488,2 mg/L) y ácido acético (468,0±10,2 mg/L) comparado al cultivo estático, mientras que por el contrario, la producción de etil acetato y glicerol (189,0±12,0 mg/L y 3,2±0,3 g/L) resultó ser mayor que en cultivo agitado (142,0±8,0 mg/L y 2,3±0,25 g/L) respectivamente. Cultivos batch realizados adicionalmente reportaron una tasa de crecimiento ( $\mu$ ) de 0,05 h<sup>-1</sup> y producción de pequeñas cantidades de compuestos típicamente encontrados en la fermentación alcohólica. Los mejores resultados, en términos de calidad organoléptica (aroma, sabor y olor), se obtuvieron en la fermentación en cultivo estático. El control de la aireación del medio de fermentación es una herramienta importante para controlar la síntesis de compuestos de importancia sensorial en la producción de bebidas fermentadas.

**Palabras clave:** *Hanseniaspora uvarum*, fermentación alcohólica, alcoholes superiores, etil acetato, cultivo por lotes.

## Fermentative activity of *Hanseniaspora uvarum* and its importance in production of fermented beverages

**Abstract:** The fermentation activity of *Hanseniaspora uvarum* RIVE 6-2-2 was studied with the purpose of evaluating its importance in the production process of fermented beverages. The strain was cultured in Erlenmeyer flasks, which contained sterilized and odorless apple juice, and the chemical compounds of sensorial importance produced during fermentation in shaken (200 min<sup>-1</sup>), and static (without shaking) cultures at 28 °C were determined. The results showed that the strains were capable of producing ethanol up to 4.20±0.1v/v% in static cultures at 28 °C. Shaking of the culture medium increased the superior alcohol production (up to 488.2 mg/L) and acetic acid (468.0±10.2 mg/L), when compared with the static culture; on the other hand, the production of ethyl acetate and glycerol (189.0±12.0 mg/L and 3.2±0.3 g/L) was higher in static than in shaken cultures (142.0±8.0 mg/L and 2.3±0.25 g/L), respectively. Additional batch cultures reported a growth rate ( $\mu$ ) of 0.05 h<sup>-1</sup> and production of small amounts of compounds typically found in alcoholic fermentation. The best results, in terms of organoleptic qualities (aroma, taste and smell), were found in the static culture fermentation. The aeration control of the fermentation medium is an important tool for controlling the synthesis of sensorial importance compounds in the production of fermented beverages.

**Keywords:** *Hanseniaspora uvarum*, alcoholic fermentation, superior alcohols, ethyl acetate, batch cultures.

\* Correspondencia:

E-mail: waldir.desiderio.estela.escalante@vscht.cz

### Introducción

*Hanseniaspora uvarum* es una levadura que predomina durante los primeros 3-4 días de la fermentación alcohólica

espontánea; luego muere o su actividad fermentativa se inhibe debido al incremento de la concentración de sub-productos de su metabolismo, como el etanol, que actúan como agentes inhibidores [1,2]. Estas levaduras

son anaerobias facultativas, presentan un metabolismo respiratorio y además son sensibles a la variación de la concentración de oxígeno en el medio [3,4]. Por otra parte, toleran altas concentraciones de azúcares fermentables típicamente encontrados en los mostos de uva y de otras frutas [5]. *H. uvarum* es una levadura que no posee efecto Crabtree (producción de etanol mediante la vía fermentativa por levaduras en presencia de baja cantidad de glucosa aún en presencia de cantidad suficiente de oxígeno), es decir que el aumento de la concentración de glucosa en el medio no afecta la respiración; no obstante, pueden producirse pequeñas cantidades de etanol, glicerol y acetato, lo cual explicaría una ligera disminución del rendimiento en biomasa. Debido a esta característica metabólica, *H. uvarum* es considerada una levadura oxidativa [6].

En levaduras sin efecto Crabtree, cultivadas en presencia de altas concentraciones de azúcar y a condiciones aerobias, el piruvato se metaboliza preferencialmente vía piruvato deshidrogenasa hasta acetyl-CoA y luego éste entra al ciclo de Krebs para su oxidación completa; esto se debe a que presentan bajos niveles de enzimas fermentativas y una alta actividad de enzimas respiratorias como la piruvato deshidrogenasa, acetaldehído deshidrogenasa y acetyl-CoA sintetasa [4,7,8].

En el caso de *H. uvarum*, esta levadura presenta una baja actividad de acetyl-CoA sintetasa comparado a otras levaduras sin efecto Crabtree y esto explicaría la producción de pequeñas cantidades de acetato y etanol en condiciones aerobias; la producción de glicerol se debería a la necesidad de equilibrar el balance redox intracelular, convirtiendo el exceso de NADH en NAD<sup>+</sup> generado durante la glucólisis y también como respuesta al estrés osmótico del medio [9]. Por otro lado, en condiciones anaerobias o parcialmente aerobias sucede la alcoholisis, en donde el piruvato es convertido a acetaldehído por la actividad de la piruvato descarboxilasa, luego éste es oxidado a etanol por la alcohol deshidrogenasa, y adicionalmente se produce acetato [4,7,10]. La acumulación de acetato resulta de la insuficiente actividad de la acetyl-CoA sintetasa requerida para su oxidación completa [4,11]. Así mismo, la aireación durante la fermentación (parcialmente anaerobia) conduce a un incremento medido del consumo de glucosa comparado a condiciones anaerobias estrictas, y el resultado es un mejor crecimiento y producción de etanol [4,7].

Durante la fermentación alcohólica, las levaduras utilizan los azúcares fermentables del mosto para la obtención de energía y al mismo tiempo se forman diferentes subproductos del metabolismo fermentativo. Entre los compuestos que se forman están los ésteres, alcoholes superiores, cetonas, aldehídos y ácidos orgánicos, entre otros [12,13]. Las levaduras apiculadas (con forma de limón) como *Hanseniaspora* spp. y *Kloeckera* spp. son conocidas por producir concentraciones de ácido acético y ésteres que contribuyen significativamente al aroma de las bebidas fermentadas [14,15].

Los ésteres representan el mayor grupo de componentes aromáticos en vinos, sidras y otras bebidas alcohólicas

fermentadas [12,16], y son formados principalmente mediante reacción enzimática dentro de la levadura; la enzima que cataliza la reacción es la acetiltransferasa y/o éster sintasa [11,17,18].

Los alcoholes superiores son otros compuestos químicos que contribuyen a la calidad sensorial, y son formados durante la fermentación alcohólica a partir de los correspondientes  $\alpha$ -cetoácidos, los cuales derivan de sus correspondientes aminoácidos (valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, etc.) por desaminación a través de la vía de Ehrlich, o a partir del metabolismo de la glucosa como precursores en la síntesis de aminoácidos [19,20]. Estudios realizados en levaduras apiculadas, reportaron que éstas son capaces de producir alcoholes superiores en concentraciones suficientes para influir en el aroma final de los vinos y de otras bebidas fermentadas [21]. En términos generales, la producción de compuestos de importancia sensorial depende de la especie y cepa de levadura y de las condiciones de fermentación [14,15,22].

El glicerol es otro producto de la fermentación alcohólica, que se forma en el citosol a partir de la dihidroxiacetona fosfato, un intermediario de la glucólisis. Su presencia contribuye a la calidad sensorial de las bebidas fermentadas, ya que presenta un sabor ligeramente dulce y, debido a su naturaleza viscosa, contribuiría a la suavidad y cuerpo, como en el caso de los vinos, por ejemplo [23].

El presente estudio se realizó con el objetivo de contribuir al entendimiento de la actividad fermentativa de *H. uvarum* RIVE 6-2-2, desde el punto de vista de su utilización y aprovechamiento en la elaboración de bebidas fermentadas no tradicionales. Pocos estudios relacionados a su actividad fermentativa y utilidad práctica existen en la actualidad. Además, en este trabajo se enfocan sus características aprovechables más allá de considerarla una levadura contaminante en procesos de producción de bebidas fermentadas.

## Materiales y métodos

**Microorganismo:** Se utilizó la cepa *H. uvarum* RIVE 6-2-2, adquirida en la colección de levaduras del Instituto de Investigación de Viticultura y Enología, Bratislava–República Eslovaca, y fue mantenida en agar extracto de malta a 7 °C, con renovación periódica cada 3 meses.

**Producción de etanol:** Se utilizó jugo de manzana concentrado, esterilizado por ultrafiltración y aroma removido adquirido de Severofrukt a.s., Terezín, República Checa. El concentrado se reconstituyó con agua desionizada estéril hasta una concentración de azúcares totales de 12,8% w/w y pH 3,8 para utilizarlo como medio de fermentación. Los ensayos se realizaron en frascos Erlenmeyer de 1 L conteniendo 0,5 L de medio de cultivo. Las fermentaciones se llevaron a cabo en cultivo agitado y estático a 16 °C y 28 °C. En las fermentaciones en cultivo agitado los frascos se agitaron a 200 min<sup>-1</sup> en un agitador orbital. Las fermentaciones en cultivo estático se consideraron

terminadas cuando no se observó producción de CO<sub>2</sub>, y en aquellas en cultivo agitado el tiempo de cultivo fue el equivalente al tiempo utilizado durante la fermentación en cultivo estático.

El inóculo se propagó a 28 °C, utilizando medio de cultivo de la misma composición. Los frascos se agitaron a 200 min<sup>-1</sup>, durante 48 horas. Así, el medio de fermentación se inoculó con 14% v/v. Finalmente, el contenido de etanol producido se determinó mediante picnometría. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

*Síntesis de compuestos de importancia sensorial durante la fermentación:* Se utilizó jugo de manzana reconstituido con las características descritas anteriormente. Las fermentaciones se realizaron en cultivo agitado y estático en frascos Erlenmeyer de 0,5 L conteniendo 250 mL de medio. En las fermentaciones en cultivo agitado los frascos se agitaron a 200 min<sup>-1</sup> durante 8 días y, para aquellas en cultivo estático el tiempo de fermentación fue de 15 días. Todos los experimentos se realizaron a 28 °C y por triplicado.

La propagación del inóculo se llevó a cabo en 100 ml de jugo de manzana estéril a 28 °C durante 24 horas, los frascos se agitaron a 200 min<sup>-1</sup> en un agitador orbital. Las células se separaron por centrifugación (3.000 min<sup>-1</sup> durante 10 minutos) y se lavaron tres veces con solución fisiológica estéril. Los medios de fermentación se inocularon con 1,0±0,1 g de células en peso húmedo.

*Cultivo batch en biorreactor:* Como medio de cultivo se utilizó jugo de manzana variedad Rubin, con un contenido de azúcares totales de 13% w/v a pH 3,8. Las manzanas fueron adquiridas de la distribuidora de frutas y hortalizas Fruit-CZ, Praga, República Checa. El jugo de manzana fue extraído por presión y luego vertido en frascos de 10 L. El jugo se pasteurizó en un termostato a 65–70 °C por 12 horas (incluyendo el tiempo de enfriado) con la finalidad de eliminar la flora microbiana y además todos los compuestos volátiles varietales [24,25]. Luego se suplementó con KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 g/L y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,2 g/L como fuente de fósforo y amonio para promover el crecimiento de las levaduras. Los cultivos se realizaron en un biorreactor (BIOSTAT–B. Braun International, Alemania) de 2 L, conteniendo 1,5 L de medio de cultivo. El biorreactor estuvo conectado a una unidad de regulación y medición micro-DCU-300 y además estuvo equipado con un agitador, medidor de pH, termómetro y un electrodo de medición de oxígeno disuelto. Los parámetros mantenidos constantes a lo largo del proceso fueron: temperatura 18 °C, frecuencia de agitación 300 min<sup>-1</sup> y flujo de aire 25 L/h (0,2 mol O<sub>2</sub>/h). El tiempo de cultivo se dejó hasta el incremento de la concentración de oxígeno disuelto en el medio a su valor inicial.

El inóculo se propagó en 80 ml de medio sintético de la siguiente composición: glucosa 8,0 g/L; peptona 10,0 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,2 g/L y extracto de levadura 10,0 g/L; el pH se ajustó a 3,6. La propagación de células se llevó a cabo en un agitador orbital a 150 min<sup>-1</sup> durante 48 horas a 28 °C. Las células se separaron por centrifugaron

(3.000 min<sup>-1</sup> durante 10 minutos), se lavaron tres veces con solución fisiológica estéril y, finalmente se inocularon en el biorreactor.

*Métodos analíticos:* Los compuestos volátiles producidos durante la fermentación (alcoholes superiores y ésteres) se analizaron en un cromatógrafo de gas (Hewlett-Packard 5890II), equipado con una columna HP5 (30 m x 0,32 mm) y un detector FID.

Las muestras fermentadas por triplicado se centrifugaron y filtraron en una membrana de microfiltración de 0,45 µm de porosidad, luego se extrajeron los compuestos volátiles mediante el método de microextracción con diclorometano [26]. Finalmente, 1 µL de cada extracto se inyectó en el cromatógrafo.

Los ácidos (acético, succínico, málico), etanol, glicerol, fructosa y glucosa se analizaron por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC Pump LCP 4000), equipado con una columna Watrex 250 x 8mm (Ostion LGKS 0800 H<sup>+</sup>) y un detector RID. En el análisis se utilizó 0,005 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fase móvil a una tasa de flujo de 1 mL/min. Las muestras fermentadas por triplicado, luego de ser filtradas y centrifugadas, se diluyeron con agua desmineralizada (1:3) y se inyectaron al equipo.

La biomasa celular se determinó mediante gravimetría. Las células se separaron por centrifugación (3.000 min<sup>-1</sup> durante 10 minutos), se lavaron 3 veces con agua destilada, luego se secaron a 110 °C durante 2 horas y finalmente se pesaron. Además, se determinaron el coeficiente global de rendimiento de biomasa Y<sub>XS</sub> y la tasa de crecimiento (µ) respectivamente [27].

*Análisis sensorial y estadístico:* Se evaluaron atributos como sabor, aroma y olor usando una escala hedónica de 5 puntos (1=me desagrada extremadamente y 5=me gusta mucho). Las muestras fueron evaluadas por un panel entrenado conformado por 10 jueces hombres de entre 25 y 30 años de edad. La evaluación sensorial se realizó de acuerdo a Meilgaard *et al.* [28]. Las puntuaciones de los panelistas se presentaron como promedios aritméticos. Luego se utilizó la prueba t-Student estándar para determinar la significancia estadística de las diferencias observadas entre los resultados de los dos tipos de fermentación (p<0,01). El análisis estadístico se realizó ayudado por el software Statistica v. 8.0 para Windows.

## Resultados y discusión

*Producción de etanol:* El etanol es el producto principal de la fermentación alcohólica. En ausencia o limitación de oxígeno, cuando la oxidación completa de la glucosa no puede llevarse a cabo, la célula opta por fermentar el azúcar y así sacar provecho de la poca energía que genera esta vía y utilizarla en su crecimiento y otras actividades metabólicas. Esta es la razón de una menor velocidad de crecimiento celular durante la fermentación alcohólica. Como se observa en la tabla 1, *H.uvarum* RIVE 6-2-2

Tabla 1. Producción de etanol por *Hanseniaspora uvarum* RIVE 6-2-2 en cultivo agitado y estático en jugo de manzana a 16 °C y 18 °C.

Tipo de cultivo	Temperatura de fermentación	Etanol producido (% v/v)
Agitado	16 °C	2,40 ± 0,1
Agitado	28 °C	2,62 ± 0,1
Estático	16 °C	3,90 ± 0,1
Estático	28 °C	4,02 ± 0,1

produjo un máximo de 4,02±0,1% v/v de etanol en cultivo estático a 28 °C; esto concuerda con lo encontrado por otros autores, quienes manifiestan que especies de levaduras no-*Saccharomyces* pueden producir entre 4-6% v/v de etanol [29]. Por otro lado, la producción de etanol en cultivo agitado (aireado) resultó ser menor comparado al cultivo estático; esto explica que *H. uvarum* RIVE 6-2-2 prefiere oxidar la glucosa que fermentarla, siempre que en el medio haya suficiente concentración de oxígeno.

Con respecto a la temperatura de fermentación, no se observó una marcada diferencia entre la cantidad de etanol producido a 16 °C y 28 °C. Desde el punto de vista de producción de vinos blancos y cervezas por ejemplo, se prefieren temperaturas bajas de fermentación ya que influyen positivamente en la síntesis de componentes sensoriales [22].

*Síntesis de compuestos de importancia sensorial durante la fermentación:* En la tabla 2 se muestran los compuestos producidos por *H. uvarum* RIVE 6-2-2 durante la

fermentación en cultivo agitado y estático; así mismo se citan los principales compuestos químicos analizados en jugo de manzana y sidras obtenidos por otros autores con fines de comparación. El glicerol es el compuesto producido en mayor proporción, observándose que tanto en cultivo agitado como estático se produjo 2,3±0,25 g/L y 3,2±0,3g/L respectivamente. La menor producción en cultivo agitado (aireado) sería debido a que la presencia de oxígeno en el medio promueve la respiración celular, disminuyendo la producción de glicerol.

Con respecto a la producción total de alcoholes superiores, se observó que en cultivo agitado se produjo una mayor concentración (488,2 mg/L) comparado a lo producido en cultivo estático (135,4 mg/L). Así, la incorporación de oxígeno al medio durante la agitación influye en la síntesis de alcoholes superiores. En cultivo estático éstos se producen durante los primeros días de la fermentación, cuando en el medio hay todavía oxígeno disponible. En estas condiciones, el consumo de glucosa, fructosa y aminoácidos es relativamente alto, lo que conlleva a una mayor formación de cetoácidos, los cuales son precursores de la síntesis de alcoholes superiores [30]. Estudios realizados anteriormente por el autor también reportaron que la agitación (aireación) del medio influye en el incremento de la producción de alcoholes superiores en especies de levaduras no-*Saccharomyces* [31,32]. Además, se observó que los alcoholes superiores producidos en mayor proporción, tanto en cultivo agitado como estático, fueron 2-metil-propanol, 3-metil-butanol, 2-metil-butanol y 2-feniletanol.

La producción de ésteres depende de las condiciones de

Tabla 2. Compuestos de importancia sensorial producidos por *Hanseniaspora uvarum* RIVE 6-2-2 cultivado en jugo de manzana a 28°C en cultivo agitado y estático, más compuestos analizados en jugo de manzana y en sidras.

Compuestos (mg/L)	Tipo de cultivo de <i>H. uvarum</i> RIVE 6-2-2 <sup>a</sup>		Jugo de manzana	Sidras
	Agitado	Estático		
Glicerol *	2,3 ± 0,25	3,2 ± 0,3	0,0 <sup>b</sup>	4,05 ± 0,13 <sup>e</sup> ; 2,59 ± 1,7 <sup>f</sup>
1-Propanol	61,0 ± 5,0	16,0 ± 1,2	7,0 <sup>c</sup>	20,01 ± 0,35 <sup>e</sup> ; 27,3 ± 13,0 <sup>f</sup>
1-Butanol	6,2 ± 0,6	6,4 ± 0,4	4,50 ± 0,23 <sup>d</sup>	6,99 ± 0,04 <sup>e</sup> ; 6,1 ± 0,7 <sup>f</sup>
2-Butanol	9,0 ± 1,2	tr.	n.c	n.c
2-Metil-propanol	128,0 ± 7,0	39,0 ± 3,0	0,75 ± 0,04 <sup>d</sup>	22,17 ± 0,08 <sup>e</sup> ; 34,8 ± 8,9 <sup>f</sup>
3-Metil-butanol	161,0 ± 8,5	35,0 ± 2,5	2,11 ± 0,11 <sup>d</sup>	232,00 ± 13,80 <sup>e</sup>
2-Metil-butanol	25,0 ± 2,5	23,0 ± 1,5	9,0 <sup>c</sup>	94,8 ± 0,2 <sup>ex</sup> ; 173 ± 41,1 <sup>f□</sup>
2-feniletanol	98,0 ± 6,0	16,0 ± 2,0	0,46 ± 0,02 <sup>d</sup>	7,8 ± 0,39 <sup>e</sup> ; 131,5 ± 55,3 <sup>f</sup>
Etil acetato	142,0 ± 8,0	189,0 ± 12,0	0,57 ± 0,03 <sup>d</sup>	231,06 ± 33,09 <sup>e</sup> ; 114,6 ± 35,5 <sup>f</sup>
Butil acetato	1,0 ± 0,2	tr.	0,58 ± 0,03 <sup>d</sup>	0,27 ± 0,02 <sup>d</sup>
Isoamil acetato	0,2 ± 0,02	n.d	2,48 ± 0,12 <sup>d</sup>	16,66 ± 1,0 <sup>d</sup>
Etil decanoato	n.d	7,1 ± 0,8	0,01 ± 0,002 <sup>d</sup>	1,50 ± 0,09 <sup>d</sup>
Ácido acético	468,0 ± 10,2	235,0 ± 10,0	0,0 <sup>b</sup>	900,0 ± 140,0 <sup>e</sup> ; 282,93 ± 16,9 <sup>d</sup>
Ácido succínico*	0,82 ± 0,12	1,2 ± 0,15	0,0 <sup>b</sup>	200,0 ± 30,0 <sup>e</sup> ; 0,5 ± 0,06 <sup>f</sup>

\*:g/L; tr: trazas; n.d: no detectado; n.c: no citado; a: Valores promedios de fermentaciones realizadas por triplicado; b: [34]; c: Valores promedios [35]; d: [36]; e: [37]; f: Valores de sidras colectadas en el año 1998 [38]; ex, f□: Contenido de alcoholes amilicos (3-metil-butanol+2-metil-butanol) [37,38]; g:[39].

cultivo pero además de la especie e incluso de cada cepa de levadura. La producción de etil acetato en cultivo agitado disminuyó comparado al cultivo estático; esto indicaría que el oxígeno tiene efecto contrario en la producción de ésteres, comparado a la síntesis de alcoholes superiores. La aireación disminuye la producción de ésteres debido a la reducción de la actividad de la acetiltransferasa y a la oxidación de acetyl CoA en el ciclo de Krebs [17]. Así mismo, una elevada producción de etil acetato estaría relacionada con la disponibilidad de ácido acético y etanol necesarios para su síntesis. En los resultados se observa además que *H. uvarum* RIVE 6-2-2 produjo altas concentraciones de ácido acético ( $468,0 \pm 10,2$  mg/L y  $235,0 \pm 10,0$  mg/L) suficientes para propiciar la síntesis de etil acetato.

*Hanseniaspora uvarum* RIVE 6-2-2 presenta un metabolismo respiro-fermentativo, el cual estaría determinado por la concentración de oxígeno disuelto en el medio de fermentación [4,7]. A condiciones de limitación de oxígeno experimentaría un comportamiento respiro-fermentativo mixto, que se manifiesta en la síntesis de sub-productos de la fermentación alcohólica. El cultivo de *H. uvarum* RIVE 6-2-2 en frascos Erlenmeyer agitados a  $200 \text{ min}^{-1}$  mostraría un perfil variable de transferencia de masa de oxígeno y así variaciones en su concentración en el medio [33]. Los resultados en la tabla 1 muestran que en cultivo agitado (a  $200 \text{ min}^{-1}$ ) se produjo etanol en cantidades considerables (2,4 y 2,62% v/v); esto indicaría que la transferencia de oxígeno no fue lo suficientemente alta para propiciar un metabolismo predominantemente respiratorio sino más bien un metabolismo respiro-fermentativo condicionado por la limitación de oxígeno. El análisis estadístico de los resultados de aroma, sabor y olor reportaron diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre los dos tipos de bebidas fermentadas. Además, los resultados de los jueces expresaron que la bebida fermentada estáticamente fue de mejor calidad organoléptica en base a los atributos evaluados. Sin embargo, a la bebida cultivada en agitación la definieron como “diferente” pero no desagradable. A la bebida fermentada estáticamente la definieron como más suave, ligeramente ácida y con ligero sabor a “fruta seca”. Ambas bebidas obtuvieron en promedio puntajes similares.

**Cultivo batch en biorreactor:** La concentración de oxígeno disuelto en el medio es uno de los factores más importantes que influye en el metabolismo de las levaduras. En la figura 1 se observa el transcurso del consumo de oxígeno disuelto, la variación del pH y el crecimiento celular de *H. uvarum* RIVE 6-2-2 durante el cultivo en biorreactor. Durante las primeras 14 horas, la población celular consumió completamente el oxígeno disuelto. El oxígeno es un activador de la síntesis de algunas enzimas del ciclo de Krebs, así su funcionamiento conlleva a la oxidación completa de la glucosa. Luego de ello, el consumo de oxígeno disminuyó durante 38 horas. La disminución del consumo de oxígeno durante este período estaría relacionada con el agotamiento de algún sustrato, lo que provocó la desaceleración del crecimiento.

Además, se observó el efecto de diáxia en el intervalo entre

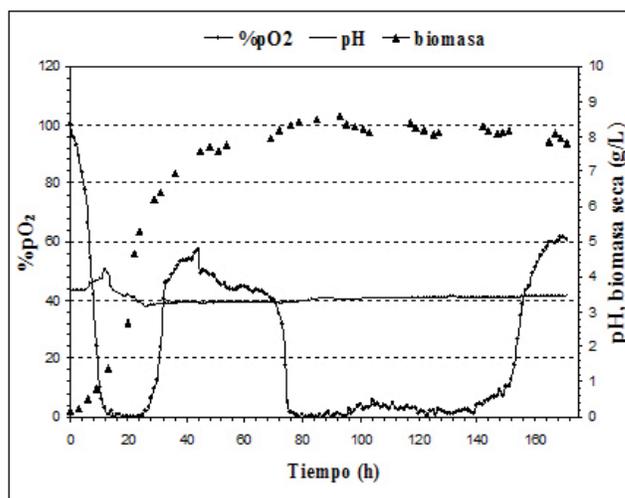


Figura 1. Cultivo batch de *Hanseniaspora uvarum* RIVE 6-2-2 en biorreactor a 18°C y con flujo de aire 25 L/h.

las 58–60 horas de cultivo, provocado por el agotamiento de algún sustrato específico (glucosa o fructosa), conllevando a un corto detenimiento del crecimiento. Luego de ello se observó un corto incremento de biomasa, producto de la utilización de un segundo sustrato acompañado de un incremento del consumo de oxígeno. Aproximadamente a partir de las 95 horas de cultivo, la población celular entró en la fase estacionaria como consecuencia del agotamiento de la subsiguiente fuente de carbono. Durante este periodo, el alto consumo de oxígeno estaría relacionado con el mantenimiento de la población celular. Al final del cultivo, a partir de las 139 horas, el consumo de oxígeno disminuyó nuevamente alcanzando valores de 61,5% de oxígeno disuelto en el medio. La disminución del consumo de oxígeno estaría conectada con la fase de “muerte” de la población microbiana.

La variación del pH durante el cultivo esta asociada con el proceso de crecimiento celular y la actividad metabólica con la principal causa del intercambio de protones en el medio. Las variaciones de pH implican la asimilación de nitrógeno en el metabolismo respiratorio. En los resultados (Tabla 3) se observa que la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) fue  $0,05 \text{ h}^{-1}$  calculado en el intervalo entre las 13-22 horas. Valores bajos de  $\mu$  son generalmente observados en fermentaciones con levaduras.

La presencia de productos de la fermentación (Tabla 3) indicaría que la población celular bajo estas condiciones experimentó un metabolismo respiro-fermentativo. Para propiciar un metabolismo enteramente respiratorio debe existir en el medio suficiente cantidad de oxígeno disuelto que no limite la respiración; para ello es necesario incrementar el flujo de aire hacia el biorreactor y/o incrementar la velocidad de agitación. Por otra parte, la síntesis de ácido succínico resulta de la oxidación de azúcares en el ciclo de Krebs, inducido por la presencia de oxígeno. También se observó una disminución en la concentración de ácido málico (Tabla 3); esto nos indica que *H. uvarum* RIVE 6-2-2 utiliza ácido málico como fuente carbono en presencia de oxígeno.

Tabla 3. Compuestos utilizados y producidos por *Hanseniaspora uvarum* RIVE 6-2-2 durante el cultivo batch en biorreactor a 18 °C.

Concentración inicial de componentes (g/L)						
fructosa	glucosa	sucrosa	ác. málico			
70,95	22,6	35,5	5,02			
Compuestos finales (g/L)						
fructosa	glucosa	etanol	glicerol	ác. acético	ác. succínico	ác. málico
0,2 ± 0,02	1,7 ± 0,2	19,5 ± 2,0	3,98 ± 0,15	0,52 ± 0,05	0,48 ± 0,05	2,9 ± 0,15
Alcoholes superiores y etil acetato producidos (mg/L)						
1-propanol	propil acetato	2-metil propanol	3-metil butanol	2-metil butanol	etil acetato	
0,9 ± 0,1	0,0	2,7 ± 0,2	2,7 ± 0,2	2,8 ± 0,2	43,7 ± 2,0	
Azúcar utilizado (S), biomasa final (X), rendimiento ( $Y_{X/S}$ , $Y_{E/S}$ ), tasa de crecimiento ( $\mu$ )						
S	X	$Y_{X/S}$	$Y_{E/S}$	$\mu$		
127,2	7,82	0,062	0,15	0,05		

$Y_{X/S}$ : g de biomasa/g azúcar;  $Y_{E/S}$ : g de etanol/g azúcar;  $\mu$ : tasa de crecimiento ( $h^{-1}$ ); X: biomasa seca (g/L); S: azúcar total consumido (g/L).

La tasa de crecimiento ( $\mu$ ) es un parámetro importante que indica la velocidad con que una población microbiana se desarrolla en un medio a determinadas condiciones. Así, este valor es constante y máximo en cuanto haya exceso de substrato limitante (azúcares fermentables). Los valores bajos de rendimiento  $Y_{X/S}$  (0,07 g de biomasa/g de azúcar) y tasa de crecimiento ( $0,05h^{-1}$ ) indicarían que una considerable cantidad del substrato habría sido utilizado en procesos distintos a la generación de biomasa celular, en este caso, en la generación de compuestos de la fermentación y/o para la producción de energía de mantenimiento [40]. Adicionalmente, se realizó el análisis sensorial al producto final y los jueces definieron a esta bebida sin cualidades aromáticas y de sabor desagradable.

## Conclusiones

*Hanseniaspora uvarum* RIVE 6-2-2 presenta un gran potencial para ser utilizada en la producción de bebidas fermentadas a partir de jugos de frutas. Así mismo, su baja producción de etanol la hace adecuada para la producción de bebidas con bajo contenido alcohólico (4% v/v).

La aireación durante la fermentación influye en su actividad fermentativa, ya que incrementa la producción de alcoholes superiores y ácido acético pero, por el contrario, disminuye la producción de ésteres y glicerol. Una característica resaltante es la producción de cantidades considerables de etil acetato. La síntesis de estos compuestos puede ser controlada ajustando la tasa de agitación (aireación).

*Hanseniaspora uvarum* RIVE 6-2-2 resulta ser una cepa muy sensible y hábida de oxígeno cuando necesita oxidar completamente la glucosa; el suministro de bajas concentraciones de oxígeno o variaciones en el flujo de aire, puede conducir a un metabolismo respiro-fermentativo mixto, con la consecuente disminución del crecimiento y la producción de compuestos químicos sensorialmente importantes. La producción de etanol, alcoholes superiores

y ésteres en cultivo batch sugiere que, incluso cuando el flujo de aire hacia el medio es de 25 L/h ( $0,2 \text{ mol O}_2/h$ ), este no sería suficiente para provocar un metabolismo completamente oxidativo. Así mismo, en presencia de oxígeno utiliza ácido málico, característica favorable, ya que disminuiría la acidez total de las bebidas fermentadas. Esta levadura puede ser aprovechada para producir bebidas alcohólicas fermentadas no tradicionales con características sensoriales particulares.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la colección de levaduras del Instituto de Investigación de Viticultura y Enología, Bratislava, República Eslovaca, por proporcionarnos la cepa de levadura estudiada.

## Referencias

1. Suarez Valles B, Pando Bedrinana R, Fernandez Tascon N, Querol Simon A, Rodriguez Madrera R. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiol.* 2007; 24:25-31.
2. Zott K, Miot-Sertier C, Claisse O, Lonvaud-Funel A, Masneuf-Pomarede I. Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *Int J Food Microbiol.* 2008; 125:197-203.
3. Venturin C, Boze H, Fahrmael L, Moulin G, Galzy P. Effect of glucose and oxygen concentration on the fermentative capacity of *Hanseniaspora uvarum* K<sub>5</sub> (Niehaus). *Sciences des Aliments.* 1994; 14:321-33.
4. Venturin C, Boze H, Moulin G, Galzy P. Influence of oxygen limitation on glucose metabolism in *Hanseniaspora uvarum* K5 grown in chemostat. *Biotechnol Lett.* 1995; 17:537-42.
5. Díaz-Montaña DM, Ramírez Córdova JJ. The fermentative and aromatic ability of *Kloeckera* and *Hanseniaspora* yeasts. In: Satyanarayana T, Gotthard K, editors. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications.* Netherlands:

- Springer Science. 2009; p. 281-300.
6. Rodicio R, Heinisch JJ. Sugar metabolism by *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. In: Helmut K, Fröhlich GÜJ, editors. Biology of Microorganisms on Grapes, in Must, and in Wine. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2009; p. 115-30.
  7. Venturin C, Boze H, Moulin G, Galzy P. Glucose metabolism, enzymic analysis and product formation in chemostat culture of *Hanseniaspora uvarum*. Yeast; 1995; 11:327-36.
  8. Postma E, Verduyn C, Scheffers WA, Van Dijken JP. Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Environ Microbiol. 1989; 55:468-77.
  9. Prior BA, Hohmann S. Glycerol production and osmoregulation. In: Zimmermann FK, Entian KD, editors. Yeast Sugar Metabolism. Lancaster: Technomic Publishing. 1997; p. 313-37.
  10. Boulton B, Singleton VL, Bisson LF, Kunkee RE. Yeast and biochemistry of ethanol fermentation. In: Boulton B, Singleton BL, Bisson LF, Kunkee RE, editors. Principles and Practices of Winemaking. New York: Chapman and Hall Publishers. 1996; p. 139-72.
  11. Mason AB, Dufour JP. Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. Yeast. 2000; 16:1287-98.
  12. Herraiz T, Ough CS. Formation of ethyl esters from amino acids by yeasts during the alcoholic fermentation of grape juice. Am J Enol Viticult. 1993; 44:41-8.
  13. Vidrih R, Hribar J. Synthesis of higher alcohols during cider processing. Food Chem. 1999; 67:287-94.
  14. Plata C, Millan C, Mauricio JC, Ortega JM. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. Food Microbiol. 2003; 20:217-24.
  15. Rojas V, Gil JV, Piñaga F, Manzanares P. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. Int J Food Microbiol. 2001; 70:283-9.
  16. Suomalainen H. Yeast esterase and aroma esters in alcoholic beverages. J Inst Brewing. 1981; 87:296-300.
  17. Yoshioka K, Hashimoto N. Ester formation by brewers yeast during sugar fermentation. Agric Biol Chem. 1984; 48:333-40.
  18. Malcorps P, Dufour JP. Short-chain and medium-chain aliphatic-ester synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Eur J Biochem. 1992; 210:1015-22.
  19. Ouchi K, Yamamoto Y, Takagishi M, Akiyama H. Regulation of isoamyl alcohol formation via Ehrlich pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. J Ferment Techn. 1980; 58:301-9.
  20. Eden A, Van Nedervele L, Drukker M, Benvenisty N, Debourg A. Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast. Appl Microbiol Biotechnol. 2001; 55:296-300.
  21. Romano P, Suzzi G, Comi G, Zironi R. Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. J Appl Bacteriol. 1992; 73:126-30.
  22. Molina AM, Swiegers JH, Varela C, Pretorius IS, Agosin E. Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. Appl Microbiol Biotechnol. 2007; 77:675-87.
  23. Nieuwoudt HH, Prior BA, Pretorius IS, Bauer FF. Glycerol in South African table wines: an assessment of its relationship to wine quality. South African J Enol Viticult. 2002; 23:22-30.
  24. Su SK, Wiley RC. Changes in apple juice flavor compounds during processing. J Food Sci. 1998; 63:688-91.
  25. El-Nemra SE, Ismail IA, Askar A. Aroma changes in mango juice during processing and storage. Food Chem. 1988; 30:269-75.
  26. Ortega C, Lopez R, Cacho J, Ferreira V. Fast analysis of important wine volatile compounds. Development and validation of a new method based on gas chromatography-flame ionization detection analysis of dichloromethane micro extracts. J Chromatogr A. 2001; 923:205-14.
  27. Van Hoek P, Van Dijken JP, Pronk JT. Effect of specific growth rate on fermentative capacity of baker's yeast. Appl Environ Microbiol. 1998; 64:4226-33.
  28. Meilgaard M, Civille GV, Carr BT. Sensory Evaluation Techniques. 3<sup>rd</sup> edition. Boca Raton, New York: CRC Press; 1999.
  29. Ciani M, Maccarelli F. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. World J Microbiol Biotechnol. 1998; 14:199-203.
  30. Valero E, Moyano L, Millan MC, Medina M, Ortega JM. Higher alcohols and esters production by *Saccharomyces cerevisiae*. Influence of the initial oxygenation of the grape must. Food Chem. 2002; 78:57-61.
  31. Estela W, Melzoch K, Ondrousek S, Hosnedl T, Siristova L, Rychtera M. Study and analysis of metabolites of sensorial importance produced by non-*Saccharomyces* yeasts. En: 27<sup>th</sup> World Congress on Vine and Wine and 82<sup>nd</sup> General Assembly of the International Office of Vine and Wine-OIV Bratislava, Slovak Republic, 24<sup>th</sup> – 28<sup>th</sup> June 2002.
  32. Estela W, Rychtera M, Melzoch K, Egoavil E. Synthesis of compounds of sensory importance by *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeast during cider fermentation. En: 6<sup>o</sup> Simposio Internacional de Alcoholes y Levaduras. Bogotá, Colombia, 20 – 22 Junio 2007.
  33. Gupta A, Rao G. A study of oxygen transfer in shake flasks using a non-invasive oxygen sensor. Biotech Bioengin. 2003; 84:351-8.
  34. Cabranes C, Moreno J, Mangas JJ. Cider production with immobilized *Leuconostoc oenos*. J Inst Brew. 1998; 4:127-30.
  35. Souci SW, Fachmann W, Kraut H. Juices from fruits and berries: Food composition and nutrition tables. 6<sup>th</sup> edition. Stuttgart: Scientific publishers; 2000.
  36. Wang L, Xu Y, Zhao G, Li J. Rapid analysis of flavor volatiles in apple wine using Headspace Solid-Phase microextraction. J Inst Brew. 2004; 110:57-65.
  37. Suarez Valles B, Pando Bedrinana R, Fernandez Tascon N, Gonzalez Garcia A, Rodriguez Madrera R. Analytical differentiation of cider inoculated with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) isolated from Asturian (Spain) apple juice. LWT Food Sci Tech. 2005; 38:455-61.
  38. Picinelli A, Suarez B, Moreno J, Rodriguez R, Caso-Garcia LM, Mangas JJ. Chemical characterization of Asturian cider. J Agricult Food Chem. 2000; 48:3997-4002.
  39. Jarvis B, Forster MJ, Kinsella WP. Factors affecting the development of cider flavour. J Appl Bacteriol. 1995; 79:5S-18S.
  40. Beeftink HH, Van der Heijden RTJM, Heijnen JJ. Maintenance requirements: energy supply from simultaneous endogenous respiration and substrate consumption. FEMS Microbiol Lett. 1990; 73:203-9.