



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA INGENIERÍA BIOQUÍMICA



**“DETERMINACIÓN DE LA OSMOTOLERANCIA DE NUEVE CEPAS DE LEVADURAS
AISLADAS DE FRUTOS DE MORA PARA LA APLICACIÓN INDUSTRIAL EN
PROCESOS DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA”**

Trabajo de Investigación (Graduación), Modalidad: Trabajo Estructurado de Manera Independiente (TEMI) presentado como requisito previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autor: Gissela Katherine Constante Ibarra

Tutor: Dr. Carlos Rodríguez M.; Ph. D.

Ambato - Ecuador

2015

APROBACIÓN DEL TUTOR

En calidad de Tutor del Trabajo de Investigación: “DETERMINACIÓN DE LA OSMOTOLERANCIA DE NUEVE CEPAS DE LEVADURAS AISLADAS DE FRUTOS DE MORA PARA LA APLICACIÓN INDUSTRIAL EN PROCESOS DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA”, realizado por la Egda. Gissela Katherine Constante Ibarra, certifico que el trabajo fue realizado por la persona indicada. Considero que dicho informe reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del Tribunal de Grado, que el Honorable Consejo Directivo designe, para su correspondiente estudio y calificación.

Ambato, Mayo de 2015

Dr. Carlos Rodríguez M.; Ph.D.

TUTOR DE TESIS

AUTORÍA

El presente trabajo de investigación: "DETERMINACIÓN DE LA OSMOTOLERANCIA DE NUEVE CEPAS DE LEVADURAS AISLADAS DE FRUTOS DE MORA PARA LA APLICACIÓN INDUSTRIAL EN PROCESOS DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA", es absolutamente original, auténtico y personal, en tal virtud, el contenido, efectos legales y académicos que se desprenden del mismo son de exclusiva responsabilidad del autor.

Ambato, Mayo de 2015

Gissela Katherine Constante Ibarra

180480269-0

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Los miembros del tribunal de grado aprueban el presente trabajo de graduación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Ambato

Ambato, Mayo de 2015

Para constancia firman:

Presidenta del Tribunal

Ing. Jaqueline Ortiz.; Ph. D.

Miembro del Tribunal

Ing. Alex Valencia

Miembro del Tribunal

Ing. Mg. Diego Salazar

DEDICATORIA

*A mi madre
con mucho amor y cariño
le dedico todo mi esfuerzo
y trabajo puesto para
la realización de esta tesis.*

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica de Ambato, de forma especial a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, por el conocimiento adquirido en estos años de estudio.

Al Dr. Carlos Rodríguez por ser mi tutor de tesis que con su paciencia y, motivación profesional y personal, culminó una etapa más en mi vida.

Al Ing. Diego Salazar e Ing. Dolores Robalino por su ayuda y colaboración en la ejecución del trabajo investigativo.

A mi mami Grace y mis hermanas Tatiana y Micaela por ser mis pilares y fuente de inspiración para seguir adelante.

A mi abuelito Luis por la confianza y apoyo incondicional que me ha brindado.

A mis amigas Karen y María Belén por estar conmigo en los mejores y peores momentos.

Tabla de Contenido

AUTORÍA.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DEDICATORIA	v
RESUMEN.....	xv
CAPÍTULO I.....	1
EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1. Tema de investigación.....	1
1.2. Planteamiento del problema	1
1.2.1. Contextualización.....	1
1.2.2. Análisis Crítico	4
1.2.3. Prognosis	4
1.2.4. Formulación del problema.....	4
1.2.5. Preguntas directrices.....	4
1.2.6. Delimitación del Objeto de Investigación.....	5
1.3. Justificación	5
1.4. Objetivos.....	6
1.4.1. General	6
1.4.2. Específicos	6
CAPÍTULO II.....	7
MARCO TEÓRICO	7
2.1. Antecedentes investigativos	7
2.1.1. Levaduras	7
2.1.2. El proceso de fermentación.....	13
2.1.3. Fermentación alcohólica	14
2.1.4. Parámetros de Medición de la Fermentación Alcohólica.....	15

2.1.5.	Factores que afectan a la fermentación alcohólica	17
2.2.	Fundamentación filosófica	19
2.3.	Fundamentación legal	20
2.4.	Categorías fundamentales.....	22
2.5.	Hipótesis.....	22
2.6.	Señalamiento de variables de la hipótesis.....	22
CAPÍTULO III.....		24
METODOLOGÍA.....		24
3.1.	Modalidad básica de la investigación	24
3.2.	Nivel o tipo de investigación	24
3.3.	Población y muestra	24
3.4.	Operacionalización de variables.....	25
3.5.	Plan de recolección de información	26
3.5.1.	Recepción	26
3.5.2.	Preparación del mosto de uva.....	26
3.5.3.	Pasteurización del mosto	26
3.5.4.	Caracterización físico-química del mosto.....	26
3.5.5.	Preparación de las levaduras.....	27
3.5.6.	Fermentación	28
3.5.7.	Determinación del pH.....	28
3.5.8.	Determinación de Sólidos Solubles.....	28
3.5.9.	Determinación de la acidez del vino.....	28
3.5.10.	Cinética microbiana.....	29
3.5.11.	Destilación del Alcohol Etílico	30
3.6.	Plan de procesamiento y análisis de la información	30
3.6.1.	Diseño experimental	30

CAPÍTULO IV	33
ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	33
4.1. Análisis de Resultados	33
4.2. Interpretación de datos	36
4.3. Verificación de la hipótesis	41
CAPÍTULO V	42
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	42
5.1. Conclusiones	42
5.2. Recomendaciones	43
CAPÍTULO VI	44
PROPUESTA	44
6.1. Datos informativos	44
6.1.1. Título	44
6.1.2. Instituciones ejecutoras.....	44
6.1.3. Beneficiarios.....	44
6.1.4. Ubicación	44
6.1.5. Tiempo estimado para la Ejecución	44
6.1.6. Equipo técnico responsable	44
6.2. Antecedentes de la propuesta	45
6.3. Justificación	45
6.4. Objetivos.....	46
6.4.1. General	46
6.4.2. Específicos.....	46
6.5. Análisis de factibilidad	46
6.6. Fundamentación	46
6.7. Metodología – Modelo Operativo.....	46

6.7.1.	Recepción	46
6.7.2.	Microorganismos utilizados para la fermentación alcohólica del mosto de uva .	47
6.7.3.	Preparación del mosto de uva.....	47
6.7.4.	Pasteurización del mosto	47
6.7.5.	Fermentación	47
6.7.6.	Reproducción de las levaduras	48
6.7.7.	Primer Trasiego.....	48
6.7.8.	Determinación del pH.....	48
6.7.9.	Determinación de Sólidos Suspendedos.....	49
6.7.10.	Determinación de la acidez del vino.....	49
6.7.11.	Cinética microbiana.....	49
6.7.12.	Destilación del Alcohol Etílico	50
6.7.13.	Conteo de células viables	50
6.8.	Administración	51
6.9.	Previsión de la evaluación	52
	MATERIALES DE REFERENCIA	53
	ANEXO A.....	59
	ANEXO B.....	75
	ANEXO C	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características fisiológicas de *C. sorbosivorans* sp. nov.

Tabla 2. Características fisiológicas de *Clavispora lusitaniae*.

Tabla 3. Perfil bioquímico de *Meyerozyma guillermondii*.

Tabla 4. Características fisiológicas de *Hanseniaspora meyeri*.

Tabla 5. Algunos compuestos de interés comercial producidos por fermentación.

Tabla 6. pH óptimo de cada levadura utilizada para el proceso de fermentación alcohólica.

Tabla 7. Tratamientos en estudio.

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A. DATOS EXPERIMENTALES

- TABLA A1. Códigos correspondientes a las levaduras aisladas de frutos de mora.
- TABLA A2. Tratamientos propuestos para el diseño experimental.
- TABLA A3. Caracterización físico-química del mosto de uva (*Vitis vinifera*)
- TABLA A4. Comportamiento de los Sólidos Solubles (°Brix) registrados durante la etapa de fermentación del mosto de uva rosada (*Vitis vinifera*).
- TABLA A5. Comportamiento del pH registrado durante la etapa de fermentación del mosto de uva rosada (*Vitis vinifera*).
- TABLA A6. Comportamiento de la acidez (% ácido tartárico) registrado durante la etapa de fermentación del mosto de uva rosada (*Vitis vinifera*).
- TABLA A7. Número de ufc por mililitro de mosto de uva rosada (*Vitis vinifera*) registrados durante el la etapa de fermentación.
- TABLA A8. Producción de etanol (%) de cada tratamiento.
- TABLA A9. Cinéticas de crecimiento para la fase exponencial de las curvas de crecimiento de cada tratamiento
- TABLA A10. Coeficientes de rendimiento de producción de etanol (Y_p/s) y de generación de biomasa (Y_m/s) respecto al sustrato consumido para cada tratamiento de estudio.

ANEXO B. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- Tabla B1. Análisis de varianza para el número de ufc por mililitro de mosto de uva rosada.
- Tabla B2. Separación de medias para el número de ufc por mililitro de mosto para la interacción AxB.
- Tabla B3. Análisis de varianza para la variación de pH del mosto.
- Tabla B4. Análisis de varianza para la acidez expresada en % ácido tartárico del mosto.
- Tabla B5. Análisis de varianza para los sólidos solubles (°Brix).
- Tabla B6. Análisis de varianza para la producción de etanol (%).
- Tabla B7. Separación de medias de la producción de etanol (%) para la interacción AxB.

ANEXO C. GRÁFICOS

FIGURA C1. Crecimiento de ufc/ml de *Candida sorbosivorans* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 12 °Brix.

FIGURA C2. Crecimiento de ufc/ml de *Wickerhamomyces onychis* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 12 °Brix.

FIGURA C3. Crecimiento de ufc/ml de *Clavispora lusitaniae* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 12 °Brix.

FIGURA C4. Crecimiento de ufc/ml de *Pichia manshurica* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 12 °Brix.

FIGURA C5. Crecimiento de ufc/ml de *Metschnikowia pulcherrima* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 12 °Brix.

FIGURA C6. Crecimiento de ufc/ml de *Pichia membranifaciens* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 12 °Brix.

FIGURA C7. Crecimiento de ufc/ml de *Hanseniaspora meyeri* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 12 °Brix.

FIGURA C8. Crecimiento de ufc/ml de *Galactomyces geotrichum* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 12 °Brix.

FIGURA C9. Crecimiento de ufc/ml de *Meyerozyma guilliermondii* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 12 °Brix.

FIGURA C10. Crecimiento de ufc/ml de *Saccharomyces cerevisiae* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 12 °Brix.

FIGURA C11. Crecimiento de ufc/ml de *Candida sorbosivorans* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 18 °Brix.

- FIGURA C12. Crecimiento de ufc/ml de *Wickerhamomyces onychis* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 18 °Brix.
- FIGURA C13. Crecimiento de ufc/ml de *Clavispora lusitaniae* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 18 °Brix.
- FIGURA C14. Crecimiento de ufc/ml de *Pichia manshurica* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 18 °Brix.
- FIGURA C15. Crecimiento de ufc/ml de *Metschnikowia pulcherrima* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 18 °Brix.
- FIGURA C16. Crecimiento de ufc/ml de *Pichia membranifaciens* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 18 °Brix.
- FIGURA C17. Crecimiento de ufc/ml de *Hanseniaspora meyeri* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 18 °Brix.
- FIGURA C18. Crecimiento de ufc/ml de *Galactomyces geotrichum* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 18 °Brix.
- FIGURA C19. Crecimiento de ufc/ml de *Meyerozyma guilliermondii* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 18 °Brix.
- FIGURA C20. Crecimiento de ufc/ml de *Saccharomyces cerevisiae* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 18 °Brix.
- FIGURA C21. Producción de alcohol etílico (%) dado de cada tratamiento.
- FIGURA C22. Comparación del mejor tratamiento a_{2b5} (18°Brix x *Metschnikowia pulcherrima*) con a_{2b10} (18°Brix x *Saccharomyces cerevisiae*).
- FIGURA C23. Producción de etanol de cada tratamiento y concentración de sólidos solubles al final de la fermentación.

RESUMEN

Para determinar la osmotolerancia de nueve levaduras aisladas de frutos de mora de castilla (*Rubus glaucus*) en la producción de alcohol se tomaron en cuenta como factores de estudio la concentración de sólidos solubles y la especie de levadura utilizada para la fermentación. Dos levaduras mostraron ser más eficientes en la producción de etanol que *Saccharomyces cerevisiae*. *Metschnikowia pulcherrima* y *Wickerhamomyces onychis*, a 18°Brix, produjeron en promedio 80% más alcohol que *Saccharomyces*, y el rendimiento de producción de etanol fue de 1,29 y 1,25 mililitro por gramo de sustrato respectivamente.

Los rendimientos de producción de biomasa por gramo de sustrato mostraron que *Meyerozyma guilliermondii*, a 18 °Brix, fue la levadura que produjo mayor cantidad de células por gramo de sustrato consumido. Se obtuvieron las cinéticas de crecimiento microbiano de los tratamientos de estudio a partir de la fase exponencial de las curvas de crecimiento mediante regresión lineal.

Los resultados obtenidos en esta investigación abren la posibilidad de preparar un bioproducto útil para la industria de producción de biocombustibles en Ecuador, aportando de esta manera con estrategias que permitan la reducción del uso de combustibles fósiles y así tener un ambiente sano y libre de contaminación.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Tema de investigación

Determinación de la Osmotolerancia de Nueve Cepas de Levaduras Aisladas de Frutos de Mora para la Aplicación Industrial en Procesos de Fermentación Alcohólica.

1.2. Planteamiento del problema

1.2.1. Contextualización

Macro

Las levaduras han tenido una gran participación en procesos fermentativos a lo largo de la historia, debido a que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Están presentes en suelos, frutas, néctar de flores y ambientes acuáticos (Ingraham & Ingraham, 1998). Estos organismos son saprófitos en su mayoría, y otros son parásitos. Debido al metabolismo anaerobio facultativo, ciertas levaduras saprófitas son las responsables del proceso de fermentación alcohólica (García, 2005).

La fermentación es un proceso bioquímico que se produce en la ausencia de oxígeno, en la que el ácido pirúvico, obtenido por glucólisis, es transformado en otro compuesto orgánico. Existen diferentes tipos de fermentación, dentro de los que se puede mencionar aquellos que permiten la producción de ácido láctico, ácido butírico, alcoholes, y ácido acético (Echeverría & Ríos, 2003). La fermentación alcohólica la realizan principalmente las levaduras. Estos hongos unicelulares sintetizan las enzimas necesarias para convertir la glucosa en etanol y dióxido de carbono. Este proceso es base de varias aplicaciones en la alimentación humana como la elaboración del pan, cerveza, vino y otras bebidas fermentadas (Decheco & Egusquiza, 2011).

Para el proceso de fermentación alcohólica, las levaduras requieren de carbohidratos como sustrato. Entre los más usados se encuentran la sacarosa de la caña de azúcar, almidones provenientes de cereales y tubérculos, y celulosa de la madera, residuos agrícolas y forestales (Hernández, 2007). La caña de azúcar es una de las materias primas más atractivas para la elaboración de etanol, debido a que los azúcares se encuentran en una forma fácilmente fermentable. Una tonelada de caña de azúcar produce entre 30 y 40 Kg de melaza, que a su vez genera entre 6,9 y 9,2 litros de alcohol. Los almidones contienen carbohidratos de mayor complejidad molecular que necesitan ser transformados en azúcares más simples introduciendo un paso adicional en la obtención de etanol, con lo que se incrementan los costos de producción. Las materias primas ricas en celulosa son las más abundantes, sin embargo la complejidad de sus azúcares hacen que la conversión a carbohidratos fermentables sea difícil y costosa (MINCETUR, 2003).

Meso

En la actualidad la importancia del etanol ha superado el nivel alimentario, convirtiéndose en un producto energético sustituto de los combustibles fósiles, con ventajas adicionales como reducir el impacto en el ambiente por la generación de gases de efecto invernadero, reducir el valor económico con el uso de biocombustibles, y mejorar la eficiencia de los automotores. En el año 2002, un 65,4% de la producción mundial de etanol fue utilizado como biocombustible (MINCETUR, 2003), y la demanda ha sido creciente. Para el año 2040 se estima que junto a otros biocombustibles, movilizará el 20% del transporte mundial frente al 3% que es en la actualidad (Ledesma, 2013).

El CONSEP (2013) realizó un estudio de la producción de alcohol artesanal en el Ecuador, con esta información se determinó que son 82 749 hectáreas de caña de azúcar que se utilizan en los ingenios para la obtención de azúcar. De ésta cantidad, el 42 606 hectáreas de caña de azúcar son utilizadas para la obtención de jugo de caña, mieles, panela y alcohol etílico. El estudio se realizó en 14 provincias en las tres regiones del país, donde se ubicaron 374 trapiches artesanales, con 1 647 personas en relación directa de trabajo en el proceso de producción y finalmente se determinó que se producen 426 730 litros mensuales de alcohol artesanal.

Micro

La fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico realizado por levaduras y algunas clases de bacterias. Donde el sustrato celular; mono y di sacáridos en su mayoría, son transformados principalmente en alcohol etílico y dióxido de carbono. Las levaduras más comúnmente utilizadas en la producción de etanol pertenecen al género *Saccharomyces*.

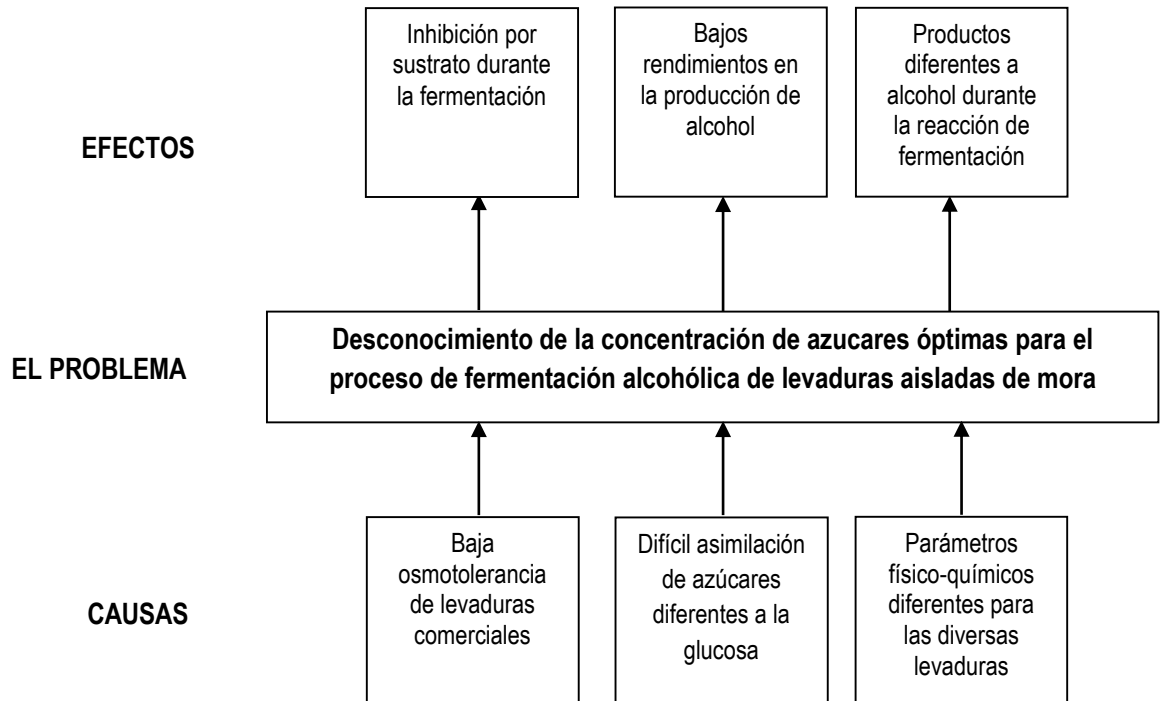
En las fermentaciones producidas por *Saccharomyces cerevisiae*, la eficiencia de concentración del mosto inicial en alcohol está alrededor del 20% (Kent & Riegel, 2007). Para obtener alcohol puro o extraneuro se requiere de un proceso adicional denominado rectificación. La destilación se encarga de eliminar impurezas, otros alcoholes y compuestos que se produjeron durante la fermentación. Las destiladoras en condiciones normales producen alcohol etílico de 96°Gay-Lussac (G.L.) que equivale al 96% en volumen (96 ml de etanol químicamente puro por cada 100 ml de alcohol producido). Este alcohol se denomina alcohol etílico rectificado extraneuro por su alto grado de pureza y calidad (Benítez *et al.*, 2008).

Saccharomyces cerevisiae produce alcohol en cantidades significativas, pero su incapacidad de crecer en un medio con altas concentraciones de azúcares, también llamada baja osmotolerancia afecta al metabolismo general de la levadura. La concentración elevada de azúcares y la acumulación de etanol en el medio inhibe el crecimiento y viabilidad de la célula, afectando a los sistemas de transporte, y por lo tanto reduce la producción de etanol (Menggen & Lewis, 2010). *S. cerevisiae* requiere una concentración inferior al 12% de azúcares en el medio y cuando la concentración supera al 15%, la levadura se inactiva y disminuye su población (Escorcia *et al.*, 2012).

En la investigación de Cevallos (2014), se obtuvieron nueve levaduras de los frutos de mora, de las que se desconoce su osmotolerancia. Por lo que el conocimiento de las concentraciones óptimas de azúcar para la producción de etanol podría mejorar la eficiencia en los procesos fermentativos con diferentes objetivos como en el área farmacéutica, alimenticia y energética.

1.2.2. Análisis Crítico

Figura 1. Diagrama Causa - Efecto



1.2.3. Prognosis

La determinación de la osmotolerancia de las levaduras aisladas de los frutos de mora permite identificar la concentración de azúcares en el cual los microorganismos producen mayor porcentaje de etanol, al no realizarse la investigación, el desconocimiento de la concentración de azúcares apropiada para las nueve especies de levadura estudiadas en la fermentación alcohólica repercutiría en la optimización de los procesos fermentativos y afectaría al rendimiento de etanol obtenido.

1.2.4. Formulación del problema

¿Es factible determinar la osmotolerancia de las levaduras aisladas de mora para su aplicación industrial en fermentación alcohólica?

1.2.5. Preguntas directrices

- ¿Cuál es la osmotolerancia óptima para las levaduras en el proceso de fermentación alcohólica?

- ¿Cuáles son las concentraciones de azúcar óptimas para el proceso de fermentación de las levaduras de frutos de mora?
- ¿Para qué se cuantifica la producción de alcohol realizada por las levaduras aisladas de frutos de mora?
- ¿Cómo se determina la cinética de crecimiento de las levaduras aisladas de frutos de mora?

1.2.6. Delimitación del Objeto de Investigación

Área: Microbiología.

Sub-área: Biotecnología Microbiana.

Sector: Levaduras

Sub-sector: Ingeniería de las Fermentaciones

1.3. Justificación

A lo largo de la historia, uno de los principales compuestos en la industria ha sido el etanol, producto de la fermentación de azúcares por parte de microorganismos. El etanol, en la actualidad, ha tomado mayor importancia por ser una fuente energética más rentable que los combustibles fósiles comúnmente utilizados como gasolina, diésel, GLP, carbón natural, etc. El etanol es usado para incrementar el octanaje de la gasolina, lo que conlleva a una reducción en el consumo de este combustible, debido a que puede mezclarse entre un 10% a 25%, o sustituirla completamente (Vásquez & Dacosta, 2007).

Otro de los principales inconvenientes de los derivados del petróleo es la grave contaminación que éstos generan por el plomo y óxidos de carbono que provoca su combustión. El uso de bioetanol reduce la contaminación que provoca toda la cadena de producción del petróleo. Esta característica ha sido aprovechada en varios países para disminuir el uso de estos combustibles y con ello reducir el impacto ambiental producido y la dependencia energética hacia estos compuestos.

El alcohol es también de gran importancia para varias industrias como química, farmacéutica, agroalimentaria, entre otras. Los vinos y otras bebidas alcohólicas deben sus propiedades organolépticas a la levadura utilizada para su fermentación, excluyendo a factores importantes como son la calidad de sustrato utilizado (uva en el caso del vino), tiempo de reposo y otros.

El uso de levaduras obtenidas de la filósfera de los frutos de mora de la Zona Centro del Ecuador puede brindar un mejoramiento a la calidad de vinos, cervezas, y bebidas fermentadas. Por lo que mejorar la producción de etanol es de importancia biotecnológica, el conocimiento de las condiciones óptimas de metabolismo de las levaduras aisladas de frutos de mora, permitirá establecer los parámetros físico – químicos en los que debe darse la fermentación alcohólica, donde el sustrato (sacarosa) y el producto (etanol) no produzcan inhibición al microorganismo o provoquen a la vez su muerte. El propósito de la investigación es conocer las concentraciones de azúcares donde las levaduras no estén inhibidas por el medio y puedan producir mayores cantidades de etanol.

Varias investigaciones han demostrado que hay levaduras presentes en la fermentación alcohólica al inicio y son *Metschnikowia pulcherrima*, *Brettanomyces intermedius*, *Debaryomyces hansenii*, *Hansenula anomala*, *Candida famata* y *Kloeckera corticis*. Las desventajas que muestran estas cepas es su baja tolerancia a la presencia de etanol, por lo que su aplicación a nivel industrial no es factible. La búsqueda de otras cepas de levaduras que si posean esta capacidad e incluso superen a *Saccharomyces cerevisiae* es el objetivo de la presente investigación.

1.4. Objetivos

1.4.1. General

- Determinar la osmotolerancia de levaduras aisladas de frutos de mora para la aplicación industrial en procesos de fermentación.

1.4.2. Específicos

- Determinar el contenido de azúcares para la realización óptima del proceso de fermentación.
- Cuantificar la producción de alcohol de nueve levaduras aisladas de frutos de mora.
- Determinar la cinética de crecimiento de cada una de las levaduras.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos

2.1.1. Levaduras

Las levaduras son hongos microscópicos unicelulares cuyas colonias se caracterizan por ser pastosas. Las dimensiones pueden oscilar de 1 a 9 μm de ancho y de 2 a 20 μm de longitud dependiendo de la especie, nutrición, edad y otros factores (Ancasi, s/f). Su forma puede variar en ovals, esféricas o casi cilíndricas y la división es asimétrica o por gemación. La reproducción puede ser también sexual por conjugación en la que se fusionan dos células, dando como resultado a un cigoto verdadero del cual emergen esporas sexuales (Madigan *et al.*, 2003). En la gemación la célula parental forma una protuberancia (yema) sobre su superficie externa. Cuando la yema se alarga y crece, el núcleo de la célula parental se divide y uno de los núcleos migra a la yema, y la yema finalmente se separa (Santamarina *et al.*, 1997).

Al ser microorganismos eucariotes poseen un núcleo definido, lo cual les permite distinguirse de las bacterias, a parte de su gran tamaño que es otra diferencia fundamental (Madigan *et al.*, 2003). Las levaduras habitan principalmente en ambientes azucarados, tales como frutos, flores, cortezas y exudados de plantas. Estos microorganismos fermentan azúcares, dando como producto alcohol y dióxido de carbono (Ingraham & Ingraham, 1998), pero si existe oxígeno, las levaduras metabolizan los azúcares hasta dióxido de carbono y agua (Santamarina *et al.*, 1997).

De acuerdo a la morfología celular de la levadura, visto bajo un microscopio, se observa la pared celular, el citoplasma con vacuolas y otros organelos característicos de una célula eucariótica. Las levaduras no poseen flagelos ni otro órgano de locomoción. Algunas levaduras segregan un material viscoso compuesto por polisacáridos que les rodea simulando una cápsula bacteriana (García, 2005).

Candida sorbosivorans

Candida sorbosivorans es una levadura halotolerante como la mayoría de levaduras. Pueden crecer en un medio que contiene una concentración de 1,5 – 2 molar de cloruro de sodio (8,5 – 11,5% p/v) (Stratford, 2006). El término *sorbosivorans* se refiere a la capacidad de nuevas especies de asimilar sorbosa, que es un monosacárido de seis carbonos que posee un grupo cetona. Las formas celulares de *C. sorbosivorans* pueden ser esféricas u ovoides, y su tamaño oscila entre 2 x 5 µm. Cuando *Candida sorbosivorans* crecen en agar papa dextrosa (PDA), agar harina de maíz o agar Gorodkova no presentan ascosporas (James *et al.*, 2001).

Tabla 1. Características fisiológicas de *C. sorbosivorans* sp. nov.

Características son calificadas como: +, positivo; L, retrasado; s, lento; w, débil; -, negativo.						
Fermentación de carbohidratos		Asimilación de compuestos de carbono		Asimilación de compuestos nitrogenados		Características de crecimiento adicionales
D-Glucosa	+	D-Glucosa	+	Nitrato	+	10% NaCl/5% Glucosa +
Sucrosa	+	D-Galactosa	s	Etilamina	+	15% NaCl/5% Glucosa +
Maltosa	-	L-sorbosa	+	Cadaverina	+	20% NaCl/5% Glucosa +
D-Galactosa	-	Sucrosa	+	L-Lisina	+	50% D-Glucosa +
Lactosa	-	Maltosa	-			60% D-Glucosa +
α,α-Trealosa	-	Galactitol	-			0,01% Cicloheximida s
Melibiosa	-	D-Manitol	+			0,1% Cicloheximida w
Melezitosa	-	Lactosa	-			Actividad de ureasa -
Rafinosa	-	Melibiosa	-			1% Ácido acético -
Metil α-D-glucósido	-	Rafinosa	L			Actividad lipolítica -
Inulina	-	Melezitosa	w			Producción de ácido -
Almidón soluble	-	D-Glucitol	+			Hidrólisis de arbutina s
		Almidón	-			Formación de almidón -
		L-Arabinosa	-			Crecimiento a 40°C +
		Glicerol	+			
		Etanol	-			

Fuente: James *et al.*, 2001.

Wickerhamomyces onychis

Wickerhamomyces onychis es una de las pocas levaduras conocidas que pueden asimilar 2,3-butanodiol, el cual es un producto de la fermentación bacteriana. Todavía su utilidad en la agricultura y alimentación es desconocida, aunque Kurtzman y colaboradores (2011) muestran que *Wickerhamomyces onychis* puede ser un patógeno oportunista humano debido a que para su investigación se obtuvo de unos aislamientos de una uña humana infectada y de una muestra de esputo.

Los requerimientos nutricionales de *Wickerhamomyces onychis* o también conocida como *Pichia onychis*, obtenidos de la investigación de Díaz y colaboradores (2005) mostraron que el máximo rendimiento de producción celular, que es $8,95 \times 10^9$ células/ml, se utilizaron 43,42 g/l de fuente de carbono y 0,261 g/l de fuente de nitrógeno orgánico y las condiciones físico-químicas utilizadas requeridas son una agitación de 110 rpm, pH 6,0 y el tiempo de fermentación de 48 horas.

Clavispora lusitaniae

Tabla 2. Características fisiológicas de *Clavispora lusitaniae*

Características son calificados como: +, positivo; L, retrasado; s, lento; w, débil; -, negativo; v, variable			
Fermentación		Asimilación - Crecimiento	
D-Glucosa	+	50% D-Glucosa	v
D-Galactosa	w, L	60% D-Glucosa	no crece
Me α -D-Glucósido	w, L	Producción de Ácido Acético	-
Sucrosa	v	Hidrólisis de Úrea	-
α,α -Trealosa	w, L	Metanol	no crece
Melibiosa	w, L	Etanol	crece
Lactosa	-	Temperaturas de pruebas de crecimiento	
Celobiosa	w, L	A 25°C	+
Melezitosa	v	A 30°C	+
Rafinosa	-	A 35°C	+
Inulina	-	A 37°C	+
Almidón	-	A 40°C	+
D-Xilosa	-	A 45°C	v

Fuente: CBS-KNAW, 2011.

Las colonias producidas por *Clavispora lusitaniae* suelen de color blanco o crema y con una apariencia surcada y textura butirosa. Las forma celular es oval y su reproducción es asexual dada por gemación y no produce endosporas. El metabolismo del género de *Clavispora* es oxidativo y fermentativo (Rodríguez, 1979).

Meyerozyma guillermondii

Tabla 3. Perfil bioquímico de *Meyerozyma guillermondii*

Características son calificados como: +, asimila; -, no asimila			
D-Galactosa	+	D- Sorbitol	+
Cicloheximida	+	D- Xilosa	+
D- Sucrosa	+	D- Ribosa	-
N- Acetil Glucosamina	+	Glicerol	+
Ácido Láctico	-	L- Ramnosa	-
L- Arabinosa	+	Palatinosa	+
D- Celobiosa	+	Eritrol	-
D- Rafinosa	+	D- Melibiosa	+
D- Maltosa	+	Glucuronato de Sodio	-
D- Trealosa	+	D- Melezitosa	+
2 – Ceto Glucanato	+	Gluconato de potasio	-
D- Manitol	+	L- Sorbosa	+
D- Lactosa	-	Glucosamina	+
Inositol	-		

Fuente: Matos *et al.*, 2014

También conocida como *Pichia guillermondii*, aunque se sugiere que se la llame *Meyerozyma*, debido a que *Pichia* es un grupo polifilético (Kurtzman *et al.*, 2011). Esta levadura puede fermentar D-xilosa, y el porcentaje estimado de alcohol producido corresponde al 18,6 del máximo teórico, las condiciones de fermentación óptimas aún no han sido determinadas.

Meyerozyma guillermondii es halófilo, resiste concentraciones máximas del 5% de cloruro de sodio en el medio. Esta especie es capaz de asimilar positivamente glucosa, sacarosa,

rafinosa, maltosa, celobiosa y xilosa así como fermenta glucosa, sacarosa, rafinosa y la fermentación de galactosa es variable (Cevallos, 2014).

La viabilidad de la célula después de ser sometido a altas temperaturas provoca que se reduzca la posibilidad de ser empleada en industrias de producción de etanol. Esta termotolerancia es similar a *Saccharomyces cerevisiae*, la cual es utilizada para fermentaciones alcohólicas (Matos *et al.*, 2014).

Pichia manshurica

La levadura *Pichia manshurica* es halófila, presenta una resistencia de hasta el 5% de cloruro de sodio en el medio. Puede asimilar glucosa (Kurtzman *et al.*, 2011) y de manera débil xilosa, sacarosa, rafinosa y almidón. La temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 25 y 28°C (Cevallos, 2014).

Pichia manshurica está presente en ambientes relacionados con vinos y tiene una estrecha relación filogenética con *Pichia membranifaciens*, la cual tiene la capacidad de producir ácido acético o acetaldehído provocando que los vinos se deterioren (Saez *et al.*, 2011).

Galactomyces geotrichum

Galactomyces geotrichum es una especie de levadura que puede asimilar y fermentar positivamente glucosa, galactosa y xilosa (Kurtzman *et al.*, 2011). *Galactomyces geotrichum* también asimila maltosa, tras un período de latencia, y bajo ciertas condiciones pueden fermentar este tipo de carbohidrato (Cevallos, 2014).

Metschnikowia pulcherrima

Metschnikowia pulcherrima habita en la zona terrestre, especialmente en flores, frutas y néctar. Sus células son de forma ovoidal, de paredes gruesas y se reproduce por gemación. Las colonias de *M. pulcherrima* son de color crema, y producen un pigmento soluble de color marrón rojizo, el cual es capaz de colorear a otras colonias y difundirse en el medio (Naurforsch & Türkel, 2009).

De acuerdo a sus características fisiológicas puede asimilar galactosa, sucrosa, maltosa, celobiosa, manitol, succinato y glucitol; en menor cantidad asimila sorbosa, salicina, citrato,

etanol y arbutina, no asimila nitratos o nitritos. La cadaverina suele ser utilizado como fuente de nitrógeno para el crecimiento de esta levadura (Kurtzman *et al.*, 2011). Pueden crecer en concentraciones de 10% de cloruro de sodio y en altas concentraciones de glucosa. *Metschnikowia pulcherrima* presenta tolerancia al etanol hasta cuando la concentración llega al 5% v/v de etanol. Cuando se supera este valor, las levaduras empiezan a morir. *Metschnikowia pulcherrima* es una levadura aeróbica, es decir el oxígeno es requerido para su metabolismo. Varios productos finales de *M. pulcherrima* como el alcohol, enzimas como lipasas y el pigmento rojo tienen efectos antimicrobianos en los organismos no deseados (Enology Access, 2010).

Hanseniaspora meyeri

La colonia formada por *Hanseniaspora meyeri*, después de un mes de crecimiento a 25°C, es de color crema, con textura butirosa, lisa y brillante, su elevación es ligeramente elevada en el centro, y su margen es entero o algo ondulado (Cadez *et al.*, 2003).

Tabla 4. Características fisiológicas de *Hanseniaspora meyeri*

Características son calificadas como: +, positivo; -, negativo							
Asimilación de carbono			Asimilación de nitrógeno				
D-Glucosa	+	Melezitosa	-	L-ramnosa	-	Etilamina	+
Celobiosa	+	Almidón	-	Sucrosa	-	Lisina	+
Arbutina	+	Glicerol	-	Maltosa	-	Cadaverina	+
2-cetogluconato	+	Ribitol	-	Melibiosa	-	Nitrito de sodio	-
D-gluconato	+	Xilitol	-	Lactosa	-		
Galactosa	-	L-arabinol	-	Rafinosa	-		
Etanol	-	Galatitol	-	Metanol	-		

Fuente: Cadez *et al.*, 2003.

Pichia membranifaciens

Pichia membranifaciens es una levadura de forma ovalo – alargada y sus células pueden estar individuales, en pares, en cadenas e incluso en grupos. Las colonias son de color amarillo – marrón, y de forma lisa. Se caracteriza por producir ácidos orgánicos responsables del deterioro de varios alimentos. Se encuentra en forma de biopelícula en la superficie del vino de mesa. Su tolerancia al etanol es de hasta el 11% en volumen y resiste

concentraciones de cloruro de sodio entre 2 y 3 molar, lo cual explica su presencia en salmueras de aceitunas (JGI, 2014).

Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae ha sido una de las levaduras más estudiadas, también conocida como la levadura de la panadería (González & Valenzuela, s/f). La morfología de *Saccharomyces cerevisiae* suele ser esférica, elipsoidal, cilíndrica o alargada y las células pueden presentarse en parejas, cadenas cortas o racimos. La colonia formada por *Saccharomyces* es de color crema y brillante, puede ser lisa o rugosa. De acuerdo a las características fisiológicas, puede asimilar y fermentar glucosa, galactosa, maltosa, sacarosa y rafinosa, y no así con lactosa. *Saccharomyces cerevisiae* produce etanol y tolera concentraciones mayores al 5% de etanol en el medio (García *et al.*, 2004).

2.1.2. El proceso de fermentación

La fermentación es un proceso catabólico que se produce por la acción de bacterias y levaduras en ausencia de oxígeno, es decir en anaerobiosis. La célula depende energéticamente de la formación de ATP producida durante la glucólisis. En condiciones de anaerobiosis las células reducen el piruvato en otros compuestos orgánicos. A este tipo de procesos se denominan fermentaciones, donde la ganancia de ATP es pobre debido ya que obtienen solo 2 moléculas de ATP por cada glucosa (Koolman & Röhm, 2004).

Los productos de la fermentación son muy variados, según el sustrato, el microorganismo y los factores que gobiernan el proceso (Müller, 1964). Desde el punto de vista comercial, las fermentaciones se clasifican de acuerdo al producto obtenido tales como células microbianas y metabolitos microbianos. Entre los principales metabolitos existen enzimas, etanol, butanol, acetona y ácidos orgánicos (Hernández, s/f).

Tabla 5. Algunos compuestos de interés comercial producidos por fermentación

Tipo de sustancia	Productos
Ácidos orgánicos	Acético, cítrico, fumárico, glucónico, itacónico, láctico
Aminoácidos	Lisina, metionina, triptófano, valina
Alcoholes y solventes	Acetona, butanol, 2,3-butanodiol, etanol, glicerol
Antibióticos	Bacitricina, estreptomicina, neomicina, penicilina, tetraciclina
Esteroides	Cortisona, hidrocortisona, testosterona
Vitaminas	Ácido ascórbico, cianocobalamina, caroteno, riboflavina
Proteína unicelular (biomasa)	Células de hongos, levaduras, bacterias y algas
Otros	Alcaloides, enzimas, insecticidas biológicos, metano y saborizantes

Fuente: Hernández, s/f.

2.1.3. Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es un conjunto de reacciones bioquímicas por la cual los azúcares se convierten en alcohol. Tiene lugar cuando no existe oxígeno en el medio. Este tipo de fermentación tiene origen en la glucólisis para formar ácido pirúvico y ATP (Müller, 1964). Este ácido de tres carbonos no ingresa al ciclo de Krebs para que se oxide totalmente, en su lugar, el ácido pirúvico se descarboxila formando acetaldehído, el cual se convierte en aceptor del hidrógeno para reducirse y así formar el alcohol etílico (Hernández, s/f). Entonces a partir de una molécula de glucosa se obtienen dos moléculas de etanol y dos de dióxido de carbono (Armstrong & Bennett, 1982). La ganancia energética en la fermentación alcohólica es muy baja debido a que toda la energía que posee la molécula de glucosa inicial permanece en el producto final, es decir el etanol (Tortora *et al.*, 2007).

La fórmula simple de la fermentación es la siguiente:



Para la fermentación alcohólica se utiliza como sustrato jugo de frutas, debido a que contienen una gran cantidad de azúcares como glucosa y fructosa. Las levaduras pueden también utilizar sacarosa para el proceso fermentativo (Hernández, s/f).

El producto final de la fermentación alcohólica es el alcohol etílico o etanol. Esta sustancia es un líquido incoloro, de olor agradable, miscible con el agua y con disolventes orgánicos. Entre sus propiedades se encuentra su acción estimulante y embriagante. Dentro del grupo de los alcoholes, el etanol es el menos tóxico, aunque si una persona ingiere medio litro de alcohol etílico puro rápidamente es suficiente para matarlo. Desde luego, incluso las bebidas alcohólicas más fuertes rara vez contienen más de 45% de etanol o 45°G.L. (Hill & Kolb, 1999).

2.1.4. Parámetros de Medición de la Fermentación Alcohólica

Sólidos Solubles Totales

Los sólidos solubles totales determinan la concentración de sacarosa por 100 mililitros de una solución, se expresan con el índice de refracción, es decir los grados brix (°Brix) a una temperatura estándar de 20°C. El refractómetro o brixómetro es el instrumento utilizado para medir la cantidad de sólidos solubles (Subirós, 2000).

Acidez del Vino

La determinación de la acidez del mosto se lleva a cabo mediante una valoración ácido-base; los resultados que se obtienen corresponden a la suma de los ácidos orgánicos presentes en el mosto cuando es titulado para llegar al pH 7 (OIV, 2012).

Destilación del Alcohol Etilico

La destilación es una operación unitaria que permite la separación de dos o más componentes que se encuentran en estado líquido (Damian *et al.*, 1998). Este proceso se realiza a presión normal y se controla la temperatura para identificar el compuesto que se volatiliza. Se puede aplicar la destilación cuando la diferencia entre los puntos de ebullición de los compuestos sea significativa. Se puede distinguir tres tipos principales de destilación: sencilla, fraccionada y al vacío (Molina *et al.*, 1991).

En la destilación sencilla se utiliza un matraz de destilación provisto de un termómetro, que va unido a un refrigerante por el que circula agua en contracorriente al líquido destilado. El líquido condensado se recoge al otro lado del refrigerante. El matraz de destilación se calienta con mecheros, y está apoyado en un soporte con rejilla. Para evitar una ebullición incontrolable del líquido a destilar se añaden unos núcleos de ebullición (Molina *et al.*, 1991).

Curva de Crecimiento Microbiano

El crecimiento microbiano indica el aumento de la población en número y no en tamaño, a diferencia de los organismos pluricelulares. Los microorganismos si se disponen en un ambiente apropiado presentan una curva donde pueden distinguirse fases como latencia, exponencial o de crecimiento logarítmico, estacionaria y de declinación o muerte (Negroni, 2009).

Fase de Latencia

Es la primera etapa de la curva de crecimiento, donde el número de células cambia muy poco debido a que no se reproducen de inmediato en un medio de cultivo nuevo. Las células permanecen inactivas durante este período, y la actividad metabólica se intensifica debido a la síntesis de enzimas y demás moléculas (Tortora *et al.*, 2007). Este período es variable y dependiendo del microorganismo consiste entre una hora a varios días (Negroni, 2009).

Fase Exponencial o de Crecimiento Logarítmico

En esta fase, las células se multiplican a la máxima velocidad, la cual es constante e independiente de la concentración de sustrato, siempre y cuando se encuentre en exceso (Hernández, s/f). La reproducción de los microorganismos se da de forma logarítmica, y es en esta fase donde las células presentan mayor actividad metabólica. También es la fase de interés en la producción industrial porque el producto se sintetiza de manera eficiente. Sin embargo, durante la fase logarítmica de crecimiento los microorganismos son mucho más sensibles a las condiciones adversas, deteniendo la velocidad de reproducción (Tortora *et al.*, 2007).

Fase Estacionaria

En esta fase la cantidad de microorganismos que nacen es igual a los que mueren (Granados & Villaverde, 2003). La tasa de crecimiento disminuye, es decir, el número de individuos muertos compensa el de células nuevas, y por lo tanto la población se estabiliza. En el caso del metabolismo, la actividad se ralentiza y como consecuencia la velocidad y cantidad de síntesis de biocompuestos disminuye (Tortora *et al.*, 2007).

Fase de Declinación o Muerte

El número de individuos muertos incrementa, superando así al de las células nuevas formadas, como resultado la población entra en la fase de declinación o muerte. Esta fase se extiende hasta que la población viable quede en una pequeña fracción de células más resistentes o todos los individuos mueran (Tortora *et al.*, 2007).

Cinética de crecimiento microbiano

La estequiometría del crecimiento celular es muy compleja y varía con las condiciones ambientales como el pH, temperatura. Con el fin de relacionar las cantidades de producto y biomasa que se forman con las cantidades de sustrato que desaparecen, se definen los coeficientes de rendimiento $Y_{M/S}$ y $Y_{P/S}$ (Izquierdo *et al.*, 2004).

$$Y_{M/S} = \frac{\text{masa células nuevas}}{\text{masa sustrato consumido para formar células nuevas}}$$

$$Y_{P/S} = \frac{\text{masa producto formado}}{\text{masa sustrato consumido para formar producto}}$$

2.1.5. Factores que afectan a la fermentación alcohólica

Influencia de la Temperatura

La temperatura es un parámetro de control importante debido a que cuando se supera a los 28°C, se volatiliza sustancias aromáticas y las levaduras empiezan a morir, lo cual concluye con un detenimiento en la fermentación (García, s/f). Por lo que en fermentaciones

alcohólicas se recomienda temperaturas en torno a los 25°C (Santamaría *et al.*, 1995), y como la reacción de fermentación es exotérmica, el calor generado debe ser retirado del proceso, debido a que estos incrementos en la temperatura afectan la actividad enzimática de las levaduras, resultando en una ralentización de la fermentación y desarrollo de bacterias mesófilas indeseadas (Gallego, 2007).

Las variaciones en la temperatura en un rango comprendido entre 4 y 40 °C afecta al funcionamiento enzimático, que puede no tener efectos sobre la mortalidad de la célula; pero pueden producir compuestos tóxicos que si provocan la muerte celular (Flancy, 2006).

Influencia del pH

El pH presente en el medio es un factor decisivo en la estabilidad biológica del mosto. Un incremento en el pH permite el desarrollo de bacterias lácticas, las cuales compiten con las levaduras por el sustrato presente en el medio causando un descenso significativo en la producción de etanol. Por lo tanto el mosto debe permanecer en un pH ácido para asegurar el crecimiento de levaduras fermentativas y no de otros microorganismos no deseados (Rojas *et al.*, 2011; Santamaría *et al.*, 2005).

Influencia de la concentración de azúcares en el metabolismo microbiano

La fuente de carbono que necesitan las levaduras para el metabolismo es suministrado por los azúcares contenidos en el mosto, por lo que su valor debe ser considerado debido a que puede afectar a la velocidad de fermentación, el comportamiento y el desarrollo de las células de la levadura (Sigifredo & Stroppiano, s/f).

La concentración de azúcar es un factor de estrés para las levaduras cuando es alto, debido al incremento en la presión osmótica dentro del medio. Concentraciones de azúcar de entre el 10 y 18% son utilizadas para la fermentación, siendo el valor más común el 12%. Cuando la concentración asciende al 22% de azúcar la levadura sufre una deficiencia respiratoria y la velocidad de fermentación desciende (Sigifredo & Stroppiano, s/f).

Acción Inhibitoria del Etanol sobre el Metabolismo de las Levaduras

El etanol es un producto de la fermentación que puede interferir en la ruta metabólica como consecuencia de la retroinhibición. Aunque la acción inhibitoria del etanol se debe mayoritariamente a sus propiedades como sustancia y no como metabolito (Troyer, 1955). El efecto que tiene el etanol sobre varias moléculas se debe a su capacidad para interactuar con lípidos y proteínas como disolvente y agente desnaturizante. El etanol es un inhibidor no competitivo, es decir, afecta a las tasas de crecimiento y fermentación máximas, y no a la afinidad con el sustrato (Villar, 1992).

2.2. Fundamentación filosófica

La investigación científica es un proceso de ejercicio del pensamiento humano que implica la descripción de aquella porción de la realidad que es objeto de estudio, la explicación de las causas que determinan las particularidades de su desarrollo, la aproximación predictiva del desenvolvimiento de los fenómenos estudiados, la valoración de las implicaciones ontológicas de los mismos, así como la justificación o no de su análisis.

La filosofía y la ciencia son actividades que sólo se pueden desplegar a través del acto de la investigación. Este presupone exploración del objeto en cuestión, búsqueda, examen e indagación de sus particularidades y causas que lo producen, determinación de sus tendencias de desarrollo, previsión de sus posibles alternativas de desenvolvimiento.

La presente investigación se basa en el paradigma positivista que fue creado para estudiar los fenómenos en el campo de las ciencias naturales. Tiene como escenario de investigación el laboratorio y muestreo, a través de un diseño estructurado y esquematizado. Su lógica de análisis está orientado a lo confirmatorio, reduccionista, verificación, inferencial e hipotético deductivo mediante el respectivo análisis de resultados. Además la realidad es única y fragmentable en partes que se pueden manipular independientemente, y la relación sujeto-objeto es independiente. Para este enfoque la realidad es algo exterior, ajeno, objetivo y puede y debe ser estudiada y por tanto conocida. Para el paradigma positivista el estudio del conocimiento existente en un momento dado conduce a la formulación de nuevas hipótesis, en la cuales se interrelacionan variables, cuya medición cuantitativa, permitirá comprobarlas o refutarlas en el proceso de investigación.

2.3. Fundamentación legal

Al abordar la legislación ecuatoriana en relación a la biotecnología se tendrá en cuenta la conservación de la biodiversidad y la biotecnología humana.

Se entiende por biotecnología la aplicación de la biología con fines humanos empleando la potencialidad de los seres vivos y su eventual modificación selectiva y programada para la obtención de bienes y servicios mediante la utilización de microorganismos para la producción de alimentos y bebidas o de nuevas disciplinas como la ingeniería genética.

Art. 80.- El Estado fomentará la ciencia y la tecnología, especialmente en todos los niveles educativos, dirigidas a mejorar la productividad, la competitividad, el manejo sustentable de los recursos naturales, y a satisfacer las necesidades básicas de la población.

Garantizará la libertad de las actividades científicas y tecnológicas y la protección legal de sus resultados, así como el conocimiento ancestral colectivo.

La investigación científica y tecnológica se llevará a cabo en las universidades, escuelas politécnicas, institutos superiores técnicos y tecnológicos y centros de investigación científica, en coordinación con los sectores productivos cuando sea pertinente, y con el organismo público que establezca la ley, la que regulará también el estatuto del investigador científico.

Art. 385.- El sistema nacional de ciencia, tecnología, innovación y saberes ancestrales, en el marco del respeto al ambiente, la naturaleza, la vida, las culturas y la soberanía, tendrá como finalidad:

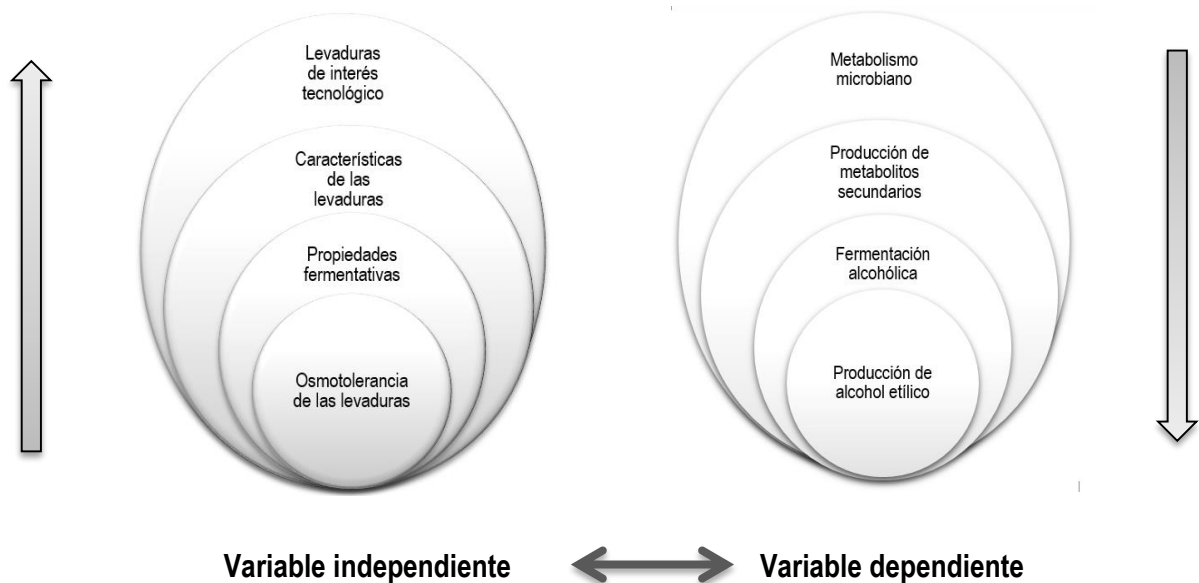
1. Generar, adaptar y difundir conocimientos científicos y tecnológicos.
3. Desarrollar tecnologías e innovaciones que impulsen la producción nacional, eleven la eficiencia y productividad, mejoren la calidad de vida y contribuyan a la realización del buen vivir.

Art. 387.- Será responsabilidad del Estado:

1. Facilitar e impulsar la incorporación a la sociedad del conocimiento para alcanzar los objetivos del régimen de desarrollo.
3. Asegurar la difusión y el acceso a los conocimientos científicos y tecnológicos, el usufructo de sus descubrimientos y hallazgos en el marco de lo establecido en la Constitución y la Ley.
4. Garantizar la libertad de creación e investigación en el marco del respeto a la ética, la naturaleza, el ambiente, y el rescate de los conocimientos ancestrales.

2.4. Categorías fundamentales

Figura 2. Categorías fundamentales para las variables independiente y dependiente



2.5. Hipótesis

Hipótesis nula

- Ninguna de las nueve especies de levaduras aisladas de frutos de mora produce un mejor rendimiento en la producción de etanol en altas concentraciones de azúcares que *Saccharomyces cerevisiae*.

Hipótesis alternativa

- Al menos una de las nueve especies de levaduras aisladas de frutos de mora produce un mejor rendimiento en la producción de etanol en altas concentraciones de azúcares que *Saccharomyces cerevisiae*.

2.6. Señalamiento de variables de la hipótesis

- Número de unidades formadoras de colonias de levaduras por ml de mosto fermentado (ufc/ml).
- Rendimiento de alcohol etílico producido por las diferentes cepas de levaduras durante la fermentación.

- Pruebas de fermentación de las levaduras a diferente concentración de sólidos solubles suspendidos (°Brix) de mosto.
- Curva de crecimiento de cada levadura durante el proceso de fermentación alcohólica.
- Cambio de pH debido a la fermentación alcohólica.
- Medición de la acidez expresada en porcentaje de ácido tartárico.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1. Modalidad básica de la investigación

La investigación se sustenta en la modalidad experimental puesto que se realizó ensayos de laboratorio, controlando y manipulando variables con el propósito de obtener resultados para cumplir los objetivos planteados.

3.2. Nivel o tipo de investigación

El tipo de investigación que se utilizó es experimental, ya que se basa en resultados dados en el laboratorio y se aplicó los principios del Método Científico.

3.3. Población y muestra

Las levaduras utilizadas para la determinación de la osmotolerancia fueron aisladas de frutos de mora de castilla (*Rubus glaucus*), investigación realizada por Cevallos (2014). Las levaduras fueron *Candida sorbosivorans*, *Wickerhamomyces onychis*, *Clavispora lusitaniae*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia manshurica*, *Galactomyces geotrichum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora meyeri* y *Pichia membranifaciens*. Mientras que la levadura utilizada para el control fue *Saccharomyces cerevisiae*.

3.4. Operacionalización de variables

Figura 3. Operacionalización de las variables independiente y dependiente

HIPÓTESIS	VARIABLE	CONCEPTO	INDICADOR	ÍNDICES	INSTRUMENTOS
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">La osmotolerancia de las nueve levaduras aisladas de frutos de mora es menor que <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.</p>	<p>Independiente: Osmotolerancia de las levaduras</p>	<p>Capacidad que tienen las levaduras para crecer en altas concentraciones de azúcares</p>	<p>Población microbiana</p>	<p>UFC/ml</p>	<p>Cámara de Neubauer Microscopio Microsoft Excel</p>
	<p>Dependiente: Producción de etanol en la fermentación</p>	<p>Producto fundamental de la fermentación alcohólica realizado por las levaduras</p>	<p>Volumen de alcohol producido Acidez pH Sólidos solubles totales</p>	<p>Rendimiento de la producción de etanol % Ácido tartárico pH °Brix</p>	<p>Equipo de destilación Probeta Equipo de titulación Potenciómetro Refractómetro Microsoft Excel. Software estadístico NTSys</p>

3.5. Plan de recolección de información

3.5.1. Recepción

Se adquirió uva rosada (*Vitis vinífera*) en estado maduro y óptimas condiciones en el Mercado Mayorista de Ambato.

3.5.2. Preparación del mosto de uva

La variedad de uva seleccionada para la preparación del mosto fue la uva rosada (*Vitis vinífera*). Antes de proceder a la extracción del jugo, la fruta se lavó con agua corriente y se pesó 111 kilos en una balanza para obtener 70 litros de jugo de uva. La extracción del jugo se realizó por prensado de la fruta. Se filtró el jugo obtenido con una malla de plástico y lienzo previamente esterilizados. Se mezcló el jugo de uva con igual cantidad de agua estéril en relación 1:1 lo que permitió obtener el mosto madre. Se midió el pH y se reguló hasta obtener un pH igual a 5 adicionando hidróxido de sodio 1M. Con el refractómetro, se midió los °Brix y se trabajó a 12 y 18°Brix se adicionó sacarosa al mosto para alcanzar este valor. Se agregó además fosfato de amonio en una concentración de 150 ppm.

3.5.3. Pasteurización del mosto

Se realizó el tratamiento térmico de pasteurización del mosto, el cual fue a 70°C durante 15 minutos, y posteriormente un descenso de temperatura hasta los 18°C. Este tratamiento permitió descender la cantidad de microorganismos.

3.5.4. Caracterización físico-química del mosto

Se midió los parámetros de acidez y pH para el mosto madre. Para determinar la acidez se tituló con hidróxido de sodio 0,1 N a 1 ml de mosto que se encontraba en disolución con 9 ml de agua destilada. El pH fue medido con un potenciómetro HANNA modelo HI 991003, para tomar las lecturas se lavó el bulbo con agua destilada y se sumergió en el mosto hasta obtener el dato correspondiente. El pH óptimo para cada levadura fue detallado en la tabla 6.

Tabla 6. pH óptimo de cada levadura utilizada para el proceso de fermentación alcohólica

Levadura	Código	Rango de pH óptimo de crecimiento
<i>Candida sorbosivorans</i>	CLQCA 12-074	3,5 – 6,5
<i>Wickerhamomyces onychis</i>	CLQCA 12-075	3,5 – 7,5
<i>Clavispora lusitaniae</i>	CLQCA 12-077	3,5 – 7,5
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	CLQCA 12-078	3,5 – 7,5
<i>Pichia manshurica</i>	CLQCA 12-084	3,5 – 7,5
<i>Galactomyces geotrichum</i>	CLQCA 12-085	3,5 – 7,5
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	CLQCA 12-086	3,5 – 7,5
<i>Hanseniaspora meyeri</i>	CLQCA 12-087	3,5 – 5,5
<i>Pichia membranifaciens</i>	CLQCA 12-088	3,5 – 5,5

Fuente: Cevallos, 2014.

3.5.5. Preparación de las levaduras

Preparación del medio líquido YPD

El medio extracto de levadura peptona dextrosa (YPD), fue utilizado para el crecimiento de levaduras. Estuvo compuesto por 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, y 20 g de glucosa o dextrosa y un litro de agua destilada. Se preparó 250 ml de medio de cultivo en botellas de tapa azul por cada levadura para su reproducción y posterior inoculación. Se esterilizó el medio de cultivo en la autoclave a 121 ° C y una presión igual a 1 atm durante 15 minutos.

Inoculación de las levaduras

Se tomaron 50 µl de cada especie de levadura y se inocularon en 250 ml de caldo de cultivo YPD estéril. Las cepas de levaduras se encontraban almacenadas en tubos crioviales a -4°C en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato. Para la homogenización de los cultivos se inocularon 4×10^5 ufc/ml de levaduras en los mostos de cada tratamiento.

3.5.6. Fermentación

La fermentación se desarrolló en biorreactores artesanales de plástico con una capacidad de 5 litros. Se colocó una manguera en la tapa del biorreactor para evacuar el dióxido de carbono formado durante el proceso de fermentación. Se fermentó 3,5 litros de mosto, dejando libre un volumen de 1,5 litros que fueron utilizados para la acumulación de gases formados y con ello evitar una presión excesiva en el recipiente. En el biorreactor se dispuso una llave que permitía tomar la muestra del centro del fermentado.

El proceso de fermentación alcohólica se realizó sin agitación y en ausencia de luz, durante 20 días, en los cuales se midió diariamente los °Brix, acidez y pH. Este proceso culminó cuando los °Brix permanecieron constantes. Se tomó una alícuota de 10 ml del mosto fermentado del centro del biorreactor para medir las variables.

3.5.7. Determinación del pH

Se tomó 10 mL de mosto en fermentación y con un potenciómetro portátil HANNA modelo HI 991003 se obtuvo las medidas correspondientes. El mosto inicial tuvo un pH igual a 5, donde todas las levaduras aisladas de frutos de mora (*Rubus glaucus*) crecieron óptimamente (Cevallos, 2014).

3.5.8. Determinación de Sólidos Solubles

La cuantificación de °Brix se realizó en un refractómetro donde se dispuso unas gotas del mosto y se leyó el valor que indica el instrumento.

3.5.9. Determinación de la acidez del vino

Se colocó 1 mililitro de la muestra del mosto y 9 mililitros de agua destilada, junto con unas gotas de fenolftaleína, para la posterior titulación con hidróxido de sodio 0,1 molar hasta que las muestras cambien su coloración.

La cantidad de mililitros de reactivo gastados indicaron el número de gramos de acidez total expresada en % ácido sulfúrico. Para expresarlo en % ácido tartárico, se multiplicó el volumen gastado por el factor de corrección 1,53. Si bien el ácido sulfúrico no se encontraba presente en la lista de ácidos del vino, fue una forma convencional que permitió

comparar los resultados obtenidos en la valoración, evitando la cuantificación de cada ácido presente en el vino.

3.5.10. Cinética microbiana

Después de la inoculación, se tomaron muestras para cuantificar el número de células reproducidas en el mosto. Para ello se requirió de una cámara de Neubauer que estaba adaptada al microscopio óptico. Se observó la retícula al microscopio con el aumento adecuado y mediante conteo directo se obtuvo el número de células. Al conocer el volumen de líquido que admite el campo de la retícula, se calcularon las concentraciones de células en la muestra líquida aplicada.

Se calcularon los tiempos de generación para cada tratamiento de estudio y los coeficientes de rendimiento de producción de biomasa y de producto por gramo de sustrato. Se utilizaron los datos correspondientes a la fase exponencial de la curva de crecimiento.

$$N = N_0 2^n$$

$$\text{Tiempo de Generación} = t/n$$

Donde:

N: número final de células

N_0 : número inicial de células

n: número de generaciones que ha ocurrido durante el período de fase exponencial.

t: tiempo transcurrido entre cada generación

$$Y_{M/S} = \frac{\text{masa células nuevas}}{\text{masa sustrato consumido para formar células nuevas}}$$

$$Y_{P/S} = \frac{\text{masa producto formado}}{\text{masa sustrato consumido para formar producto}}$$

Donde:

$Y_{M/S}$: Coeficiente de rendimiento para la producción de biomasa por gramo de sustrato consumido.

$Y_{P/S}$: Coeficiente de rendimiento para la producción de etanol por gramo de sustrato consumido.

3.5.11. Destilación del Alcohol Etilico

Se realizó la destilación al terminar el proceso fermentativo que fue a los 20 días. Se tomó 500 ml del mosto fermentado y se dispuso en el balón del equipo de destilación. Para destilar alcohol etílico se debe tener una temperatura de 80°C, el cual es el punto de ebullición del etanol, a continuación pasa por un refrigerante, donde el alcohol evaporado se condensa. En una probeta se estimó el volumen de alcohol etílico. Se calcularon los porcentajes de rendimiento para los tratamientos realizando una regla de tres entre el volumen utilizado de mosto para destilar y el volumen obtenido de etanol después de la destilación.

3.6. Plan de procesamiento y análisis de la información

3.6.1. Diseño experimental

Se estudiaron dos factores, por lo que se utilizó un diseño factorial de A x B con 2 repeticiones. Los factores en estudio fueron:

Factor A: °Brix en los mostos

a₁ 12 °Brix

a₂ 18° Brix

Factor B: Levaduras utilizadas

b₁ *Candida sorbosivorans*

b₂ *Wickerhamomyces onychis*

b₃ *Clavispora lusitaniae*

b₄ *Meyerozyma guilliermondii*

b₅ *Pichia manshurica*

b₆ *Galactomyces geotrichum*

b₇ *Metschnikowia pulcherrima*

b₈ *Hanseniaspora meyeri*

b₉ *Pichia membranifaciens*

b₁₀ *Saccharomyces cerevisiae*

En la tabla 7 se muestran los tratamientos producto de la combinación de los factores en estudio.

Tabla 7. Tratamientos en estudio.

TRATAMIENTOS	A: °BRIX DEL MOSTO	B: LEVADURA
a ₁ b ₁	12 °Brix	<i>Candida sorbosivorans</i>
a ₁ b ₂	12 °Brix	<i>Wickerhamomyces onychis</i>
a ₁ b ₃	12 °Brix	<i>Clavispora lusitaniae</i>
a ₁ b ₄	12 °Brix	<i>Pichia manshurica</i>
a ₁ b ₅	12 °Brix	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
a ₁ b ₆	12 °Brix	<i>Pichia membranifaciens</i>
a ₁ b ₇	12 °Brix	<i>Hanseniaspora meyeri</i>
a ₁ b ₈	12 °Brix	<i>Galactomyces geotrichum</i>
a ₁ b ₉	12 °Brix	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
a ₁ b ₁₀	12 °Brix	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
a ₂ b ₁	18 °Brix	<i>Candida sorbosivorans</i>
a ₂ b ₂	18 °Brix	<i>Wickerhamomyces onychis</i>
a ₂ b ₃	18 °Brix	<i>Clavispora lusitaniae</i>
a ₂ b ₄	18 °Brix	<i>Pichia manshurica</i>
a ₂ b ₅	18 °Brix	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
a ₂ b ₆	18 °Brix	<i>Pichia membranifaciens</i>
a ₂ b ₇	18 °Brix	<i>Hanseniaspora meyeri</i>
a ₂ b ₈	18 °Brix	<i>Galactomyces geotrichum</i>
a ₂ b ₉	18 °Brix	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
a ₂ b ₁₀	18 °Brix	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

El esquema del análisis de varianza se muestra en la tabla 8. En caso de encontrar diferencias significativas entre los tratamientos se separó las medias mediante la prueba de Tukey al 5% de significancia.

Tabla 8. Esquema del análisis de varianza.

Fuente de Variación	Grados de libertad
Factor A	$(a - 1)$
Factor B	$(b - 1)$
AB	$(a-1)(b-1)$
Error	$(ab)-1$
Total	$abr-1$

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Análisis de Resultados

Levaduras utilizadas para el proceso fermentativo

Para el proceso de fermentación se utilizaron diez diferentes levaduras, los nombres y la codificación se muestran en la Tabla A1 (Anexo A).

Caracterización físico-química del mosto

En la Tabla A3 (Anexo A), se aprecian los valores iniciales de pH, acidez expresado en porcentaje de ácido tartárico y sólidos solubles (°Brix), notándose que estos últimos son parte del diseño experimental propuesto (12 y 18 °Brix). El valor de pH inicial fue corregido con hidróxido de sodio para cada tratamiento con la finalidad de empezar la fermentación en un valor de pH 5. La acidez fue dependiente a la cantidad de ácido tartárico que contenía las uvas utilizadas para la elaboración del mosto, siendo este valor diferente en los dos ciclos de la fermentación.

MEDICIÓN DE LAS VARIABLES DURANTE LA FERMENTACIÓN

Variación de los Sólidos Solubles

El registro del comportamiento de los sólidos solubles medidos en °Brix se observan en la Tabla A4 (Anexo A). Estos valores fueron dependientes del metabolismo de cada levadura utilizada.

Se utilizaron los °Brix iniciales como factor A del diseño experimental, correspondientes a 12 y 18 °Brix. El decrecimiento de estos valores mostró que existe diferencia significativa para el factor A (°Brix), estos valores se señalan en la Tabla B5 (Anexo B). Debido a esta diferencia significativa del factor A (°Brix) se encontraron rangos distintos para 12 y 18°Brix.

El decrecimiento de los sólidos solubles en contraste con la producción de biomasa a 12°Brix para *Candida sorbosivorans* (CC001), *Wickerhamomyces onychis* (CC004), *Clavispora lusitaniae* (CC017), *Pichia manshurica* (CC025), *Metschnikowia pulcherrima* (CC029), *Pichia membranifaciens* (CC036), *Hanseniaspora meyeri* (CC039), *Galactomyces geotrichum* (CC041), *Meyerozyma guilliermondii* (CC043) y *Saccharomyces cerevisiae* (GC00) están expresados en las Figuras C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 y C10 (Anexo C) respectivamente, mientras que las Figuras C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23 y C24 (Anexo C) respectivamente, corresponden a 18 °Brix.

Variación del pH en el proceso de fermentación alcohólica

En la Tabla A5 (Anexo A) se observa el comportamiento del pH que fue registrado durante el proceso de fermentación de cada levadura y su réplica. De acuerdo al análisis de varianza en la Tabla B3 (Anexo B) demuestra que no existe diferencia significativa para los factores y para la interacción AxB.

Variación de la acidez expresada en % ácido tartárico del mosto durante el proceso de fermentación alcohólica

Los valores de acidez registrados se muestran en la Tabla A6 (Anexo A), mientras que el análisis de varianza para la acidez se aprecia en la Tabla B4 (Anexo B), donde se obtiene diferencia significativa para el factor A referido a los sólidos solubles °Brix, por lo que en la separación de medias se encontraron dos rangos para este factor.

Determinación de la concentración de levaduras en los mostos de fermentación (ufc/ml)

El número de unidades formadoras de colonia por mililitro de mosto se encuentra en la Tabla A7 (Anexo A). En la Tabla B1 (Anexo B) se encuentra el análisis de varianza para el número de ufc/ml de mosto, donde se muestra que existe diferencia significativa para los factores A (°Brix), B (Levaduras) y la interacción AxB (°Brix x Levaduras). La separación de medias

para la interacción AxB se encuentra en la Tabla B2 (Anexo B), dónde se puede apreciar tres diferentes rangos.

Las curvas de crecimiento microbiano para *Candida sorbosivorans* (CC001), *Wickerhamomyces onychis* (CC004), *Clavispora lusitaniae* (CC017), *Pichia manshurica* (CC025), *Metschnikowia pulcherrima* (CC029), *Pichia membranifaciens* (CC036), *Hanseniaspora meyeri* (CC039), *Galactomyces geotrichum* (CC041), *Meyerozyma guilliermondii* (CC043) y *Saccharomyces cerevisiae* (GC00) están expresados en las Figuras C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 y C10 (Anexo C) respectivamente, las cuales pertenecen al primer factor A de 12°Brix; mientras que las Figuras C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19 y C20 (Anexo C) corresponden a 18°Brix. Estas figuras están contrastadas con los valores de consumo de sólidos solubles (°Brix) durante el tiempo de fermentación.

Cinética de Crecimiento de las Nueve Especies de Levadura

Las cinéticas de crecimiento para cada tratamiento se establecieron para la fase exponencial de las curvas de crecimiento. En la Tabla A9 (Anexo A) se encuentran las ecuaciones cuando las condiciones iniciales son 12 y 18 °Brix. Mientras que los coeficientes de rendimiento de la producción de etanol y de generación de biomasa respecto a la cantidad de sustrato consumido se encuentra en la Tabla A10 (Anexo A). En la Tabla A11 (Anexo A) se muestran los tiempos de generación microbiana para cada tratamiento de estudio.

Producción de alcohol etílico

El porcentaje de etanol producido durante la fermentación se aprecian en la Tabla A8 (Anexo A), y en la Tabla B8 (Anexo B) muestra el análisis de varianza para este resultado, existe diferencia significativa para los factores A (°Brix), B (Levaduras) y la interacción AxB (°Brix x Levaduras). La separación de medias de la producción de etanol muestra 5 rangos diferentes para la interacción AxB, en la Tabla B10 (Anexo B). La Figura C4 (Anexo C), muestra claramente los rangos obtenidos de la interacción de ambos factores.

En la Figura C21 (Anexo C), se observa la producción en porcentaje de alcohol etílico, el mejor tratamiento es a_{2b5} y a_{2b2} pertenecientes a 18 °Brix y a *Metschnikowia pulcherrima* y *Wickerhamomyces onychis*, respectivamente. La Figura C23 (Anexo C) muestra la producción de etanol y los sólidos solubles (°Brix), datos obtenidos al finalizar la fermentación.

4.2. Interpretación de datos

ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS REALIZADOS DURANTE LA ETAPA DE FERMENTACIÓN

Sólidos Solubles

Durante el proceso de fermentación, los sólidos solubles son consumidos por los microorganismos inoculados en el mosto, por lo tanto se registra un decrecimiento en sus valores, lo cual se aprecia en la Tabla A4 (Anexo A). El consumo de los azúcares se direcciona a la obtención de etanol y creación de nueva biomasa.

Los sólidos solubles (°Brix) fue un factor del diseño experimental, se inició el proceso de fermentación con valores de 12 y 18 °Brix. Después de haber transcurrido el tiempo de fermentación se observó una disminución significativa. De acuerdo a la Figura C3 (Anexo 3) se observan los rangos para ambos parámetros y se determinó que cuando el factor A es 18°Brix el consumo de azúcares es elevado, por lo cual se infiere en que las levaduras presentan una alta osmotolerancia.

El registro de °Brix apreciados en las Figuras C1 hasta la Figura C20 (Anexo C) indica que el decaimiento de los valores se produce en forma paulatina, y al comparar los valores finales con el porcentaje de etanol producido por cada tratamiento se aprecia que cuando hay 12 °Brix, existe una baja producción de alcohol, mientras que a los 18°Brix existe un mayor producción en el porcentaje de etanol. Estos datos indican una relación directamente proporcional, en baja concentración de sustrato, la producción de etanol es menor, y en alta concentración de sustrato, el porcentaje de bioetanol obtenido es mayor.

pH

El valor obtenido como pH inicial en el mosto fue dependiente del tipo y madurez de la uva utilizada.

Se reguló el pH hasta 5 porque en este valor mostraban crecimiento todas las levaduras utilizadas durante la investigación. En la Tabla B3 (Anexo B), el análisis estadístico demuestra que no existen diferencias significativas en los factores y en la interacción AxB.

Acidez (%Ác. Tartárico)

El ácido que se encontraba en mayor concentración en la uva rosada (*Vitis vinifera*) es el ácido tartárico. En el proceso de fermentación, los microorganismos consumen diversas fuentes de carbono y entre ellas está el ácido tartárico, por lo que la acidez va disminuyendo de acuerdo al tiempo de fermentación, como se observa en la Tabla A6 (Anexo A). A los 20 días de fermentación disminuyó la acidez expresada en porcentaje de ácido tartárico. La Tabla B4 (Anexo B) muestra diferencia significativa para el factor A (°Brix), esto se debe a que el proceso experimental fue desarrollado en dos etapas. Las uvas utilizadas para la realización del mosto poseían diferente acidez inicial.

Concentración de levaduras (ufc/ml)

La concentración inicial de levaduras fue de 4×10^5 ufc/ml, y mediante la técnica de conteo directo en hemocitómetro, se determinó las concentraciones de los siguientes días, alrededor de los días 7 y 8 se observa un incremento muy alto de la población, y días después empieza a decaer el número de ufc/ml de mosto. El descenso de la población se debe a la sedimentación de los microorganismos debido a que no había agitación en los biorreactores.

En el análisis de varianza mostrado en la Tabla B1, se obtiene diferencia significativas para los factores A (°Brix) y B (Levaduras) y para su interacción AxB (°Brix x Levaduras). Se determina que la combinación a_2b_6 (18°Brix x *Pichia membranifaciens*) puede reproducirse más rápido en comparación con las otras levaduras.

Cinética de crecimiento microbiano

Las ecuaciones del crecimiento microbiano para cada tratamiento se obtuvieron a partir de la fase exponencial de las curvas. Con las cinéticas presentadas se pudo conocer la cantidad de biomasa generada por día de fermentación. La información obtenida no considera la fase de latencia, que es el período de adaptabilidad de la levadura, por lo que el tiempo calculado de la fermentación está sujeto a cambios dependientes de cada especie y condiciones iniciales.

La generación de biomasa por unidad de sustrato muestra que la levadura que produce más células por unidad de sustrato fue *Meyerozyma guilliermondii*, a 12°Brix iniciales, con un valor de $5,48 \times 10^7$ células/°Brix consumido, pero su rendimiento en la generación de producto es bajo 0,355 ml de etanol/°Brix consumido. Estos datos la convierten en una especie no viable para procesos de fermentación alcohólica. Por otro lado, el coeficiente de rendimiento de producción de biomasa para *Metschnikowia pulcherrima*, a 18°Brix, fue $3,81 \times 10^5$, y el coeficiente de producción de etanol fue 1,29. Esta especie produjo metabolitos en lugar de reproducirse. Con estos resultados se apreció una relación inversamente proporcional respecto a la producción de alcohol etílico y de biomasa, una rápida reproducción de las células no garantizó su eficiencia en la producción de etanol.

Producción de etanol

El porcentaje de etanol producido por las levaduras durante la fermentación indica una mayor producción en el factor A de 18 °Brix en contraste con los 12 °Brix, por ello se descarta la posibilidad de existir inhibición por exceso de sustrato en la producción de etanol.

De acuerdo a la Tabla B8 (Anexo B) del análisis de varianza, con una confianza del 95%, existe diferencia significativa para el factor A, B y para la interacción AxB, por lo que se distinguen cinco niveles de rangos, siendo las combinaciones a_2b_5 (18°Brix y *Metschnikowia pulcherrima*) y a_2b_2 (18°Brix y *Wickerhamomyces onychis*) las que muestran mayor porcentaje de producción de etanol, incluso mayor en contraste con la cepa de control

(*Saccharomyces cerevisiae*). En la Figura C4 (Anexo C) se verifica que GC00 (*Saccharomyces cerevisiae*) produce 8,71% de etanol por cada 100 ml de mosto y CC029 (*Metschnikowia pulcherrima*) y CC004 (*Wickerhamomyces onychis*) producen 15 y 11,65% de etanol por 100 ml de mosto fermentado respectivamente, lo cual representa un incremento del 72,21% y 33,75% en la producción de etanol respecto a GC00.

En la Figura C26 (Anexo C), se compara el mejor tratamiento (a_2b_5) y el control (a_2b_{10}). La catálisis de azúcares de *Saccharomyces cerevisiae* (a_2b_{10}) es rápido hasta el día 8, a partir del cual el descenso de los sólidos solubles se estabiliza hasta el día 20 del proceso fermentativo. Al compararlo con la curva de crecimiento microbiano se observa la relación inversamente proporcional entre el consumo de sustrato y la producción de biomasa. A pesar de mostrar una adaptación rápida en el medio, la producción de etanol no fue la más eficiente, aunque *Metschnikowia pulcherrima* tiene una fase de latencia más prolongada que *Saccharomyces cerevisiae* con respecto al consumo de sustrato e incremento de ufc/ml, la producción de etanol es mayor, por lo tanto estos parámetros no determinan su efectividad.

Discusión general del trabajo

En la determinación de la osmotolerancia, las 10 levaduras evaluadas, incluyendo el control (*Saccharomyces cerevisiae*), crecen en ambientes de elevada concentración de azúcares, contrario a lo expuesto en la investigación desarrollada por Escorcía et al. (2012), donde se estableció que *S. cerevisiae* requiere una concentración inferior a 12% de azúcares en el medio y cuando la concentración supera al 15%, la levadura se inactiva y disminuye su población. Esta información fue equívoca debido a que las levaduras crecieron y optimizaron su proceso de fermentación a una concentración de 18°Brix o 18 gramos de azúcar por 100 gramos de mosto.

Saccharomyces cerevisiae produjo alrededor del 8% de etanol, en comparación con los 4-6% v/v de etanol obtenidos en la investigación de Escalante y colaboradores (2011), lo cual muestra similitud en los resultados obtenidos. En contraste con *Saccharomyces cerevisiae*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Wickerhamomyces onychis* produjeron un 80%

más de etanol. La producción de etanol por otras especies de levaduras suelen ser bajas, como lo demuestra Escalante y colaboradores, donde *Hanseniaspora uvarum* produjo alrededor del 2% v/v de etanol. *Hanseniaspora meyeri* produjo un valor cercano al reportado en bibliografía cuando la concentración inicial de sólidos solubles fue 12°Brix, pero cuando aumentó la concentración hasta 18°Brix, el porcentaje de producción incrementó significativamente hasta obtener un valor aproximado del 8% de etanol.

Pichia membranifaciens (CC036) presentó el mejor crecimiento respecto a la producción de biomasa, en contraste con la producción de etanol donde el resultado obtenido sólo fue de 8,28%, por lo tanto se infiere que el consumo de azúcares fue destinado para la producción de biomasa y no al producto de interés. *Metschnikowia pulcherrima* y *Wickerhamomyces onychis* al ser las mejores cepas productoras de etanol en altas concentraciones de azúcares, pueden ser utilizados para futuras investigaciones.

Como fuentes de carbono se utilizó sacarosa, monosacáridos y ácidos orgánicos propios de la uva como glucosa, fructosa y el ácido tartárico. Las levaduras consumieron principalmente las fuentes de azúcar, por lo que el porcentaje de ácido tartárico solo se ve afectado por los °Brix iniciales y por el valor inicial de acidez debido a que la uva utilizada difiere en tiempos de cosecha.

El crecimiento de las levaduras se produce de manera exponencial y, cuando los valores de sólidos solubles decrecen, el número de ufc/ml del mosto también, presumiblemente debido al etanol presente, porque este inhibe el crecimiento microbiano. Según Escalante y colaboradores (2011) mencionan que durante la fermentación alcohólica no es recomendable agitar el medio porque afecta la producción de etanol. El proceso fermentativo se realizó sin agitación, lo que provocó la sedimentación de las levaduras y disminución acelerada en el número de levaduras/ml en las alícuotas tomadas del mosto.

De los productos de la fermentación alcohólica se conoce que una fracción del porcentaje de etanol, corresponde a otros alcoholes y ácidos orgánicos. Para determinar la composición del producto final se puede utilizar la técnica cromatográfica (Escalante *et al.*, 2011).

Con los resultados obtenidos se espera evaluar las levaduras más eficientes para el proceso de fermentación alcohólica, a escala piloto, y con ello obtener nuevas cepas más eficientes

que *Saccharomyces cerevisiae* que en la actualidad es utilizada en la gran mayoría de industrias alcohólicas, vínicas y panaderas.

4.3. Verificación de la hipótesis

Después del análisis de los resultados obtenidos, del consumo de sólidos solubles, pH, acidez, número de ufc/ml de mosto, y porcentaje de alcohol etílico, se acepta la hipótesis alternativa (H_1), afirmando que al menos una de las nueve especies de levaduras aisladas de frutos de mora produce un mejor rendimiento en la producción de etanol en altas concentraciones de azúcares que *Saccharomyces cerevisiae*.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se determinó la osmotolerancia de las levaduras, y se evaluó su producción de alcohol etílico considerando diferentes concentraciones de sólidos solubles, donde se presentó dos levaduras que mostraron mayor porcentaje de etanol. Las levaduras son tolerantes a elevadas concentraciones osmóticas, y el proceso de fermentación no se ve afectado por esta variable, debido a que el porcentaje producido incremento al tener mayor cantidad de sustrato.
- El contenido de azúcares fue utilizado como factor de variación, concluyendo que a 18°Brix se obtiene un proceso de fermentación eficiente. Y el crecimiento microbiano apreciado es mayor, afirmándose de esta manera la relación existente entre el consumo de sustrato y producción de biomasa y metabolitos secundarios.
- La eficiencia de la producción de etanol es dependiente de la cantidad de sustrato suministrada al proceso. Se cuantificó el porcentaje de alcohol etílico y se obtuvo las levaduras que brindaron un mayor valor, siendo esta la especie *Metschnikowia pulcherrima*, cuando está a 18°Brix.
- Las cinéticas de crecimiento para cada especie de levadura se obtuvieron de la fase exponencial de las curvas mediante conteo directo. La fase de latencia es diferente para cada levadura debido a su capacidad de adaptabilidad en el medio. Los decrementos de concentración de ufc/ml de mosto en las curvas de crecimiento se deben la sedimentación de las células debido a la fuerza de gravedad porque no existió agitación en los fermentadores.

5.2. Recomendaciones

- Ampliar las pruebas de osmotolerancia a niveles más elevados de concentración de azúcar y utilizar fuentes ricas en estos compuestos como lo es la melaza para así evaluar su desempeño con sustratos económicamente más accesibles y de mayor rendimiento para su uso a nivel industrial.
- Realizar la cinética de crecimiento microbiano de Monod para las levaduras más eficientes en la producción de etanol y osmotolerancia medida.
- Evaluar las combinaciones entre las levaduras para el mejoramiento de las características organolépticas de los vinos y demás productos alcohólicos.
- Evaluar los productos de la fermentación mediante cromatografía para determinar la concentración de etanol y demás compuestos diferentes al de interés.

CAPÍTULO VI

PROPUESTA

6.1. Datos informativos

6.1.1. Título

Determinación de la eficiencia de producción de etanol de *Metschnikowia pulcherrima* y *Wickerhamomyces onychis* a escala piloto.

6.1.2. Instituciones ejecutoras

Universidad Técnica de Ambato

6.1.3. Beneficiarios

Investigadores y estudiantes universitarios del Ecuador. Empresas encargadas de la producción alcohólica.

6.1.4. Ubicación

Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Av. Los Chasquis y Río Payamino. Ciudadela Huachi Chico. Ambato-Ecuador.

6.1.5. Tiempo estimado para la Ejecución

Seis meses

6.1.6. Equipo técnico responsable

Investigadores, docentes y estudiantes que se encuentren trabajando en el mejoramiento de la producción de alcohol etílico.

6.2. Antecedentes de la propuesta

A lo largo de la historia, uno de los principales compuestos en la industria ha sido el etanol, producto de la fermentación de azúcares por parte de microorganismos. El etanol, en la actualidad, ha tomado mayor importancia por ser una fuente energética más rentable que los combustibles fósiles comúnmente utilizados como gasolina, diésel, GLP, carbón natural, etc. El uso de bioetanol reduce la contaminación que provoca toda la cadena de producción del petróleo. Esta característica ha sido aprovechada en varios países para disminuir el uso de estos combustibles y con ello reducir el impacto ambiental producido y la dependencia energética hacia estos compuestos.

El alcohol es también de gran importancia para varias industrias como química, farmacéutica, agroalimentaria, entre otras. Los vinos y otras bebidas alcohólicas deben sus propiedades organolépticas a la levadura utilizada para su fermentación, excluyendo a factores importantes como son la calidad de sustrato utilizado (uva en el caso del vino), tiempo de reposo y otros.

6.3. Justificación

La eficiencia en la producción de bioetanol ha sido un factor de interés para el mejoramiento de los procesos durante la fermentación. La obtención de cepas que permitan lograr este objetivo es el punto clave para iniciar con este cambio. La cepa utilizada en la actualidad por las industrias alcohólicas suele ser *Saccharomyces cerevisiae*, la cual brinda grandes beneficios y estabilidad durante la fermentación alcohólica, pero el descubrimiento de nuevas especies que igualen o superen la eficiencia de esta levadura podría confluír en la consecución de rendimientos superables a la producción normal de etanol.

La evaluación a escala piloto permite predecir el comportamiento de las especies propuestas a nivel industrial, por lo que simula las condiciones físicas, químicas y biológicas de las empresas dedicadas a la producción de etanol.

6.4. Objetivos

6.4.1. General

- Determinar la eficiencia de producción de etanol de *Metschnikowia pulcherrima* y *Wickerhamomyces onychis* a escala piloto.

6.4.2. Específicos

- Establecer la cinética microbiana de Monod para *Metschnikowia pulcherrima* y *Wickerhamomyces onychis*.
- Identificar las condiciones físico-químicas óptimas de fermentación para *Metschnikowia pulcherrima* y *Wickerhamomyces onychis*.
- Evaluar la producción de etanol de *Metschnikowia pulcherrima* y *Wickerhamomyces onychis* durante el proceso fermentativo para establecer los puntos máximos de obtención de alcohol.

6.5. Análisis de factibilidad

Los resultados obtenidos en la investigación “Determinación de la osmotolerancia de nueve cepas de levaduras aisladas de frutos de mora para la aplicación industrial en procesos de fermentación alcohólica” aseguran la viabilidad de esta propuesta en virtud de que las especies de levadura propuesta son las que brindaron mayor capacidad de producción de etanol.

6.6. Fundamentación

La investigación “Determinación de la osmotolerancia de nueve cepas de levaduras aisladas de frutos de mora para la aplicación industrial en procesos de fermentación alcohólica”, es la base científica para la formulación de la siguiente propuesta.

6.7. Metodología – Modelo Operativo

6.7.1. Recepción

Se adquirirá uva rosada (*Vitis vinífera*) en estado maduro y óptimas condiciones.

6.7.2. Microorganismos utilizados para la fermentación alcohólica del mosto de uva

Se utilizará las levaduras que mostraron mayor producción de etanol *Wickerhamomyces onychis* y *Metschnikowia pulcherrima*. La levadura utilizada para el control será *Saccharomyces cerevisiae*.

6.7.3. Preparación del mosto de uva

La variedad de uva seleccionada para la obtención del mosto es la uva rosada (*Vitis vinífera*). Antes de proceder a la extracción del jugo, la fruta se lavará con agua corriente y destilada para disminuir la cantidad de microorganismos presentes. Para la extracción del jugo se lo realizará por prensado de la fruta. Se filtrará el jugo obtenido con una malla de plástico. Se mezclará el jugo de uva con igual cantidad de agua esterilizada en relación 1:1 lo que permitirá obtener el mosto madre. Al mosto madre se le medirá el pH y se lo regulará hasta 5 adicionando hidróxido de sodio 0,1M o ácido clorhídrico 0,1M según corresponda el caso. Se medirán los °Brix de la fruta con un refractómetro para identificar la concentración de azúcares reductores (gramos de azúcar/100 gramos de mosto). La investigación plantea trabajar a 18 °Brix. Se incluirá además fosfato de amonio en una concentración de 150 ppm o 15 mg por litro de mosto como nutriente para permitir el correcto crecimiento de las levaduras.

6.7.4. Pasteurización del mosto

Se realizará el tratamiento térmico de pasteurización a 70°C durante 15 minutos, y posteriormente habrá un descenso de temperatura hasta los 18°C (temperatura ambiente).

6.7.5. Fermentación

La fermentación se desarrollará en el biorreactor en el que se considerará el espacio libre para que sea utilizado por los gases formados y evitar así una presión excesiva en el recipiente, lo que podría provocar daño a las levaduras. El proceso de fermentación concluirá cuando los grados brix permanezcan constantes.

6.7.6. Reproducción de las levaduras

Preparación del medio líquido YPD

El medio YEPD o extracto de levadura peptona dextrosa, o también conocido como YPD, es utilizado para el crecimiento de levaduras. Está compuesto por 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona, y 20 g/L de glucosa o dextrosa y el resto es completado con agua destilada. Se preparará 15 ml de medio de cultivo en tubos bacteriológicos por cada levadura para su reproducción y posterior inoculación. Se esterilizará el medio en el autoclave a 121°C y una presión igual a 1 atm durante 15 minutos.

Inoculación de las levaduras

Las cepas aisladas de levaduras se encuentran almacenadas en tubos eppendorf a - 4°C en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos; para reactivarlas se elevará la temperatura hasta los 18°C en baño maría, y se tomará 50 µL con el uso de una micropipeta de cada cepa y se inoculará en el medio de cultivo líquido esterilizado. Posteriormente se incubará a 25°C durante tres días.

Para el proceso fermentativo se utilizará iguales concentraciones de levaduras 4×10^5 ufc/ml.

6.7.7. Primer Trasiego

El objetivo de esta operación es separar los sólidos que han sedimentado o floculado en cada botella de fermentación del resto de volumen. Los sólidos pertenecerán a la fruta, desechos de fermentación y algunas levaduras. Se realizará aproximadamente a los dos días de fermentación (Córdova, 2010). El producto final de esta etapa servirá para continuar con la fermentación alcohólica.

6.7.8. Determinación del pH

Se deberá tomar 10 mL de mosto en fermentación y con un potenciómetro realizar las medidas correspondientes.

6.7.9. Determinación de Sólidos Suspendidos

Los °Brix indican la cantidad de azúcares reductores que existe en una muestra, por lo que para su cuantificación se deberá disponer unas gotas del mosto en el brixómetro y leer el valor que muestra el instrumento.

6.7.10. Determinación de la acidez del vino

Se colocará, en un vaso de precipitación, 10 mL de la muestra del mosto, medidos con una pipeta limpia y seca. No es necesario añadir algún indicador. Se vertirá gota a gota la solución de hidróxido de sodio 0,204 M contenida en una bureta, hasta que el mosto se torne de color verdoso.

La cantidad de mililitros de reactivo gastados indicará el número de gramos de acidez total expresada en % ácido sulfúrico. Para expresarlo en % ácido tartárico, se multiplicará el volumen gastado por el factor de corrección que para este caso es 1,53. Si bien el ácido sulfúrico no se encuentra presente en la lista de ácidos del vino, es una forma convencional que permite comparar los resultados obtenidos en la valoración, evitando la cuantificación de cada ácido presente en el vino.

6.7.11. Cinética microbiana

Después de la inoculación se deberá tomar muestras para cuantificar el número de células reproducidas en el mosto. Para ello se requerirá una cámara de Neubauer que está adaptada al microscopio óptico. Se observará la retícula al microscopio con el aumento adecuado y se contarán el número de células. A partir del número de células contadas, y conocido el volumen de líquido que admite el campo de la retícula, se calcula la concentración de células en la muestra líquida aplicada.

Se determinará el número de células/ml de muestra cada hora durante las 12 horas primeras de fermentación, y luego 2 mediciones cada 12 horas hasta llegar a la fase estacionaria de la curva de crecimiento.

6.7.12. Destilación del Alcohol Etilico

Se tomará 1 L del mosto fermentado y se vertirá en el matraz de destilación, en conjunto con núcleos de ebullición para que la mezcla hierva de forma suave y no se produzcan sobrecalentamientos. En el equipo armado se encontrará un termómetro. Para destilar alcohol etílico el punto de ebullición es 80°C, por lo que se deberá controlar que el termómetro marque esta temperatura. Si existe un incremento de temperatura se obtendrá otros compuestos que volatilizan a mayores temperaturas.

6.7.13. Conteo de células viables

Para el conteo de células viables se prepararán diluciones sucesivas de cada una de las muestras utilizando el método de difusión en placa. Para preparar la dilución 1/10 se tomará 1 ml de medio líquido YPD donde está creciendo la levadura y se colocará en una botella que contiene 9 ml de agua de llave estéril. A partir de esta dilución se prepararán las diluciones 1/10² y 1/10³. Se colocarán 100 microlitros (100 µl) de las diluciones 1/10² y 1/10³ en cajas Petri con agar YPD. Se extenderá esta alícuota por la superficie de cada caja con un asa de Digralsky. Este procedimiento se realizará por duplicado y para cada una de las levaduras de estudio. Las cajas inoculadas serán incubadas a 26°C durante 2 semanas. Transcurrido el periodo se contará el número de colonias de levaduras presentes en cada caja. El número de ufc/ml se calculará para aquellas diluciones en las que el número de colonias se encuentre en un rango entre 30 hasta 300, usando la siguiente fórmula:

$$\frac{ufc}{ml} \text{ de mosto} = \frac{N * FD * Vt}{Vi * S}$$

Dónde:

- N** Número de colonias
- FD** Dilución en la cual se contó N
- Vt** Volumen de la dilución 1/10, en mililitros
- Vi** Volumen inoculado, en mililitros
- S** Cantidad de mosto utilizado para preparar la dilución 1/10

6.8. Administración

Tabla 9. Administración

INDICADORES A MEJORAR	SITUACIÓN ACTUAL	RESULTADOS ESPERADOS	ACTIVIDADES	RESPONSABLES
Consumo de azúcares para la generación de etanol y no de biomasa	Cepas de levadura comercial ineficientes para procesos de fermentación.	Producción rentable y eficiente de etanol a escala piloto.	Instalación de experimentos para determinar la capacidad de producción de etanol en las especies <i>Metschnikowia pulcherrima</i> y <i>Wickerhamomyces onychis</i> .	Docentes Investigadores Estudiantes

6.9. Previsión de la evaluación

Tabla 10. Previsión de la evaluación

PREGUNTAS BÁSICAS	EXPLICACIÓN
¿Quiénes solicitan evaluar?	Docente Investigador
¿Por qué evaluar?	Genera información acerca de los mecanismos de adaptación y funcionalidad de las levaduras obtenidas.
¿Para qué evaluar?	Para determinar la eficiencia en la fermentación alcohólica producida por diferentes especies de levadura.
¿Qué evaluar?	ufc/ml de mosto Porcentaje de etanol
¿Quién evalúa?	Docente
¿Cuándo evaluar?	Mientras se lleva a cabo el proceso de fermentación y al finalizarlo.
¿Cómo evaluar?	Obteniendo el porcentaje de producción de alcohol etílico. Registrando el descenso del sustrato. Contrastando con la generación de nueva biomasa.
¿Con qué evaluar?	Programa NTSYS e Infostat (análisis estadístico)

MATERIALES DE REFERENCIA

- ANCASI, E. s/f.** Manual de Microbiología de los Alimentos. 40-42.
- ARMSTRONG, F.; BENNETT, T. 1982.** Bioquímica. Editorial Reverté. Barcelona. España. 248.
- BENÍTEZ, K.; MIELES, J.; MENDIETA, F. 2008.** Instalación de una Planta de Alcohol Etílico a partir de Jugo de Caña. Guayaquil. Ecuador. Escuela Politécnica del Litoral. 68-70.
- CADEZ, N.; POOT, G.; RASPOR, P.; SMITH, M. 2003.** *Hanseniaspora meyeri* sp. nov., *Hanseniaspora clermontiae* sp. nov., *Hanseniaspora lanchancei* sp. nov. And *Hanseniaspora oopuntiae* sp. nov., novel apiculate yeast species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **53**: 1671-1680.
- CAMPBELL, N.; REECE, J. 2005.** Biología. Séptima Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. 175.
- CARRILLO, L. 2002.** Los Hongos de los Alimentos y Forrajes. 94.
- CBS-KNAW FUNGAL BIODIVERSITY CENTRE. 2011.** *Clavispora lusitaniae*. An institute of the Royal Netherlands Academy of Art and Sciences.
- CEVALLOS, C. 2014.** Determinación de la Biodiversidad y Distribución Geográfica de Levaduras Asociadas a Frutos de Mora de Castilla (*Rubus glaucus*) de Tres Localidades de la Provincia de Tungurahua. Universidad Técnica de Ambato.
- COMUNIDAD LEDESMA. 2013.** Bioetanol de caña de azúcar. Argentina.
- CONSEJO NACIONAL DE SUSTANCIAS ESTUPEFACIENTES Y PSICOTRÓPICAS (CONSEP). 2013.** CONSEP presenta estudio sobre el manejo del alcohol etílico en el Ecuador.
- CÓRDOVA, I. 2010.** Comparación del comportamiento fermentativo de levadura de panificación y levaduras vínicas (Uvaferm CM, Lalvin EC 1118, Lalvin QA23) y sus efectos sobre la calidad de vinos de mora (*Rubus glaucus* Benth). Universidad Técnica de Ambato. 69.

DAMIAN, A.; ESPINOZA, E.; TORRES, G. 1998. Incidencia de las Variables Operativas de una Destilación por Carga sobre la Calidad y Rendimiento de los Productos. *Información Tecnológica*. 9:(4). 369-373.

DÍAZ, A.; FLÓREZ, J.; COTES, A. 2005. Optimización de un medio de cultivo para la producción de la levadura *Pichia onychis* (Lv027). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 7:(1). 51:58.

DECHECO, F.; EGUSQUIZA, P. 2011. Fermentaciones microbianas.

ECHEVERRÍA, D.; RÍOS, D. 2003. Construcción de un prototipo didáctico para la fermentación alcohólica y acética de ciclo cerrado. Universidad Tecnológica Equinoccial. Quito. Ecuador. 33-34.

ENOLOGY ACCESS. 2010. *Metschnikowia pulcherrima*.

ESCALANTE, E.; RYCHTERA, M.; MELZUCH, K.; HATTA, B.; QUILLAMA, E.; LUDEÑA, Z.; SARMIENTO, V.; CHAQUILLA, G. 2011. Actividad fermentativa de *Hanseniaspora uvarum* y su importancia en la producción de bebidas fermentadas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 31: 57-63.

ESCORCIA, H.; GARCÍA, J.; HERNÁNDEZ, E.; MARTÍNEZ, A. 2012. Levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

FLANCY, C. 2003. Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos. Segunda Edición. Editorial Technique et Documentation. París. Francia. 292.

GALLEGO, C. 2007. Influencia de la Ácidez Volátil en el Proceso de Fermentación de la Planta de Alcohol del Ingenio Risaralda S.A. Universidad Tecnológica de Pereira. Escuela de Tecnología Química.

GARCÍA, J. s/f. Maridaje, enología y cata de vinos. Primera Edición. Innovación y Cualificación Ediciones. 71.

GARCÍA, V. 2005. Introducción a la Microbiología. Editorial Universidad Estatal a Distancia. 109-118, 128.

GARCÍA, M.; QUINTERO, R.; LÓPEZ, A. 2004. Biotecnología Alimentaria. Quinta Edición. Editorial Limusa. México D. F. México. 267-268.

GONZÁLEZ, A.; VALENZUELA, L. s/f. *Saccharomyces cerevisiae*. Departamento de Genética Molecular. Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México.

GRANADOS, R.; VILLAVERDE, M. 2003. Microbiología Tomo I. Bacteriología. Características y clasificación bacteriana. Virología. Características y técnicas bioquímicas. Madrid. España. 62-63.

HERNÁNDEZ, A. s/f. Microbiología Industrial. 39-40, 48-50.

HILL, J.; KOLB, D. 1999. Química para el nuevo milenio. 8va Edición. Editorial Prentice Hall. México. 234.

INGRAHAM, J.; INGRAHAM, C. 1998. Introducción a la Microbiología. Primera Edición. Editorial Reverté. Barcelona. España. 735.

IZQUIERDO, J.; CUNILL, F.; IBORRA, M.; FITÉ, C. 2004. Cinética de las Reacciones Químicas. Universitat de Barcelona. Barcelona. España. 288-290.

JAMES, S.; BOND, C.; ROBERTS, I. 2001. *Candida sorbosivorans* sp. nov., a new member of the genus *Candida* Berkhout. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **51**: 1215-1219.

JOINT GENOME INSTITUTE (JGI). 2014. *Pichia membranifaciens*. The Regents of the University of California.

KENT, J.; RIEGEL, E. 2007. Kent and Riegel's Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology. 11va Edición. Editorial Springer. 256-259.

KOOLMAN, J.; RÖHM, K. 2004. Bioquímica: texto y atlas. Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid. España. 148.

KURTZMAN, C.; FELL, J.; BOEKHOUT, T. 2011. The Yeasts: A Taxonomic Study. Fifth Edition. Elsevier Editorial. United States of America. **1:** 417-418, 425-426, 622-624, 697-698,911-912.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. 2003. Biología de los Microorganismos. Southern Illinois University Carbondale. Décima Edición. Editorial Pearson Prentice Hall. 483-485.

MAGER, W.; SIDERIUS, M. 2002. Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research*. **2:** 251-257.

MASIH, E.; SLEZACK, S.; MARMARAS, I.; AIT, E.; VERNET, G.; CHARPENTIER, C.; ADHOLEYA, A.; PAUL, B. 2001. Characterisation of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevine. *FEMS Microbiology Letters*. **202:** 227-232.

MATOS, I.; CASSA, L.; MEDEIROS, R.; NUNES, C.; ASTOLFI, S. 2014. Isolation, Taxonomic Identification and Investigation of Biotechnology Potential of Wild-Type *Meyerozyma guilliermondii* Associated with Amazonian Termites able to Ferment D-Xilosa.

MENGGEN, M.; LEWIS, L. 2010. Mechanism of Ethanol Tholerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. Department of Agriculture. *Bioenergy Research*. **87:** 829 – 845.

MINISTERIO DE COMERCIO EXTERIOR Y TURISMO (MINCETUR). 2003. Perfil del Mercado y Competitividad Exportadora de Etanol. Perú.

MOLINA, P.; VELASCO, D.; TARRAGA, A.; LIDON, J. 1991. Prácticas de química orgánica. Universidad de Murcia. 10-11.

MÜLLER, L. 1964. Manual de Laboratorio de Fisiología Vegetal. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O. E. A. Turrialba. Costa Rica. 92.

NATURFOSCH, Z.; TÜRKEL, E. 2009. Isolation and characterization of new *Metschnikowia pulcherrima* strains as producers of the antimicrobial pigment pulcherrim. **64:** 405-410.

NEGRONI, M. 2009. Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. Segunda Edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires – Argentina. 46-47.

ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE LA VIÑA Y EL VINO (OIV). 2012. Compendium of International Methods of Analysis. Total acidity. 2-3.

RODRIGUES, L. 1979. *Clavispora*, a new yeast genus of the Saccharomycetales. *Antonie van Leeuwenhoek. Journal of Microbiology.* **45:** 479-483.

ROJAS, L.; LORENZO, Y.; DOMENECH, F. 2011. Estudio del consumo de ácidos en el ajuste de pH en diferentes medios de fermentación alcohólica. ICIDCA. *Sobre los derivados de la caña de azúcar.* Cuba. **45 (2):** 57-62.

SAEZ, J.; LOPES, C.; KIRS, V.; SANGORRÍN, M. 2011. Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia. *Food Microbiology.* **28:** 503-509.

SANTAMARÍA, P.; LÓPEZ, R.; GUTIÉRREZ, A.; GARCÍA, E. 1995. Influencia de la Temperatura en la Fermentación Alcohólica. *Zubía Monográfico.* **7:** 137-149.

SANTAMARÍA, P.; TENORIO, C.; SOTA, C.; GARIJO, P.; GUTIÉRREZ, A.; LÓPEZ, R. 2005. Influencia del pH de la uva en la calidad del vino y en la formación de aminas biógenas. *Zubía Monográfico.* **(16):** 69-82.

SANTAMARINA, P.; GARCÍA, F.; ROSELLÓ, J. 1997. Biología y Botánica. Tomo 2. Universidad Politécnica de Valencia. Editorial Reproval. 103.

SIGIFREDO, B.; STROPPIANO, M. s/f. Análisis comparativo de la influencia de factores de estrés en levaduras industriales y levaduras de panificación. 1 – 6.

SUBIRÓS, F. 2000. Cultivo de la Caña de Azúcar. Primera Edición. Editorial EUNED. San José. Costa Rica. 337.

STRATFORD, M. 2006. Food and Beverage Spoilage Yeasts. *Yeast Handbook. Yeast in Food and Beverages.* Springer – Verlag Berlin Heidelberg. Alemania. 352.

TORTORA, G.; FUNKE, B.; CASE, C. 2007. Introducción a la Microbiología. 9° Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 177-178.

TROYER, J. 1955. A relation between cell multiplication and alcohol tolerance in yeasts. *Mycologia*. **45**: 20 – 39.

VÁSQUEZ, H.; DACOSTA, O. 2007. Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*. México. **8** (4): 46-48.

VILLAR, A. 1992. Sensibilidad a etanol en levaduras: bases fisiológicas y análisis de métodos empleados en su determinación. Universidad Complutense de Madrid. 5-7.

ANEXO A

DATOS EXPERIMENTALES

TABLA A1. Códigos correspondientes a las levaduras aisladas de frutos de mora.

CÓDIGO	ESPECIE
CC001	<i>Candida sorbosivorans</i>
CC004	<i>Wickerhamomyces onychis</i>
CC017	<i>Clavispora lusitaniae</i>
CC025	<i>Pichia manshurica</i>
CC029	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
CC036	<i>Pichia membranifaciens</i>
CC039	<i>Hanseniaspora meyeri</i>
CC041	<i>Galactomyces geotrichum</i>
CC043	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
GC00	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

TABLA A2. Tratamientos propuestos para el diseño experimental.

TRATAMIENTOS	A: °BRIX DEL MOSTO	B: LEVADURA
a ₁ b ₁	12 °Brix	<i>Candida sorbosivorans</i>
a ₁ b ₂	12 °Brix	<i>Wickerhamomyces onychis</i>
a ₁ b ₃	12 °Brix	<i>Clavispora lusitaniae</i>
a ₁ b ₄	12 °Brix	<i>Pichia manshurica</i>
a ₁ b ₅	12 °Brix	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
a ₁ b ₆	12 °Brix	<i>Pichia membranifaciens</i>
a ₁ b ₇	12 °Brix	<i>Hanseniaspora meyeri</i>
a ₁ b ₈	12 °Brix	<i>Galactomyces geotrichum</i>
a ₁ b ₉	12 °Brix	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
a ₁ b ₁₀	12 °Brix	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
a ₂ b ₁	18 °Brix	<i>Candida sorbosivorans</i>
a ₂ b ₂	18 °Brix	<i>Wickerhamomyces onychis</i>
a ₂ b ₃	18 °Brix	<i>Clavispora lusitaniae</i>
a ₂ b ₄	18 °Brix	<i>Pichia manshurica</i>
a ₂ b ₅	18 °Brix	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
a ₂ b ₆	18 °Brix	<i>Pichia membranifaciens</i>
a ₂ b ₇	18 °Brix	<i>Hanseniaspora meyeri</i>
a ₂ b ₈	18 °Brix	<i>Galactomyces geotrichum</i>
a ₂ b ₉	18 °Brix	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
a ₂ b ₁₀	18 °Brix	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

TABLA A3. Caracterización físico-química del mosto de uva (*Vitis vinifera*)

TRATAMIENTO	RÉPLICAS	SÓLIDOS SOLUBLES (°BRIX)	pH	ACIDEZ (% ÁCIDO TARTÁRICO)
a1b1	1	12	5	0,612
a1b1	2	12	5	0,612
a1b2	1	12	5	0,612
a1b2	2	12	5	0,612
a1b3	1	12	5	0,612
a1b3	2	12	5	0,612
a1b4	1	12	5	0,612
a1b4	2	12	5	0,612
a1b5	1	12	5	0,612
a1b5	2	12	5	0,612
a1b6	1	12	5	0,612
a1b6	2	12	5	0,612
a1b7	1	12	5	0,612
a1b7	2	12	5	0,612
a1b8	1	12	5	0,612
a1b8	2	12	5	0,612
a1b9	1	12	5	0,612
a1b9	2	12	5	0,612
a1b10	1	12	5	0,612
a1b10	2	12	5	0,903
a2b1	1	18	5	0,903
a2b1	2	18	5	0,903
a2b2	1	18	5	0,903
a2b2	2	18	5	0,903
a2b3	1	18	5	0,903
a2b3	2	18	5	0,903
a2b4	1	18	5	0,903
a2b4	2	18	5	0,903
a2b5	1	18	5	0,903
a2b5	2	18	5	0,903
a2b6	1	18	5	0,903
a2b6	2	18	5	0,903
a2b7	1	18	5	0,903
a2b7	2	18	5	0,903
a2b8	1	18	5	0,903
a2b8	2	18	5	0,903
a2b9	1	18	5	0,903
a2b9	2	18	5	0,903
a2b10	1	18	5	0,903
a2b10	2	18	5	0,903

TABLA A4. Comportamiento de los Sólidos Solubles (°Brix) registrados durante la etapa de fermentación del mosto de uva rosada (*Vitis vinífera*).

TRATAMIENTO	RÉPLICA	DÍAS																	
		0	1	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15	17	18	19	20
a ₁ b ₁	1	12,0	12,0		12,0	12,0	12,0	12,0	12,0		12,0	11,2	10,0	9,4	9,0			5,2	4,8
a ₁ b ₁	2	12,0	12,0		12,0	12,0	12,0	11,6	12,0		10,0	9,4	8,6	7,6	7,2			4,6	4,4
a ₁ b ₂	1	12,0	12,0		12,0	11,4	12,0	11,4	10,8		9,0	9,0	8,6	8,2	8,2			7,0	6,8
a ₁ b ₂	2	12,0	12,0		12,0	11,0	11,8	11,4	10,8		8,0	9,0	8,6	8,0	8,0			6,2	6,0
a ₁ b ₃	1	12,0	12,0		11,0	10,4	12,0	11,6	11,4		10,0	10,4	10,0	9,0	9,0			5,0	4,4
a ₁ b ₃	2	12,0	12,0		11,0	10,4	12,0	12,0	12,0		10,0	11,4	9,8	10,8	11,2			10,0	10,2
a ₁ b ₄	1	12,0	12,0		12,0	12,0	12,0	12,0	12,0		12,0	12,0	12,0	12,0	12,4			10,0	9,4
a ₁ b ₄	2	12,0	12,0		12,0	12,0	12,0	12,0	12,0		12,0	12,0	12,0	11,2	10,6			5,8	5,0
a ₁ b ₅	1	12,0	11,4		11,2	10,0	12,0	12,0	11,0		8,0	7,0	11,4	5,2	5,0			4,2	4,2
a ₁ b ₅	2	12,0	11,2		11,0	10,4	12,0	12,0	11,8		9,5	9,6	9,2	8,4	8,2			5,8	5,2
a ₁ b ₆	1	12,0	11,2		12,0	12,0	12,0	12,0	12,0		9,0	11,0	10,0	9,2	8,8			4,8	4,4
a ₁ b ₆	2	12,0	11,2		11,6	12,0	12,0	11,2	10,2		7,0	7,2	6,6	5,6	5,2			4,2	4,2
a ₁ b ₇	1	12,0	12,0		11,6	10,0	12,0	12,0	12,0		11,0	11,0	10,4	9,2	10,0			6,4	6,8
a ₁ b ₇	2	12,0	12,0		11,4	10,4	12,0	11,8	12,0		11,5	11,4	11,2	10,8	11,0			10,4	10,2
a ₁ b ₈	1	12,0	12,0		12,0	11,0	12,0	12,0	12,0		9,0	8,8	7,8	6,8	6,0			4,6	4,4
a ₁ b ₈	2	12,0	12,0		12,0	11,2	12,0	12,0	12,0		12,0	12,0	12,0	11,2	11,0			6,4	5,4
a ₁ b ₉	1	12,0	12,0		11,2	10,0	10,8	10,2	9,6		8,2	8,0	8,0	7,2	7,4			6,2	6,2
a ₁ b ₉	2	12,0	11,6		11,0	10,0	10,4	10,0	9,2		7,8	7,6	7,4	7,0	7,0			5,8	5,4
a ₁ b ₁₀	1	12,0	11,6		10,0	9,0	7,2	6,8	6,0		4,6	4,6	4,6	4,2	4,8			4,4	4,4
a ₁ b ₁₀	2	12,0	11,4		9,0	8,0	7,4	6,4	5,4		4,2	4,6	4,6	4,2	4,6			4,4	4,4
a ₂ b ₁	1	18,0	18,0	17,2	17,0	16,2	15,0		14,2	13,0	15,8	10,8				10,0	11,0	10,0	10,0
a ₂ b ₁	2	18,0	18,0	17,4	17,0	16,0	15,0		13,8	12,0	12,0	9,2				9,8	10,0	9,4	8,8
a ₂ b ₂	1	18,0	18,0	18,0	18,0	16,0	17,2		16,8	15,0	13,6	12,0				7,2	6,6	5,6	5,4

TABLA A4. Continuación...

TRATAMIENTO	RÉPLICA	DÍAS																	
		0	1	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15	17	18	19	20
a ₂ b ₂	2	18,0	18,0	18,0	18,0	17,0	17,2		16,8	15,0	15,2	15,0				13,2	12,2	12,2	12,0
a ₂ b ₃	1	18,0	18,0	17,6	17,4	16,0	16,0		15,0	15,0	14,2	14,0				13,0	12,4	12,4	11,2
a ₂ b ₃	2	18,0	18,0	17,4	17,4	16,0	16,0		14,8	13,2	13,0	12,4				9,2	8,2	8,0	7,0
a ₂ b ₄	1	18,0	18,0	17,6	17,0	16,0	15,4		14,4	13,2	13,2	12,8				12,2	11,4	11,2	11,0
a ₂ b ₄	2	18,0	18,0	17,6	17,0	16,0	15,6		14,2	13,2	12,8	11,8				10,8	9,2	9,8	9,2
a ₂ b ₅	1	18,0	18,0	18,0	18,0	16,2	18,4		17,2	16,0	12,4	11,0				8,4	7,0	6,6	6,0
a ₂ b ₅	2	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,4		18,0	16,2	14,6	14,0				9,8	8,6	8,0	6,8
a ₂ b ₆	1	18,0	18,0	18,0	18,0	17,0	18,0		17,4	17,0	17,0	16,0				14,6	12,8	12,0	11,0
a ₂ b ₆	2	18,0	18,0	18,0	18,0	16,8	18,0		17,0	16,4	16,0	14,8				9,4	7,8	7,4	6,2
a ₂ b ₇	1	18,0	18,0	18,0	17,4	14,0	12,8		10,0	7,8	6,2	6,0				5,6	5,2	5,4	5,0
a ₂ b ₇	2	18,0	18,0	17,6	17,8	16,2	15,0		11,2	8,4	8,2	7,0				6,0	4,8	5,4	5,2
a ₂ b ₈	1	18,0	18,0	18,0	17,4	13,0	11,6		10,0	9,0	7,8	6,0				6,0	5,2	5,2	5,2
a ₂ b ₈	2	18,0	18,0	17,8	16,0	16,0	15,4		11,6	7,0	7,8	7,0				6,0	5,0	5,0	5,0
a ₂ b ₉	1	18,0	18,0	17,8	18,0	16,8	17,2		13,8	10,4	10,0	8,0				6,4	5,6	5,8	5,4
a ₂ b ₉	2	18,0	18,0	18,0	17,8	17,0	17,2		14,0	10,0	9,4	8,8				6,4	5,6	5,4	5,4
a ₂ b ₁₀	1	18,0	18,0	13,4	11,0	9,0	8,0		6,0	5,2	5,6	5,8				5,8	5,0	5,2	5,0
a ₂ b ₁₀	2	18,0	18,0	13,4	11,0	9,0	8,0		6,2	5,0	5,2	5,0				5,6	5,0	5,2	5,0

TABLA A5. Comportamiento del pH registrado durante la etapa de fermentación del mosto de uva rosada (*Vitis vinifera*).

TRATAMIENTO	RÉPLICAS	DÍAS																
		0	1	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	15	17	18	19	20
a₁b₁	1	5,00	5,00		5,12	5,12	4,63	4,99	5,43		5,20	5,26	5,27	5,02			5,11	5,11
a₁b₁	2	5,00	5,15		4,97	4,82	4,29	4,49	5,07		4,75	4,82	5,06	4,70			4,68	4,60
a₁b₂	1	5,00	5,28		4,97	4,85	4,66	4,92	4,91		4,87	4,88	5,29	4,84			4,82	4,89
a₁b₂	2	5,00	5,26		5,07	4,83	4,72	4,96	4,91		4,80	4,89	4,87	4,85			4,71	4,71
a₁b₃	1	5,00	5,14		5,02	4,80	4,81	5,03	4,93		4,82	4,76	4,70	4,68			4,45	4,46
a₁b₃	2	5,00	5,14		5,16	5,28	5,19	5,62	5,49		5,39	5,22	4,68	5,22			4,91	4,97
a₁b₄	1	5,00	5,25		5,26	5,27	5,27	5,89	5,58		5,25	5,34	5,30	5,14			4,96	4,93
a₁b₄	2	5,00	5,26		4,98	4,83	4,83	5,17	5,26		4,99	4,99	4,90	4,97			4,77	4,90
a₁b₅	1	5,00	5,13		4,84	4,79	4,77	5,11	4,90		4,70	4,77	5,30	4,80			4,69	4,84
a₁b₅	2	5,00	5,11		4,78	4,82	4,62	5,09	4,85		4,75	4,78	4,90	4,74			4,66	4,63
a₁b₆	1	5,00	5,16		4,79	4,63	4,50	4,85	4,67		4,60	4,57	4,58	4,68			4,50	4,46
a₁b₆	2	5,00	5,13		5,27	5,31	5,36	5,58	5,24		5,17	5,09	5,19	5,00			4,84	4,79
a₁b₇	1	5,00	5,15		5,28	5,33	5,32	5,71	5,46		4,25	5,37	5,29	5,08			5,22	4,99
a₁b₇	2	5,00	5,09		5,10	5,09	5,06	5,42	5,35		5,33	5,28	5,28	5,17			4,91	4,91
a₁b₈	1	5,00	5,28		5,27	5,19	5,00	5,17	5,06		4,70	4,70	4,70	4,64			4,70	4,67
a₁b₈	2	5,00	5,28		5,55	5,26	5,38	5,71	5,44		5,25	5,24	5,38	5,19			4,90	4,97
a₁b₉	1	5,00	5,15		4,79	4,80	4,84	5,07	4,81		4,79	4,89	4,86	4,84			4,83	4,71
a₁b₉	2	5,00	5,16		4,77	4,75	4,60	4,83	4,74		4,68	4,95	4,71	4,75			4,76	4,55
a₁b₁₀	1	5,00	5,21		4,63	4,68	4,53	4,89	4,86		4,71	4,81	4,84	4,83			4,88	4,76
a₁b₁₀	2	5,00	5,23		4,61	4,61	4,45	4,85	4,79		4,69	4,75	4,79	4,76			4,97	4,87
a₂b₁	1	5,00	5,00	5,09	5,15	5,12	5,03		4,99	5,21	5,20	5,26			5,27	5,02	5,28	5,30
a₂b₁	2	5,00	5,00	5,15	4,97	4,82	4,29		4,49	5,07	4,75	4,82			5,06	4,70	4,68	4,60
a₂b₂	1	5,00	5,00	5,14	5,02	4,80	4,81		5,03	4,93	4,82	4,76			4,70	4,68	4,45	4,46

TABLA A5. Continuación...

TRATAMIENTO	RÉPLICAS	DÍAS																
		0	1	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	15	17	18	19	20
a ₂ b ₂	2	5,00	5,00	5,14	5,16	5,28	5,19		5,62	5,49	5,39	5,22			4,68	5,22	4,91	4,97
a ₂ b ₃	1	5,00	5,00	5,13	4,84	4,79	4,77		5,11	4,90	4,70	4,77			5,30	4,80	4,69	4,84
a ₂ b ₃	2	5,00	5,00	5,11	4,78	4,82	4,62		5,09	4,85	4,75	4,78			4,90	4,74	4,66	4,63
a ₂ b ₄	1	5,00	5,00	5,16	4,79	4,63	4,50		4,85	4,67	4,60	4,57			4,58	4,68	4,50	4,46
a ₂ b ₄	2	5,00	5,00	5,13	5,27	5,31	5,36		5,58	5,24	5,17	5,09			5,19	5,00	4,84	4,79
a ₂ b ₅	1	5,00	5,00	5,15	4,79	4,80	4,84		5,07	4,81	4,79	4,89			4,86	4,84	4,83	4,71
a ₂ b ₅	2	5,00	5,00	5,16	4,77	4,75	4,60		4,83	4,74	4,68	4,95			4,71	4,75	4,76	4,55
a ₂ b ₆	1	5,00	5,00	5,15	5,28	5,33	5,32		5,71	5,46	4,25	5,37			5,29	5,08	5,22	4,99
a ₂ b ₆	2	5,00	5,00	5,09	5,10	5,09	5,06		5,42	5,35	5,33	5,28			5,28	5,17	4,91	4,91
a ₂ b ₇	1	5,00	5,00	5,28	4,97	4,85	4,66		4,92	4,91	4,87	4,88			5,29	4,84	4,82	4,89
a ₂ b ₇	2	5,00	5,00	5,26	5,07	4,83	4,72		4,96	4,91	4,80	4,89			4,87	4,85	4,71	4,71
a ₂ b ₈	1	5,00	5,00	5,28	5,27	5,19	5,00		5,17	5,06	4,70	4,70			4,70	4,64	4,70	4,67
a ₂ b ₈	2	5,00	5,00	5,28	5,55	5,26	5,38		5,71	5,44	5,25	5,24			5,38	5,19	4,90	4,97
a ₂ b ₉	1	5,00	5,00	5,25	5,26	5,27	5,27		5,89	5,58	5,25	5,34			5,30	5,14	4,96	4,93
a ₂ b ₉	2	5,00	5,00	5,26	4,98	4,83	4,83		5,17	5,26	4,99	4,99			4,90	4,97	4,77	4,90
a ₂ b ₁₀	1	5,00	5,00	5,21	4,63	4,68	4,53		4,89	4,86	4,71	4,81			4,84	4,83	4,88	4,76
a ₂ b ₁₀	2	5,00	5,00	5,23	4,61	4,61	4,45		4,85	4,79	4,69	4,75			4,79	4,76	4,97	4,87

TABLA A6. Comportamiento de la acidez (% ácido tartárico) registrado durante la etapa de fermentación del mosto de uva rosada (*Vitis vinifera*).

TRATAMIENTO	RÉPLICAS	DÍAS																	
		0	1	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15	17	18	19	20
a ₁ b ₁	1	0,61	0,37		0,69	0,72	0,23	0,09	0,15		0,15	0,06	0,09	0,08	0,11			0,09	0,08
a ₁ b ₁	2	0,61	0,41		0,78	0,52	0,37	0,17	0,17		0,17	0,11	0,14	0,08	0,12			0,11	0,15
a ₁ b ₂	1	0,61	0,54		0,32	0,75	0,15	0,24	0,29		0,29	0,09	0,11	0,08	0,11			0,11	0,12
a ₁ b ₂	2	0,61	0,70		0,21	0,63	0,15	0,21	0,35		0,35	0,09	0,15	0,06	0,09			0,12	0,14
a ₁ b ₃	1	0,61	0,54		0,47	0,47	0,11	0,17	0,20		0,20	0,11	0,14	0,06	0,14			0,12	0,15
a ₁ b ₃	2	0,61	0,52		0,52	0,77	0,08	0,23	0,20		0,20	0,09	0,12	0,06	0,09			0,18	0,17
a ₁ b ₄	1	0,61	0,32		0,20	0,52	0,15	0,26	0,38		0,38	0,09	0,09	0,06	0,09			0,12	0,12
a ₁ b ₄	2	0,61	0,32		0,31	0,29	0,21	0,23	0,43		0,43	0,09	0,11	0,09	0,12			0,20	0,12
a ₁ b ₅	1	0,61	0,41		0,26	0,63	0,08	0,40	0,21		0,21	0,09	0,08	0,06	0,12			0,09	0,11
a ₁ b ₅	2	0,61	0,61		0,49	0,60	0,09	0,24	0,26		0,26	0,08	0,09	0,06	0,12			0,12	0,11
a ₁ b ₆	1	0,61	0,67		0,50	0,41	0,11	0,32	0,40		0,40	0,12	0,18	0,03	0,18			0,20	0,20
a ₁ b ₆	2	0,61	0,61		0,54	0,46	0,12	0,28	0,37		0,37	0,06	0,09	0,06	0,09			0,15	0,14
a ₁ b ₇	1	0,61	0,20		0,28	0,69	0,08	0,14	0,24		0,24	0,08	0,12	0,06	0,11			0,11	0,11
a ₁ b ₇	2	0,61	0,24		0,35	0,57	0,09	0,17	0,21		0,21	0,08	0,11	0,08	0,09			0,15	0,14
a ₁ b ₈	1	0,61	0,20		0,31	0,34	0,11	0,20	0,32		0,32	0,12	0,12	0,08	0,12			0,14	0,11
a ₁ b ₈	2	0,61	0,18		0,28	0,58	0,18	0,28	0,37		0,37	0,09	0,09	0,03	0,09			0,12	0,12
a ₁ b ₉	1	0,61	0,37		0,29	0,32	0,18	0,18	0,37		0,37	0,11	0,15	0,08	0,11			0,15	0,14
a ₁ b ₉	2	0,61	0,40		0,32	0,55	0,17	0,24	0,50		0,50	0,09	0,08	0,08	0,12			0,15	0,21
a ₁ b ₁₀	1	0,61	0,32		0,29	0,47	0,15	0,20	0,29		0,29	0,11	0,12	0,06	0,09			0,08	0,21
a ₁ b ₁₀	2	0,61	0,26		0,37	0,43	0,21	0,21	0,31		0,31	0,12	0,11	0,08	0,09			0,08	0,09
a ₂ b ₁	1	0,90	0,06	0,06	0,09	0,06	0,11		0,11	0,09	0,09	0,11				0,09	0,11	0,09	0,09
a ₂ b ₁	2	0,90	0,09	0,09	0,08	0,11	0,11		0,11	0,11	0,09	0,09				0,11	0,09	0,09	0,09
a ₂ b ₂	1	0,90	0,06	0,09	0,06	0,08	0,18		0,18	0,11	0,09	0,12				0,14	0,11	0,09	0,09

TABLA A6. Continuación...

TRATAMIENTO	RÉPLICAS	DÍAS																	
		0	1	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15	17	18	19	20
a ₂ b ₂	2	0,90	0,06	0,05	0,08	0,09	0,09		0,09	0,11	0,09	0,12				0,15	0,11	0,11	0,11
a ₂ b ₃	1	0,90	0,06	0,08	0,08	0,12	0,14		0,14	0,14	0,18	0,17				0,17	0,18	0,15	0,15
a ₂ b ₃	2	0,90	0,06	0,06	0,06	0,09	0,14		0,14	0,15	0,12	0,12				0,12	0,09	0,11	0,12
a ₂ b ₄	1	0,90	0,05	0,09	0,09	0,12	0,20		0,20	0,12	0,12	0,14				0,14	0,14	0,14	0,14
a ₂ b ₄	2	0,90	0,08	0,11	0,08	0,11	0,09		0,09	0,14	0,09	0,11				0,12	0,14	0,12	0,11
a ₂ b ₅	1	0,90	0,06	0,12	0,08	0,06	0,14		0,14	0,09	0,09	0,09				0,11	0,11	0,11	0,11
a ₂ b ₅	2	0,90	0,06	0,06	0,06	0,08	0,09		0,09	0,08	0,08	0,11				0,12	0,08	0,09	0,09
a ₂ b ₆	1	0,90	0,05	0,06	0,06	0,09	0,08		0,08	0,09	0,12	0,14				0,17	0,15	0,17	0,18
a ₂ b ₆	2	0,90	0,08	0,06	0,08	0,08	0,11		0,11	0,11	0,08	0,09				0,11	0,14	0,12	0,11
a ₂ b ₇	1	0,90	0,09	0,06	0,06	0,12	0,11		0,11	0,12	0,15	0,12				0,11	0,09	0,09	0,09
a ₂ b ₇	2	0,90	0,11	0,09	0,11	0,12	0,09		0,09	0,12	0,15	0,12				0,12	0,23	0,17	0,12
a ₂ b ₈	1	0,90	0,06	0,05	0,09	0,12	0,08		0,08	0,11	0,11	0,09				0,09	0,09	0,11	0,12
a ₂ b ₈	2	0,90	0,05	0,06	0,09	0,09	0,12		0,12	0,12	0,11	0,11				0,11	0,14	0,12	0,11
a ₂ b ₉	1	0,90	0,06	0,12	0,12	0,17	0,34		0,34	0,15	0,15	0,15				0,15	0,17	0,15	0,15
a ₂ b ₉	2	0,90	0,09	0,08	0,15	0,15	0,29		0,29	0,12	0,15	0,15				0,17	0,15	0,15	0,17
a ₂ b ₁₀	1	0,90	0,06	0,09	0,14	0,14	0,20		0,20	0,11	0,11	0,09				0,09	0,11	0,11	0,11
a ₂ b ₁₀	2	0,90	0,06	0,11	0,14	0,12	0,15		0,15	0,11	0,14	0,12				0,08	0,11	0,11	0,11

TABLA A7. Número de ufc por mililitro de mosto de uva rosada (*Vitis vinifera*) registrados durante el la etapa de fermentación.

TRATAMIENTO	RÉPLICAS	DÍAS														
		0	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	15	17	18	19
a ₁ b ₁	1	4,00E+05		7,70E+05	8,75E+05	8,90E+05	9,12E+05	1,03E+06		1,44E+06	3,73E+06	3,22E+06	3,70E+06		6,65E+05	3,75E+05
a ₁ b ₁	2	4,00E+05		8,70E+05	9,56E+05	9,78E+05	1,09E+06	1,45E+06		1,48E+06	3,30E+06	3,71E+06	4,11E+06		7,40E+05	4,90E+05
a ₁ b ₂	1	4,00E+05		2,52E+06	4,52E+06	1,45E+07	2,95E+07	1,34E+07		8,78E+06	2,92E+06	2,08E+06	1,63E+06		1,46E+06	7,56E+05
a ₁ b ₂	2	4,00E+05		3,10E+06	6,30E+06	2,30E+07	5,57E+07	1,84E+07		1,20E+07	3,67E+06	3,92E+06	3,60E+06		1,21E+06	6,52E+05
a ₁ b ₃	1	4,00E+05		2,42E+06	2,62E+06	4,22E+06	4,44E+06	5,28E+06		6,54E+06	7,04E+06	7,01E+06	6,56E+06		2,83E+06	1,28E+06
a ₁ b ₃	2	4,00E+05		1,97E+06	2,06E+06	3,46E+06	5,94E+06	5,74E+06		6,15E+07	7,69E+06	8,82E+06	8,56E+06		2,34E+06	1,37E+06
a ₁ b ₄	1	4,00E+05		6,71E+05	8,42E+05	1,87E+06	1,87E+06	9,76E+05		1,77E+06	2,72E+06	3,11E+06	3,25E+06		2,43E+06	1,88E+06
a ₁ b ₄	2	4,00E+05		7,83E+05	9,35E+05	1,21E+06	1,21E+06	8,20E+05		1,89E+06	6,12E+06	3,91E+06	4,02E+06		1,20E+06	6,50E+05
a ₁ b ₅	1	4,00E+05		9,95E+05	1,10E+06	2,69E+06	3,81E+06	3,80E+06		2,73E+06	1,45E+06	1,59E+06	1,37E+06		5,68E+05	3,40E+05
a ₁ b ₅	2	4,00E+05		8,15E+05	1,02E+06	2,22E+06	3,76E+06	2,73E+06		2,55E+06	1,80E+06	1,15E+06	1,86E+06		5,80E+05	2,95E+05
a ₁ b ₆	1	4,00E+05		7,73E+05	9,78E+05	1,15E+06	8,45E+05	9,24E+05		1,41E+06	2,02E+06	3,70E+06	8,55E+05		3,00E+06	1,50E+06
a ₁ b ₆	2	4,00E+05		6,80E+05	8,78E+05	1,89E+06	2,60E+06	2,71E+06		1,56E+06	1,67E+06	3,46E+06	3,18E+06		4,60E+05	3,85E+05
a ₁ b ₇	1	4,00E+05		1,02E+06	1,35E+06	1,41E+06	1,57E+06	1,86E+06		2,07E+06	2,67E+06	2,40E+06	1,86E+06		1,20E+06	7,90E+05
a ₁ b ₇	2	4,00E+05		1,47E+06	1,26E+06	1,56E+06	1,83E+06	2,08E+06		2,30E+06	2,91E+06	2,51E+06	1,92E+06		1,05E+06	8,70E+05
a ₁ b ₈	1	4,00E+05		7,93E+05	2,51E+06	1,21E+06	1,21E+06	5,52E+06		8,03E+06	1,02E+07	1,13E+07	1,06E+07		2,30E+06	1,76E+06
a ₁ b ₈	2	4,00E+05		6,98E+05	1,89E+06	2,45E+06	2,78E+06	3,72E+06		4,19E+06	4,92E+06	1,42E+06	1,16E+06		1,61E+06	4,90E+05
a ₁ b ₉	1	4,00E+05		5,08E+06	6,36E+06	3,01E+07	3,28E+07	2,53E+07		9,06E+06	1,46E+07	4,98E+06	4,92E+06		2,51E+06	1,29E+06
a ₁ b ₉	2	4,00E+05		7,73E+06	1,62E+07	3,75E+07	3,76E+07	1,64E+07		8,49E+06	9,53E+06	8,68E+06	4,84E+06		3,46E+06	1,50E+06
a ₁ b ₁₀	1	4,00E+05		1,51E+07	1,14E+07	1,95E+07	4,60E+07	3,07E+07		1,54E+07	5,23E+06	2,59E+06	2,66E+06		1,41E+06	1,27E+06
a ₁ b ₁₀	2	4,00E+05		1,42E+07	3,47E+07	1,06E+07	2,96E+07	1,53E+07		1,83E+07	2,80E+06	2,11E+06	2,09E+06		1,72E+06	7,05E+05

TABLA A7. Continuación...

TRATAMIENTO	RÉPLICAS	DÍAS															
		0	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	15	17	18	19	20
a2b1	1	4,00E+05		8,03E+06	1,25E+07	1,59E+07		1,52E+07	9,38E+06	3,80E+06	8,79E+06			9,11E+06	3,85E+06	2,03E+06	2,08E+06
a2b1	2	4,00E+05		9,07E+06	1,55E+07	1,79E+07		2,21E+07	1,47E+07	5,74E+06	9,44E+06			1,08E+07	3,73E+06	3,63E+06	4,10E+06
a2b2	1	4,00E+05		1,37E+06	1,24E+06	3,60E+05		1,15E+06	6,52E+06	1,13E+07	9,82E+06			3,91E+06	2,84E+06	2,68E+06	4,90E+05
a2b2	2	4,00E+05		1,48E+06	3,09E+06	1,22E+06		1,36E+06	4,91E+06	2,18E+06	3,05E+06			1,76E+06	6,65E+05	2,80E+05	4,80E+05
a2b3	1	4,00E+05		4,64E+06	3,45E+06	6,11E+06		7,27E+06	2,34E+06	3,89E+06	2,43E+06			9,05E+05	9,60E+05	8,00E+05	6,15E+05
a2b3	2	4,00E+05		6,05E+06	8,51E+06	7,01E+06		8,41E+06	6,73E+06	4,77E+06	5,30E+06			4,39E+06	1,56E+06	3,63E+06	1,84E+06
a2b4	1	4,00E+05		5,24E+06	9,59E+06	1,90E+07		7,11E+06	6,06E+06	5,39E+06	6,40E+06			1,73E+06	5,95E+05	1,79E+06	8,30E+05
a2b4	2	4,00E+05		6,28E+06	1,40E+07	1,67E+07		7,22E+06	1,08E+07	9,35E+06	7,69E+06			1,65E+06	6,15E+05	2,31E+06	1,47E+06
a2b5	1	4,00E+05			2,65E+05	7,30E+05		8,50E+06	1,06E+07	1,03E+07	7,00E+06			2,08E+06	6,75E+05	1,41E+06	1,73E+06
a2b5	2	4,00E+05			3,65E+05	8,05E+05		1,66E+06	8,40E+06	1,07E+07	6,47E+06			1,48E+06	1,47E+06	4,27E+06	1,34E+06
a2b6	1	4,00E+05			1,80E+05	3,55E+05		5,98E+05	7,74E+05	9,40E+05	3,00E+06			6,85E+06	1,10E+07	1,68E+07	1,20E+07
a2b6	2	4,00E+05			1,85E+05	5,05E+05		1,19E+06	3,50E+06	9,24E+06	3,46E+07			2,06E+07	1,03E+07	1,45E+07	1,20E+07
a2b7	1	4,00E+05		1,50E+07	1,52E+07	2,73E+07		2,36E+07	2,26E+07	6,26E+07	1,95E+07			1,58E+06	3,77E+06	6,94E+06	3,63E+06
a2b7	2	4,00E+05		2,56E+06	1,86E+06	2,74E+07		2,07E+07	1,84E+07	6,42E+07	1,75E+07			7,71E+06	5,66E+06	8,86E+06	2,13E+06
a2b8	1	4,00E+05		4,03E+06	2,89E+07	2,25E+07		2,10E+07	2,38E+07	1,92E+07	1,14E+07			1,19E+06	1,34E+06	2,84E+06	1,22E+06
a2b8	2	4,00E+05		2,02E+07	1,06E+07	1,33E+07		2,19E+07	1,75E+07	1,95E+07	1,18E+07			1,61E+06	1,91E+06	2,58E+06	7,70E+05
a2b9	1	4,00E+05		1,47E+06	1,67E+06	7,72E+06		2,72E+07	5,84E+06	1,23E+07	5,97E+06			1,90E+06	3,19E+06	1,84E+06	1,41E+06
a2b9	2	4,00E+05		1,46E+06	1,73E+06	5,40E+06		2,61E+07	6,47E+06	7,58E+06	3,98E+06			3,93E+06	4,52E+06	2,13E+06	3,31E+06
a2b10	1	4,00E+05	8,66E+06	4,69E+07	1,43E+07	4,79E+07		1,62E+07	6,84E+06	2,63E+06	2,72E+06			7,95E+05	1,23E+06	1,29E+06	3,40E+05
a2b10	2	4,00E+05	5,80E+06	4,72E+07	1,97E+07	1,36E+07		1,17E+07	6,72E+06	1,94E+06	1,91E+06			3,70E+06	1,02E+06	9,50E+05	6,00E+05

TABLA A8. Producción de etanol (%) de cada tratamiento.

TRATAMIENTO	RÉPLICA	DÍAS	
		0	20
a ₁ b ₁	1	0,000	0,907
a ₁ b ₁	2	0,000	0,813
a ₁ b ₂	1	0,000	1,870
a ₁ b ₂	2	0,000	1,070
a ₁ b ₃	1	0,000	1,070
a ₁ b ₃	2	0,000	0,693
a ₁ b ₄	1	0,000	1,440
a ₁ b ₄	2	0,000	1,400
a ₁ b ₅	1	0,000	1,250
a ₁ b ₅	2	0,000	1,200
a ₁ b ₆	1	0,000	1,600
a ₁ b ₆	2	0,000	1,600
a ₁ b ₇	1	0,000	1,200
a ₁ b ₇	2	0,000	1,200
a ₁ b ₈	1	0,000	0,547
a ₁ b ₈	2	0,000	0,800
a ₁ b ₉	1	0,000	2,400
a ₁ b ₉	2	0,000	2,000
a ₁ b ₁₀	1	0,000	4,300
a ₁ b ₁₀	2	0,000	3,500
a ₂ b ₁	1	0,000	6,860
a ₂ b ₁	2	0,000	6,290
a ₂ b ₂	1	0,000	11,860
a ₂ b ₂	2	0,000	11,430
a ₂ b ₃	1	0,000	8,000
a ₂ b ₃	2	0,000	8,430
a ₂ b ₄	1	0,000	6,000
a ₂ b ₄	2	0,000	6,000
a ₂ b ₅	1	0,000	11,710
a ₂ b ₅	2	0,000	18,290
a ₂ b ₆	1	0,000	9,710
a ₂ b ₆	2	0,000	6,850
a ₂ b ₇	1	0,000	10,000
a ₂ b ₇	2	0,000	7,710
a ₂ b ₈	1	0,000	10,000
a ₂ b ₈	2	0,000	7,710
a ₂ b ₉	1	0,000	8,000
a ₂ b ₉	2	0,000	7,710
a ₂ b ₁₀	1	0,000	9,710
a ₂ b ₁₀	2	0,000	7,710

TABLA A9. Cinéticas de crecimiento para la fase exponencial de las curvas de crecimiento de cada tratamiento

Tratamientos	Cinética de crecimiento
a₁b₁	ufc/ml = 2×10^6 día - 2×10^7
a₁b₂	ufc/ml = 2×10^7 día - 9×10^7
a₁b₃	ufc/ml = 9×10^6 día - 7×10^7
a₁b₄	ufc/ml = 748615 día - 5×10^6
a₁b₅	ufc/ml = 1×10^6 día - 6×10^6
a₁b₆	ufc/ml = 1×10^6 día - 1×10^7
a₁b₇	ufc/ml = 182295 día + 425105
a₁b₈	ufc/ml = 950588 día - 4×10^6
a₁b₉	ufc/ml = 1×10^7 día - 5×10^7
a₁b₁₀	ufc/ml = 2×10^7 día - 1×10^8
a₂b₁	ufc/ml = 2×10^6 día + 493738
a₂b₂	ufc/ml = 2×10^6 día - 1×10^7
a₂b₃	ufc/ml = 942401 día + 887457
a₂b₄	ufc/ml = 3×10^6 día - 958765
a₂b₅	ufc/ml = 2×10^6 día - 1×10^7
a₂b₆	ufc/ml = 8×10^6 día - 8×10^7
a₂b₇	ufc/ml = 4×10^7 día - 4×10^8
a₂b₈	ufc/ml = 4×10^6 día - 51071
a₂b₉	ufc/ml = 9×10^6 día - 4×10^7
a₂b₁₀	ufc/ml = 4×10^7 día - 1×10^8

TABLA A10. Coeficientes de rendimiento de producción de etanol ($Y_{p/s}$) y de generación de biomasa ($Y_{m/s}$) respecto al sustrato consumido para cada tratamiento de estudio.

Tratamientos	$Y_{p/s}$	$Y_{m/s}$
a₁b₁	0,12	2,94E+06
a₁b₂	0,26	4,78E+07
a₁b₃	0,19	1,68E+07
a₁b₄	0,30	1,30E+07
a₁b₅	0,17	6,65E+06
a₁b₆	0,21	2,19E+06
a₁b₇	0,34	6,10E+06
a₁b₈	0,09	1,45E+07
a₁b₉	0,35	5,48E+07
a₁b₁₀	0,51	2,52E+07
a₂b₁	0,76	1,80E+06
a₂b₂	1,25	1,72E+06
a₂b₃	0,92	1,16E+06
a₂b₄	0,76	1,20E+07
a₂b₅	1,29	3,81E+05
a₂b₆	0,88	1,25E+07
a₂b₇	0,69	4,77E+07
a₂b₈	0,69	3,50E+06
a₂b₉	0,62	6,07E+06
a₂b₁₀	0,67	1,66E+07

TABLA A11. Tiempos de generación microbiana obtenidos para cada tratamiento.

Tratamientos	Tiempo de generación (min)
a₁b₁	647,96
a₁b₂	85,80
a₁b₃	264,76
a₁b₄	352,48
a₁b₅	241,95
a₁b₆	223,84
a₁b₇	746,21
a₁b₈	342,06
a₁b₉	237,10
a₁b₁₀	503,43
a₂b₁	74,40
a₂b₂	241,41
a₂b₃	177,09
a₂b₄	280,12
a₂b₅	158,67
a₂b₆	98,54
a₂b₇	419,98
a₂b₈	64,65
a₂b₉	83,01
a₂b₁₀	66,68

ANEXO B

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla B1. Análisis de varianza para el número de ufc por mililitro de mosto de uva rosada.

Fuente de Variación	S.C.	G.L.	C.M.	F.C.	Probabilidad
A: °Brix	2,85E+13	1	2,85E+13	63,55	<0,0001 **
B: Levaduras	1,057E+14	9	1,175E+13	26,2	<0,0001 **
AB	1,081E+14	9	1,201E+13	26,79	<0,0001 **
Error	8,52E+12	19	4,484E+11		
Total	2,509E+14	39			

**= altamente significativo

*= significativo

ns= no significativo

Tabla B2. Separación de medias para el número de ufc por mililitro de mosto para la interacción AxB.

°BRIX	LEVADURA	RANGO	
18	CC036	A	
18	CC001	B	
18	CC039	B	C
18	CC043	B	C
18	CC029	B	C
12	CC043	B	C
12	CC017	B	C
12	CC025	B	C
18	CC017	B	C
18	CC025	B	C
12	CC041	B	C
18	CC041	B	C
12	GC00	B	C
12	CC036	B	C
12	CC039	B	C
12	CC004	B	C
18	CC004	B	C
18	GC00	B	C
12	CC001	B	C
12	CC029		C

Tabla B3. Análisis de varianza para la variación de pH del mosto.

Fuente de Variación	S.C.	G.L.	C.M.	F.C.	Probabilidad
A: °Brix	9,00E-04	1	9,00E-04	0,02	0,8948 ns
B: Levaduras	0,16	9	0,02	0,34	0,9478 ns
AB	0,32	9	0,04	0,71	0,6955 ns
Error	0,96	19	0,05		
Total	1,43	39			

**= altamente significativo

*= significativo

ns= no significativo

Tabla B4. Análisis de varianza para la acidez expresada en % ácido tartárico del mosto.

Fuente de Variación	S.C.	G.L.	C.M.	F.C.	Probabilidad
A: °Brix	2,77	1	2,77	2174,45	<0,0001 **
B: Levaduras	0,02	9	2,30E-03	1,83	0,1282 ns
AB	3,50E-03	9	3,90E-04	0,3	0,9641 ns
Error	0,02	19	1,30E-03		
Total	2,82	39			

**= altamente significativo

*= significativo

ns= no significativo

Tabla B5. Análisis de varianza para los sólidos solubles (°Brix).

Fuente de Variación	S.C.	G.L.	C.M.	F.C.	Probabilidad
A: °Brix	204,3	1	204,3	49,24	<0,0001 **
B: Levaduras	64,54	9	7,17	1,73	0,1509 ns
AB	51,58	9	5,73	1,38	0,2637 ns
Error	78,84	19	4,15		
Total	399,26	39			

**= altamente significativo

*= significativo

ns= no significativo

Tabla B6. Análisis de varianza para la producción de etanol (%).

Fuente de Variación	S.C.	G.L.	C.M.	F.C.	Probabilidad
A: °Brix	555,92	1	555,92	317,26	<0,0001 **
B: Levaduras	66,62	9	7,4	4,22	0,004 **
AB	70,05	9	7,78	4,44	0,003 **
Error	33,29	19	1,75		
Total	726,8	39			

**= altamente significativo

*= significativo

ns= no significativo

Tabla B7. Separación de medias de la producción de etanol (%) para la interacción AxB.

°BRIX	LEVADURA	RANGO		
18	CC029	A		
18	CC004	A	B	
18	CC039		B	C
18	CC041		B	C
18	GC00		B	C
18	CC036		B	C
18	CC017		B	C
18	CC043		C	
18	CC001		C	D
18	CC025		C	D E
12	GC00		C	D E
12	CC043		D	E
12	CC036		D	E
12	CC004		D	E
12	CC025		D	E
12	CC029		D	E
12	CC039		D	E
12	CC017			E
12	CC001			E
12	CC041			E

ANEXO C

GRÁFICOS

FIGURA C1. Crecimiento de ufc/ml de *Candida sorbivorans* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 12 °Brix.

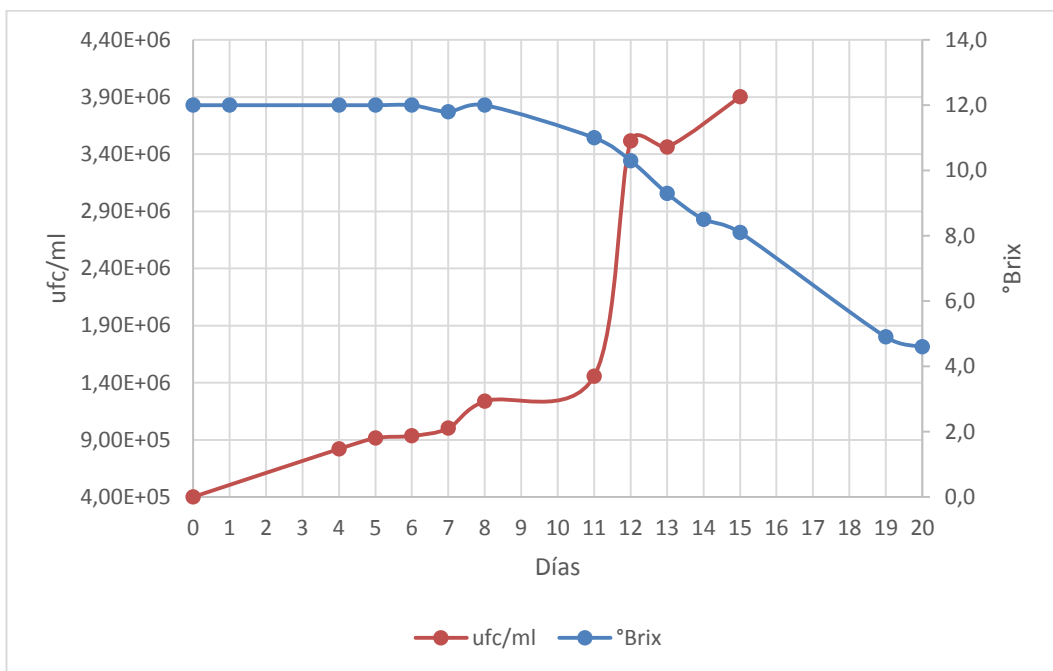


FIGURA C2. Crecimiento de ufc/ml de *Wickerhamomyces onychis* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 12 °Brix.

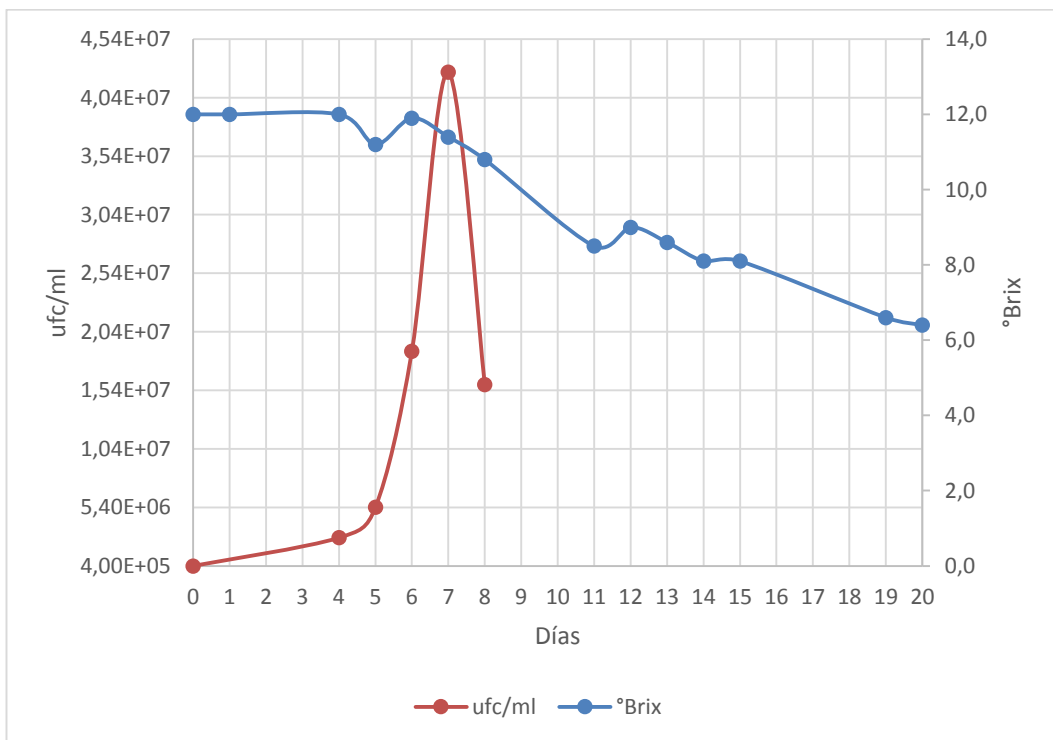


FIGURA C3. Crecimiento de ufc/ml de *Clavispora lusitaniae* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 12 °Brix.

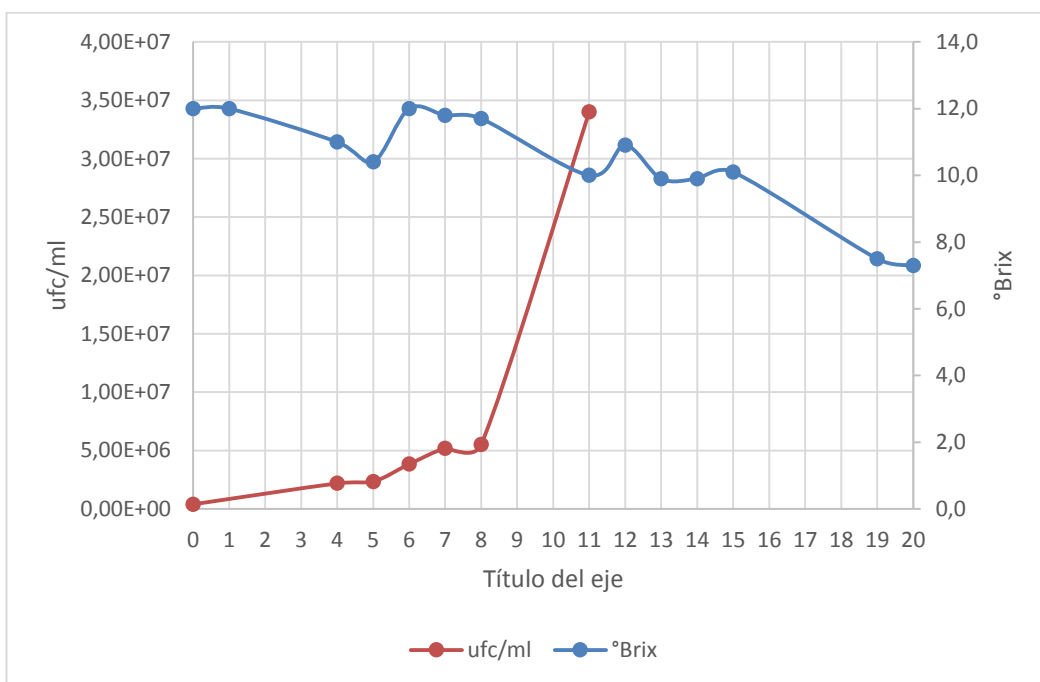


FIGURA C4. Crecimiento de ufc/ml de *Pichia manshurica* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 12 °Brix.

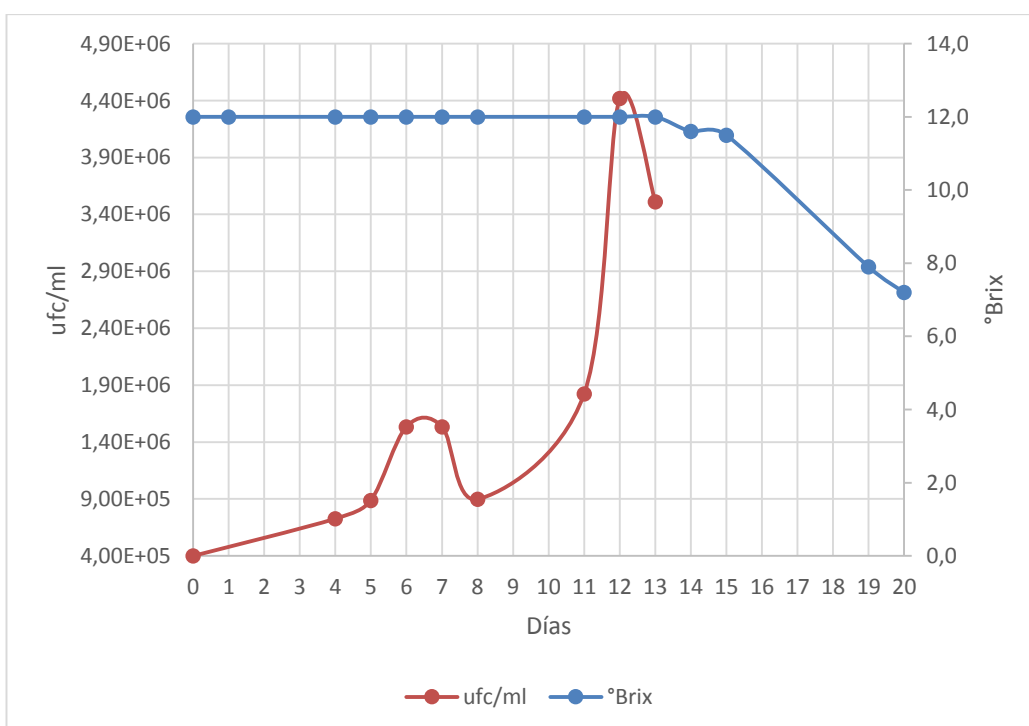


FIGURA C5. Crecimiento de ufc/ml de *Metschnikowia pulcherrima* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 12 °Brix.

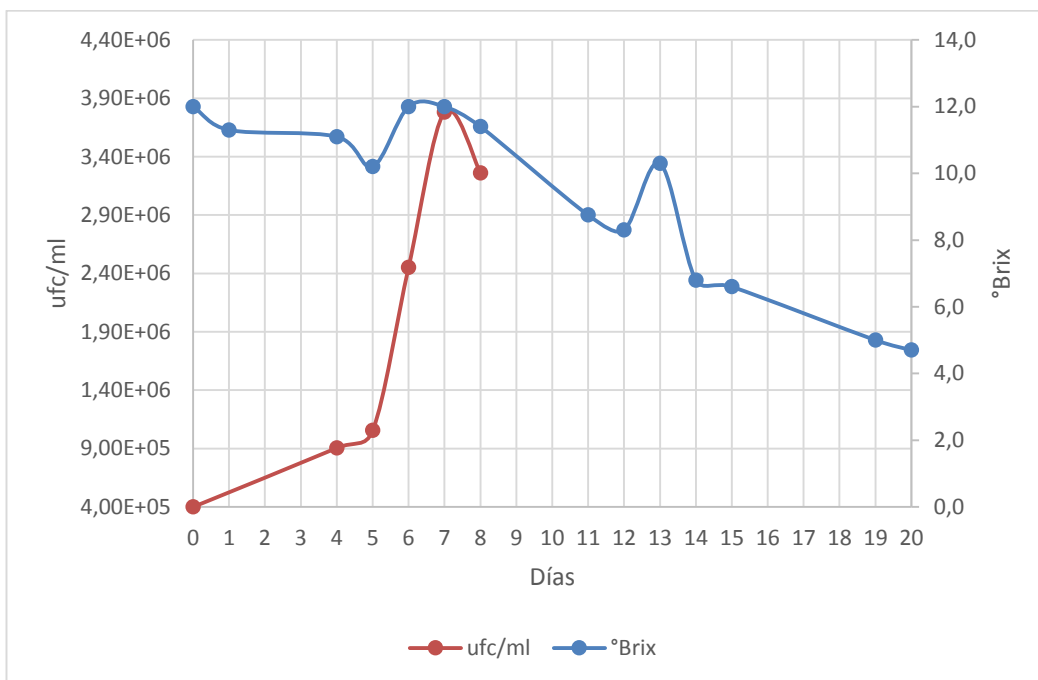


FIGURA C6. Crecimiento de ufc/ml de *Pichia membranifaciens* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 12 °Brix.

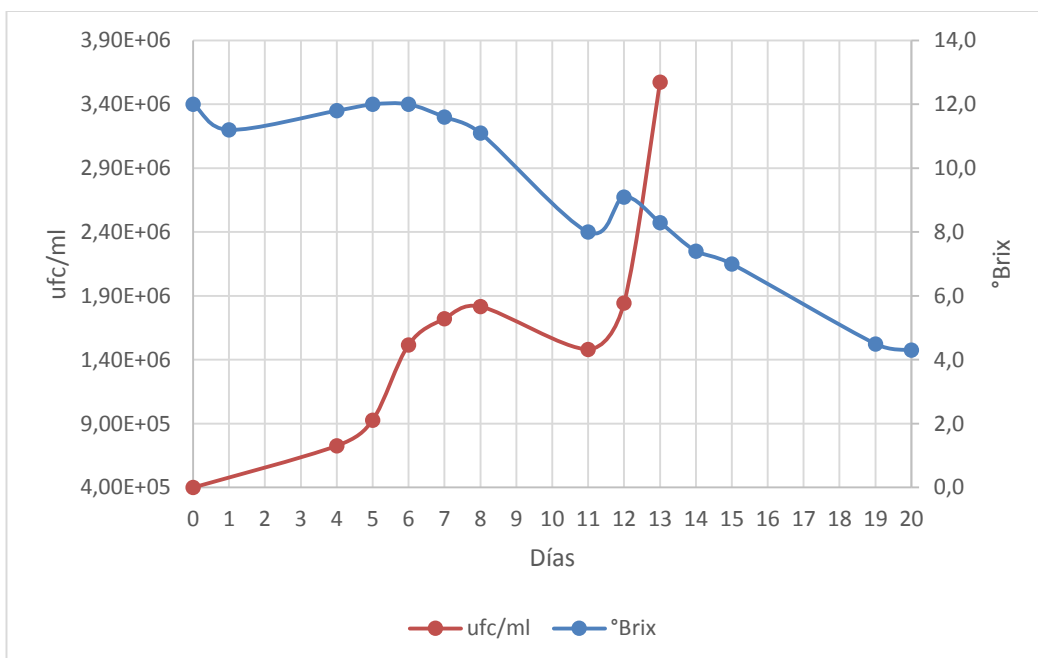


FIGURA C7. Crecimiento de ufc/ml de *Hanseniaspora meyeri* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 12 °Brix.

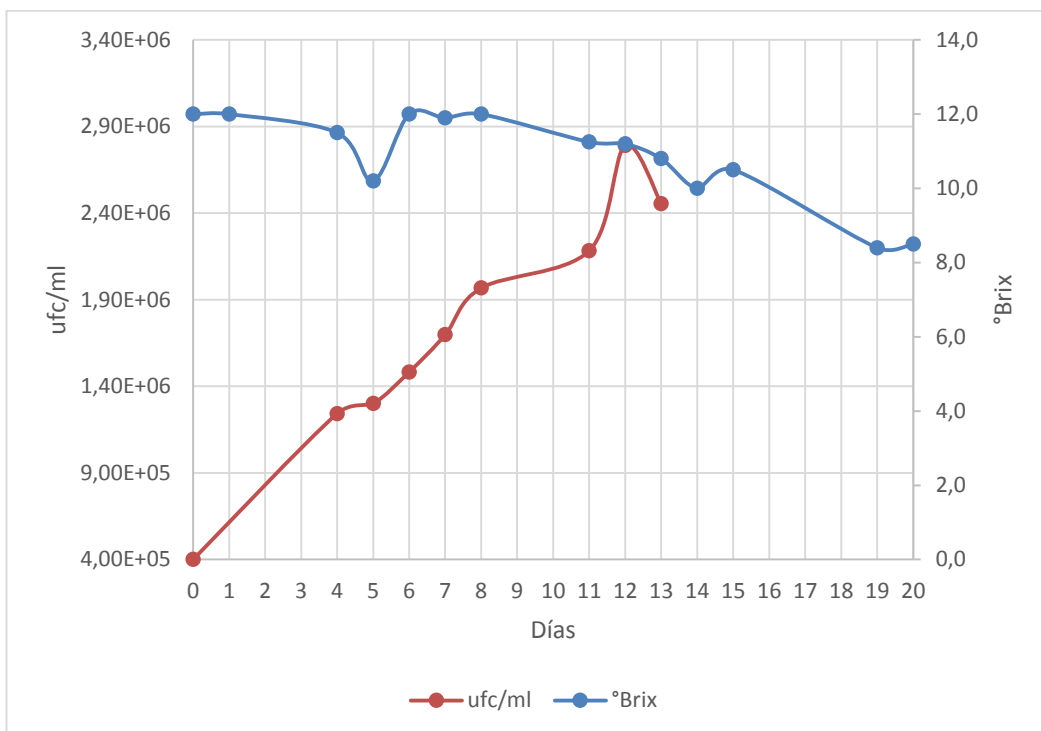


FIGURA C8. Crecimiento de ufc/ml de *Galactomyces geotrichum* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 12 °Brix.

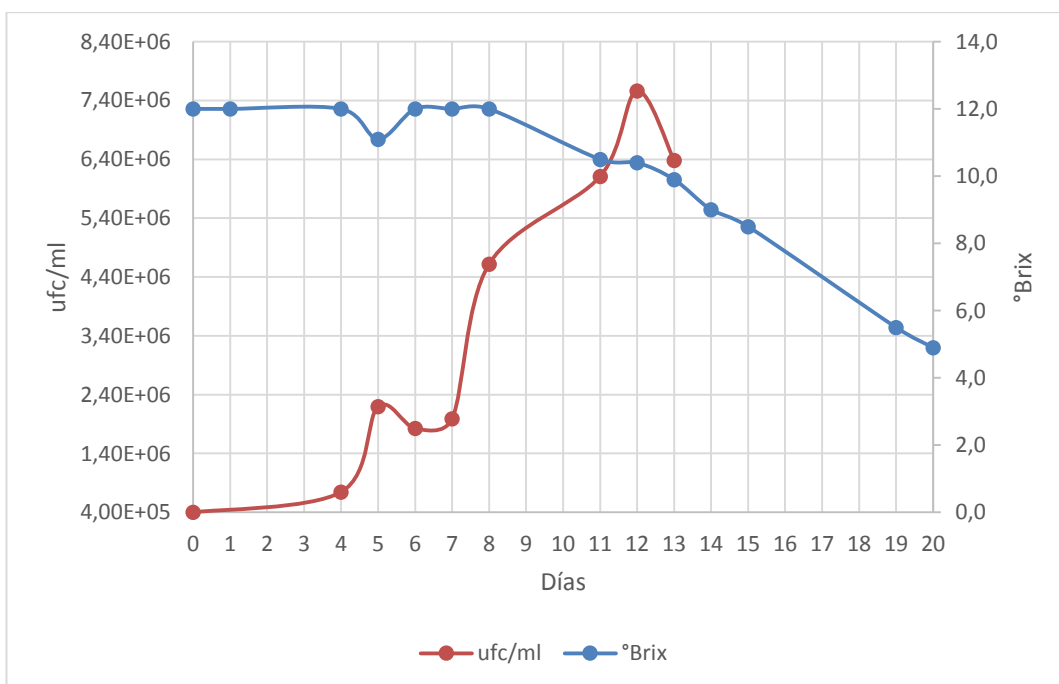


FIGURA C9. Crecimiento de ufc/ml de *Meyerozyma guilliermondii* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 12 °Brix.

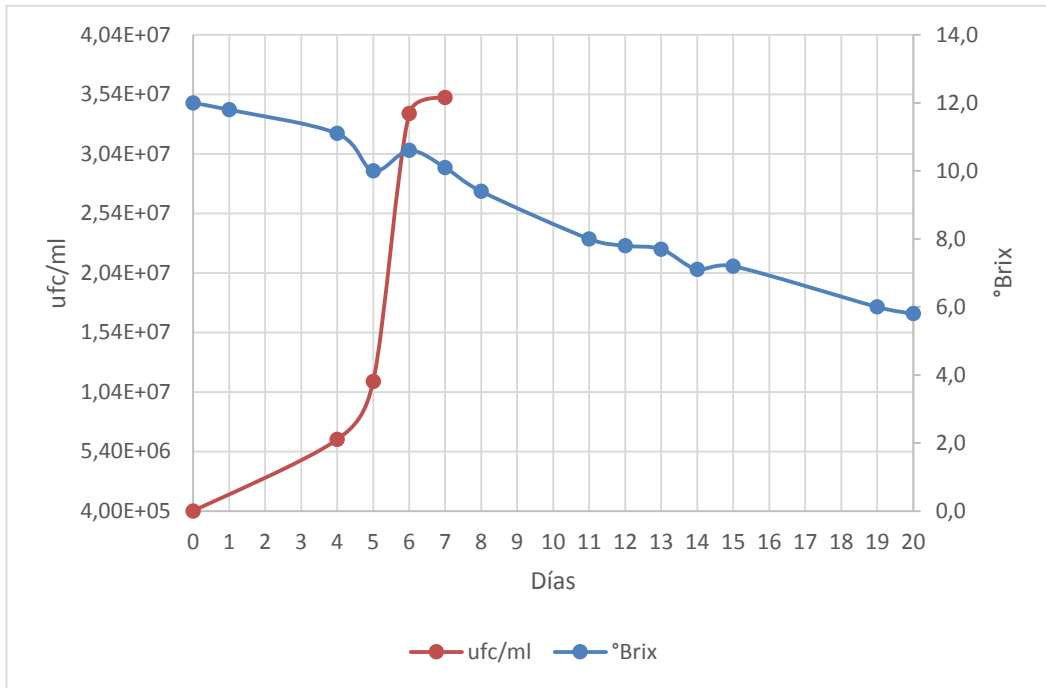


FIGURA C10. Crecimiento de ufc/ml de *Saccharomyces cerevisiae* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 12 °Brix.

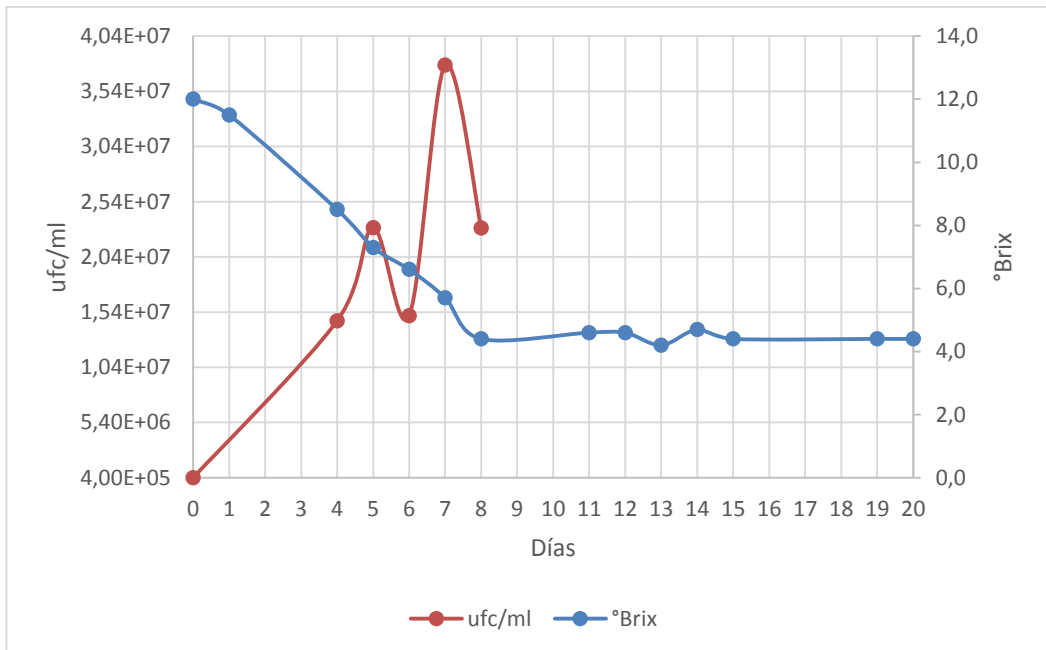


FIGURA C11. Crecimiento de ufc/ml de *Candida sorbosivorans* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 18 °Brix.

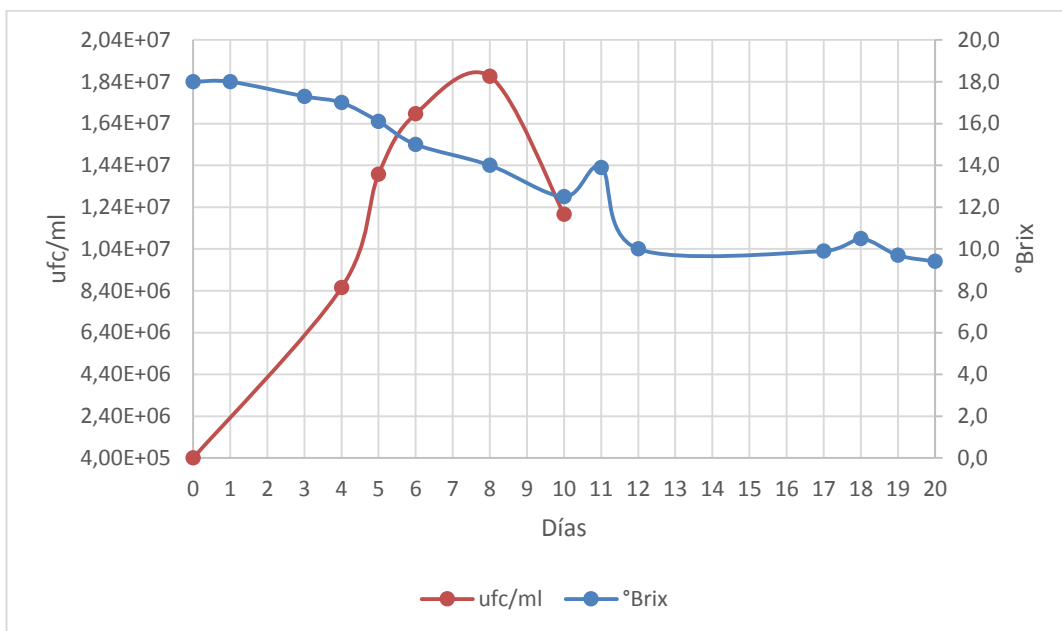


FIGURA C12. Crecimiento de ufc/ml de *Wickerhamomyces onychis* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 18 °Brix.

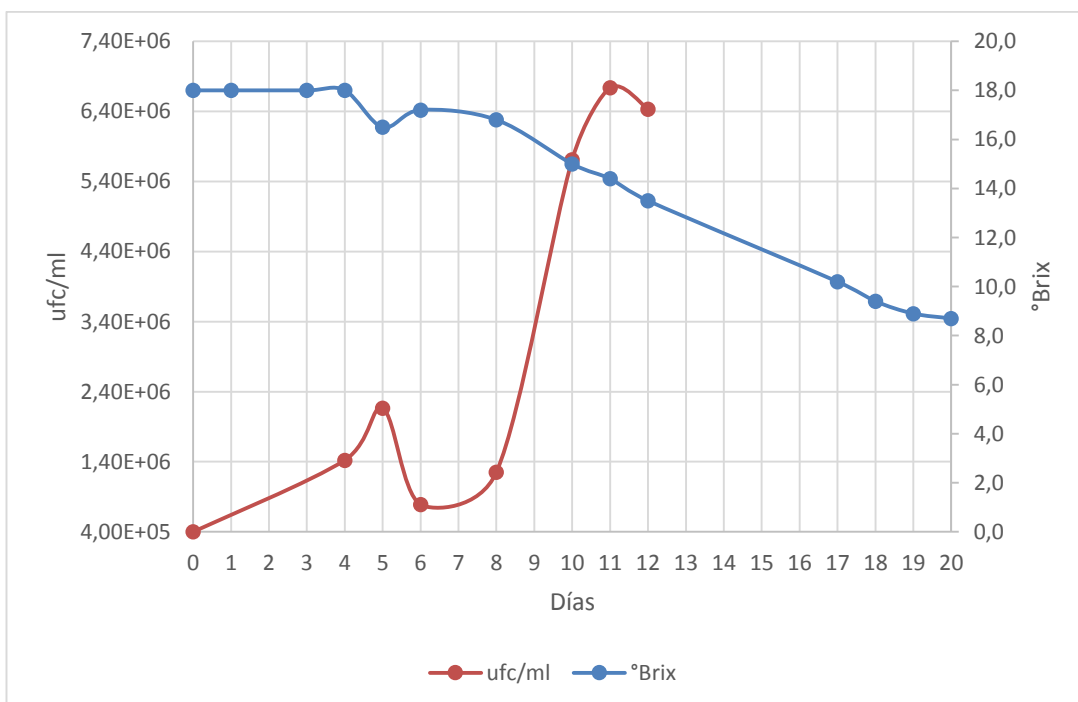


FIGURA C13. Crecimiento de ufc/ml de *Clavispora lusitaniae* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 18 °Brix.

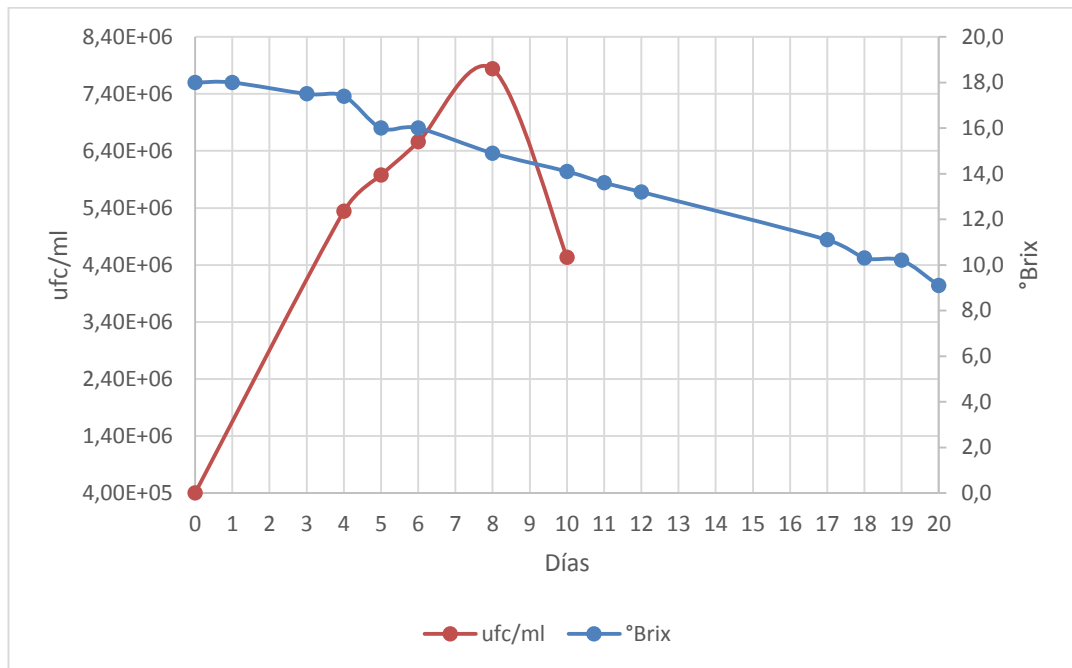


FIGURA C14. Crecimiento de ufc/ml de *Pichia manshurica* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 18 °Brix.

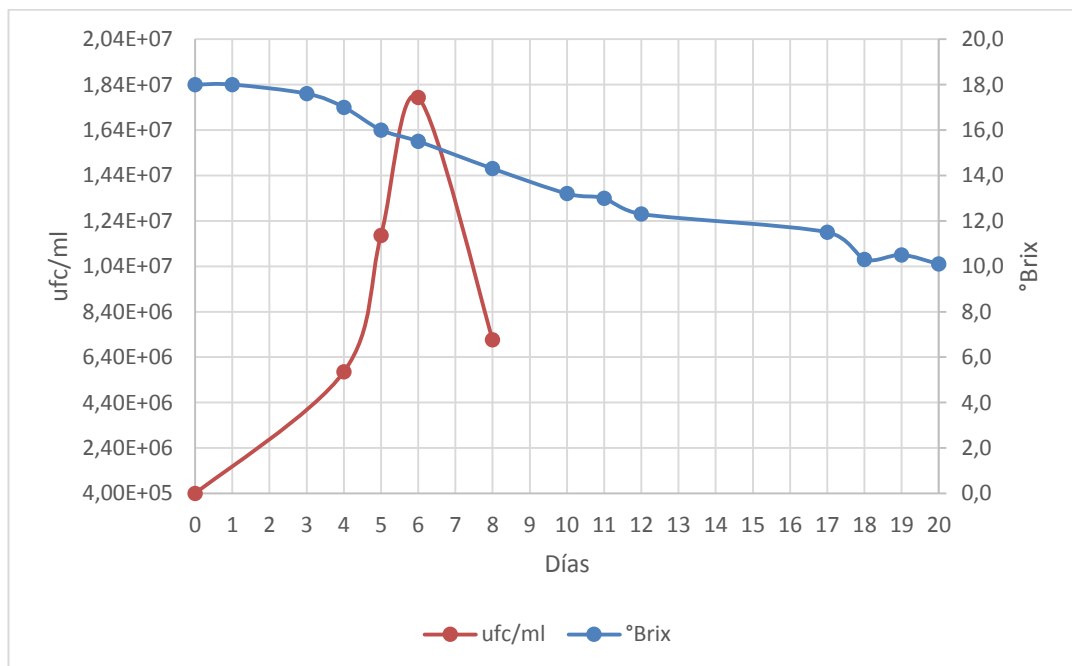


FIGURA C15. Crecimiento de ufc/ml de *Metschnikowia pulcherrima* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 18 °Brix.

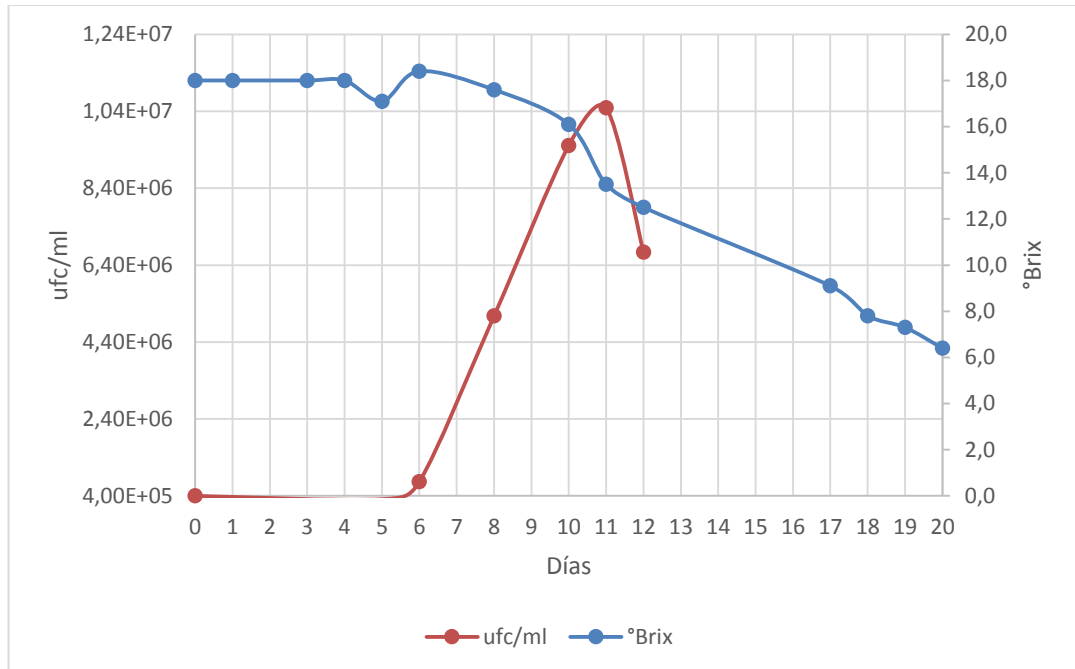


FIGURA C16. Crecimiento de ufc/ml de *Pichia membranifaciens* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 18 °Brix.

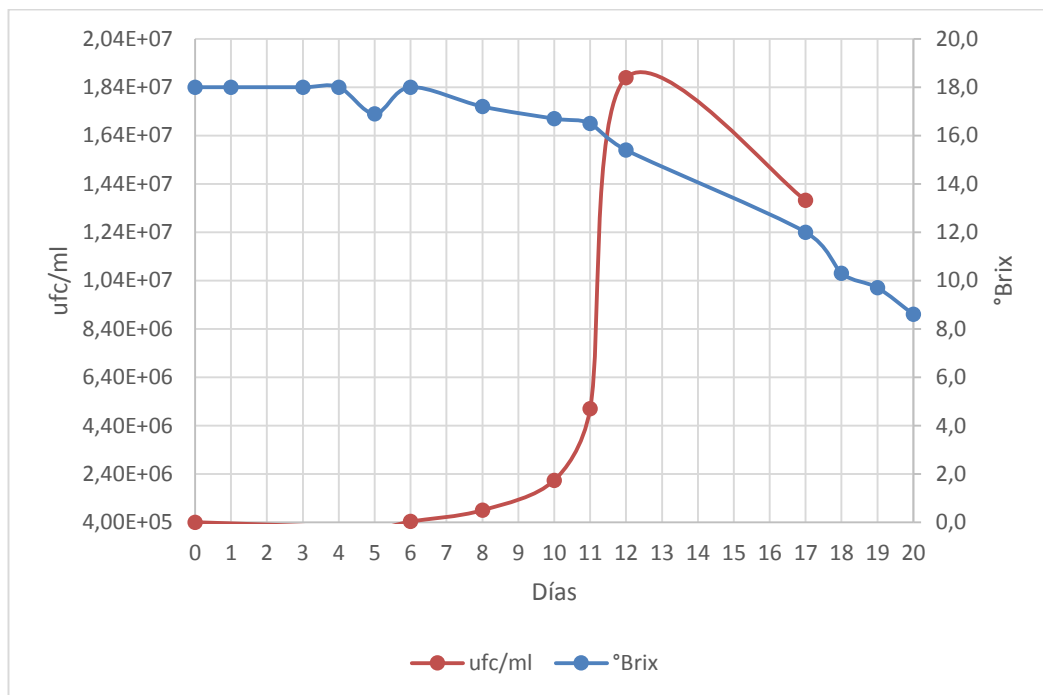


FIGURA C17. Crecimiento de ufc/ml de *Hanseniaspora meyeri* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 18 °Brix.

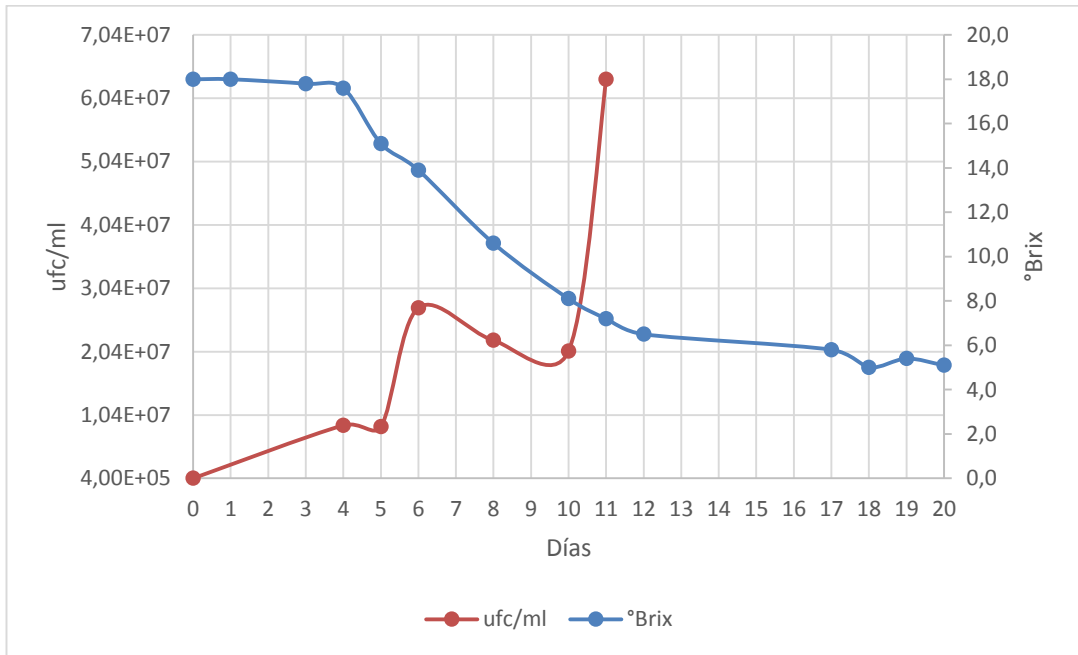


FIGURA C18. Crecimiento de ufc/ml de *Galactomyces geotrichum* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 18 °Brix.

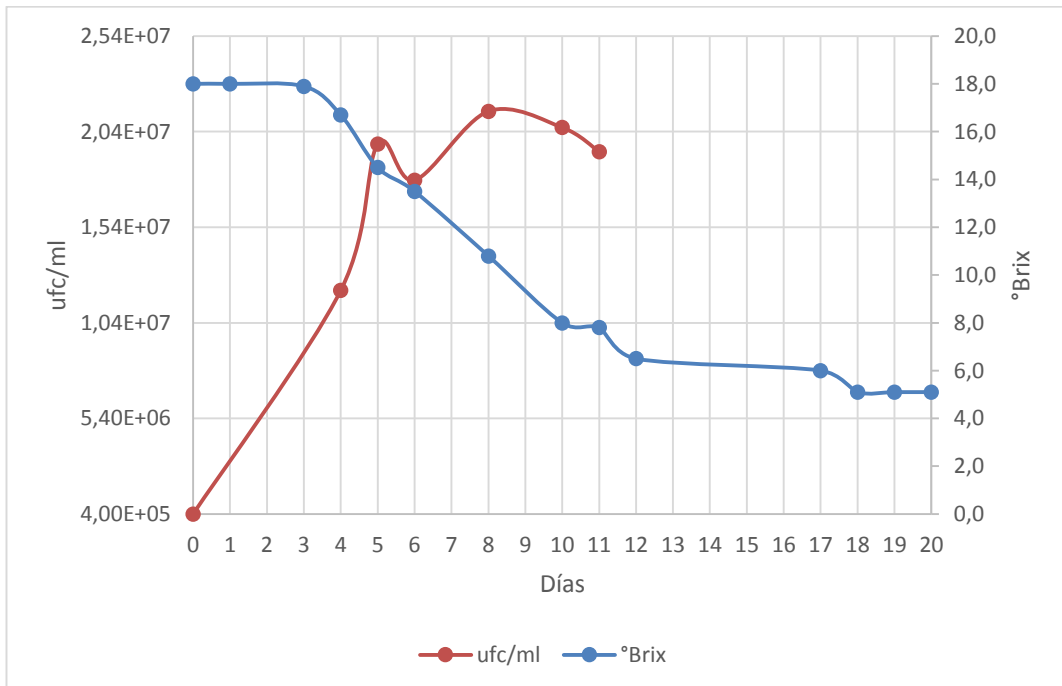


FIGURA C19. Crecimiento de ufc/ml de *Meyerozyma guilliermondii* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 18 °Brix.

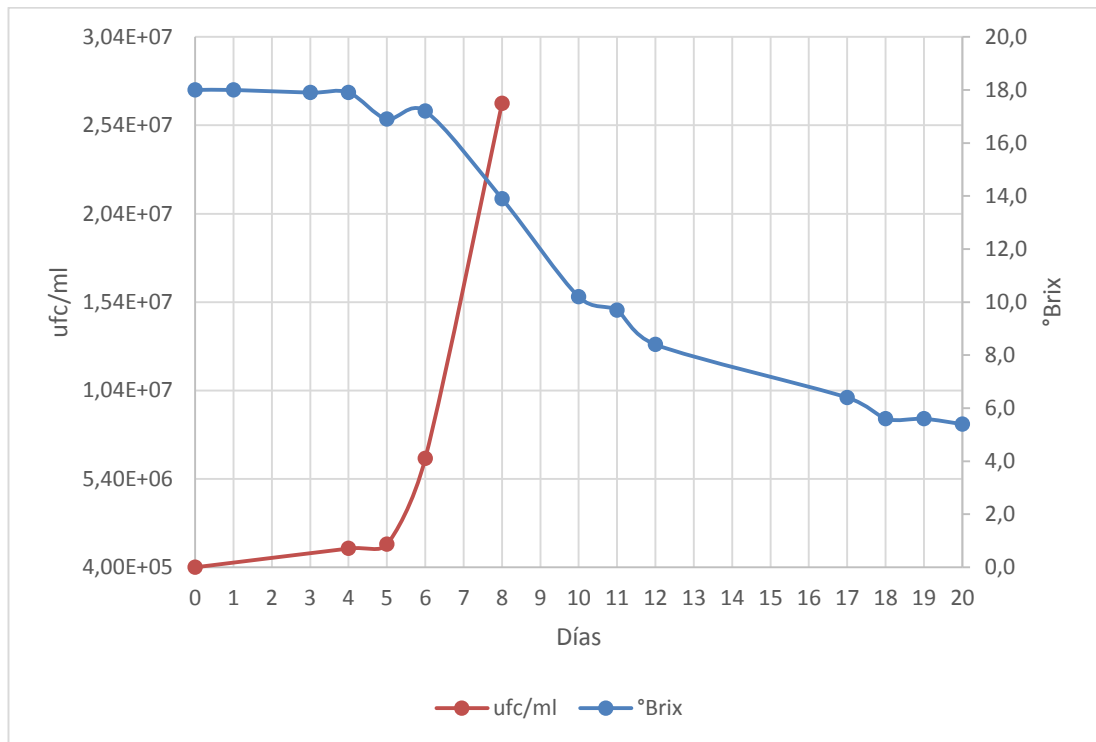


FIGURA C20. Crecimiento de ufc/ml de *Saccharomyces cerevisiae* y el número de sólidos solubles (°Brix) registrados durante el proceso de fermentación. Factor A: 18 °Brix.

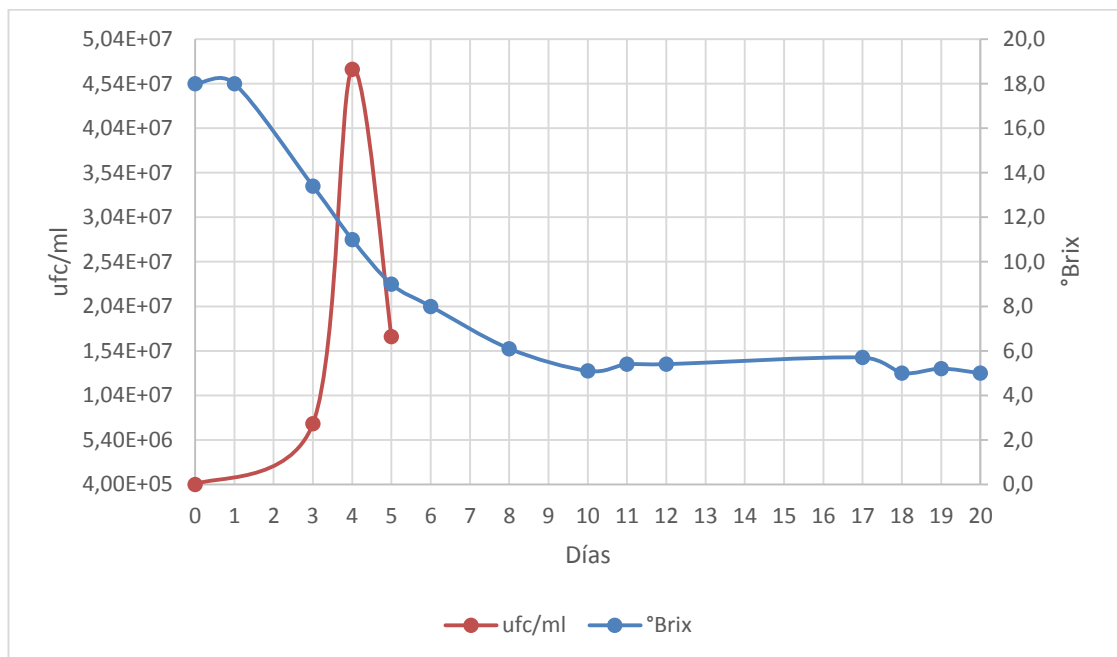


FIGURA C21. Producción de alcohol etílico (%) dado de cada tratamiento.

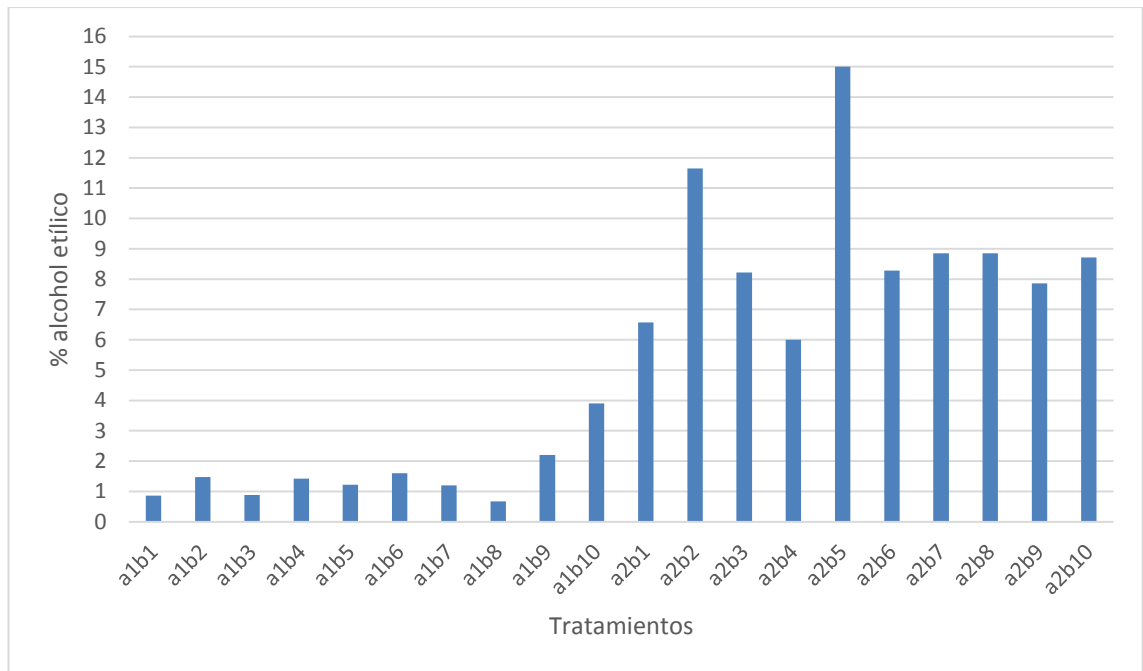


FIGURA C22. Comparación del mejor tratamiento a_{2b5} (18°Brix x *Metschnikowia pulcherrima*) con a_{2b10} (18°Brix x *Saccharomyces cerevisiae*)

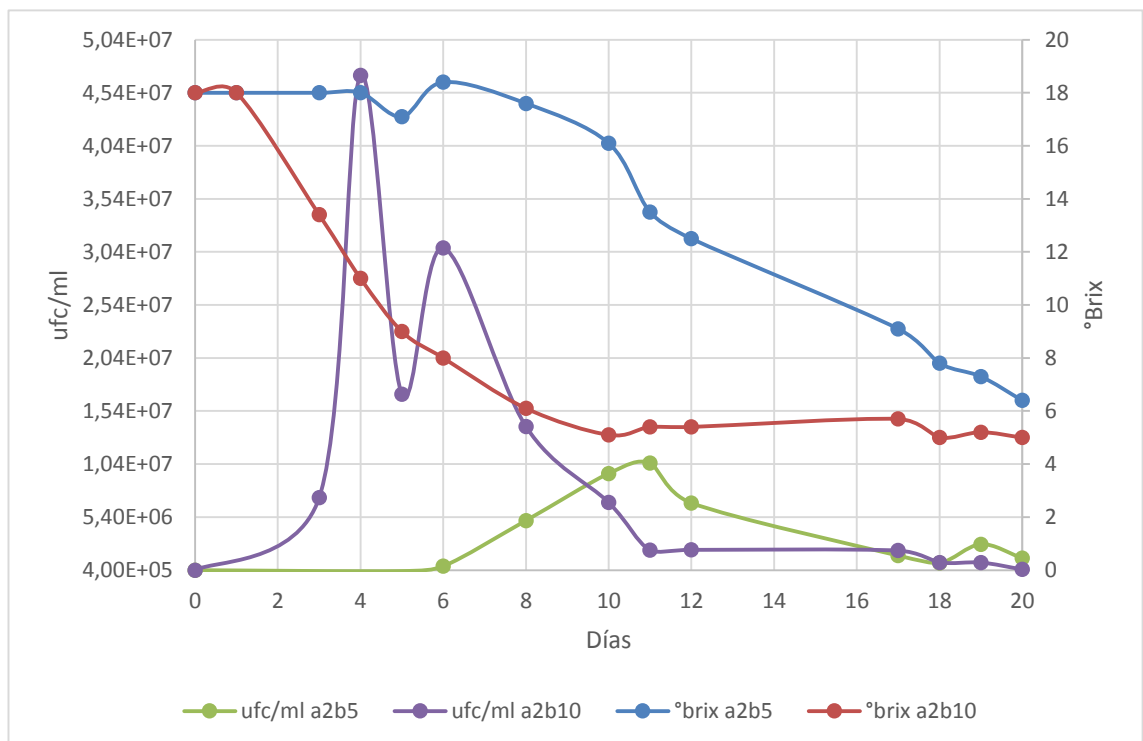


FIGURA C23. Producción de etanol de cada tratamiento y concentración de sólidos solubles al final de la fermentación.

